

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

Épreuve E3 - Unité U32

Microbiologie et technologies d'analyse

CALCULATRICE INTERDITE.

ÉPREUVE E3. UNITÉ U32**Microbiologie et technologies d'analyse****SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS****Dictionnaire français-anglais autorisé
Calculatrice non autorisée**

Un rapport « Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France », réalisé par l'Institut de veille sanitaire et l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a pour objectif de préciser la nature et l'importance des pathologies infectieuses liées à l'alimentation en France.

La répartition des infections d'origine alimentaire, pour les cas hospitalisés est la suivante :

- infections bactériennes 87 % ;
- infections virales 7 % ;
- infections dues à des parasites 6 %.

1 - Toxi-infections bactériennes d'origine alimentaire. (54 points)

Le rapport établi permet d'observer que les trois principales bactéries responsables d'infections d'origine alimentaire sont : *Salmonella* (59,2 %), *Campylobacter* (22,8 %) et *Staphylococcus aureus* (9,3 %).

1.1 - Le pouvoir pathogène bactérien. (6 points)

1.1.1 - L'adhésion des bactéries aux tissus de l'hôte est une étape fondamentale de l'infection. Différentes structures peuvent être impliquées. Citer ces structures, préciser leur nature chimique, leur localisation et leurs propriétés.

1.1.2 - Le pouvoir pathogène d'une bactérie peut se manifester selon deux grands processus parfois associés.
Les citer et les définir.

1.2 - Prévention des salmonelloses. (27 points)

Les *Salmonella spp* apparaissent comme les premiers cas d'infections bactériennes d'origine alimentaire en France où la surveillance est réalisée par le CNR (Centre National de Recherche) de l'Institut Pasteur à Paris.

1.2.1 - La lyse de certaines souches au niveau des ganglions mésentériques entraîne la libération d'un de leurs constituants, responsable de leur fort pouvoir pathogène.

Donner le nom exact de ce composé.

Schématiser sa structure et préciser, pour chaque partie constitutive :

- le nom,
- la nature biochimique,
- la localisation,
- la(les) propriété(s).

1.2.2 - La recherche des *Salmonella* dans les denrées alimentaires fait l'objet d'une procédure normalisée tant au niveau international (EN ISO 6579) qu'au niveau national (NF/EN 12824) où elle est complétée par une norme de routine (NF V 08-052). Nous assistons actuellement à l'émergence de méthodes alternatives.

1.2.2.1 - Citer et différencier les deux types de méthodes normalisées.

1.2.2.2 - Présenter les avantages des méthodes dites alternatives.

1.2.3 - La recherche des *Salmonella* par la procédure normalisée commence par les quatre étapes décrites dans le **document n°1**.

1.2.3.1 - Qualifier et justifier les deux premières étapes du protocole de recherche des *Salmonella*.

1.2.3.2 - En utilisant les données du **document n° 2**, dégager l'intérêt du milieu de Rambach par rapport au milieu VB-RP pour la différenciation de *Salmonella*.

Différencier les colonies de *Salmonella* et de coliformes sur le milieu Rambach.

1.2.4 - L'identification peut se faire par ensemencement d'une galerie API 20 E. Le nom du micro-organisme est obtenu par une méthode probabiliste.

En utilisant l'extrait de la base de données API 20 E, **document n° 3**, calculer, pour les deux taxons proposés, la probabilité d'observer le profil biochimique obtenu expérimentalement (**document n° 4**). Les calculs seront posés mais non effectués.

Conclure.

1.2.5 - Entre 1995 et 1997, 16104 *Salmonella* non typhiques ont été signalées au CNR. Les sérotypes *Salmonella Enteritidis* et *Salmonella Typhimurium* représentent 70 % des souches isolées. Et il est intéressant de constater que, parmi les souches de *Salmonella Typhimurium* lysotypées, un lysotype (DT 104) représente 70 % des souches.

Définir les termes sérotype et lysotype.

1.2.6 - Divers auteurs se sont intéressés à l'état physiologique des bactéries d'intérêt sanitaire présentes en milieu aquatique. Ils ont utilisé deux techniques pour effectuer le dénombrement de *Salmonella* incubées en conditions stressantes : un dénombrement sur milieux solides et une numération par la DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique).

Le **document n° 5** présente les résultats obtenus.

1.2.6.1 - Analyser l'allure générale des courbes représentées.

Proposer une conclusion quant à l'état physiologique des bactéries en fin d'expérience.

1.2.6.2 - Présenter les étapes principales de la DEFT.

1.2.6.3 - Une variante de la DEFT est présentée dans le **document n° 6**.

Donner l'intérêt de ce test.

Préciser le principe.

Citer les avantages.

1.3 - Toxi-infections alimentaires (TIA) à *Staphylococcus aureus*. (21 points)

1.3.1 - Le genre *Staphylococcus* forme un groupe bactérien cohérent selon les critères de la taxonomie moléculaire. Il partage des caractères morphologiques avec le genre *Micrococcus*, mais il est cependant phylogénétiquement plus proche de l'ensemble *Bacillus* - *Lactobacillus* - *Streptococcus* qui regroupe les bactéries Gram positives à faible pourcentage en GC.

1.3.1.1 - Définir le GC %.

1.3.1.2 - On peut évaluer le GC % en déterminant la Tm.

À quoi correspond la Tm ?

1.3.1.3 - Préciser la relation existant entre ces deux données. Justifier.

1.3.2 - En France, *Staphylococcus aureus* est le deuxième agent responsable de TIA après les *Salmonella*.

1.3.2.1 - Comment expliquer l'incidence élevée des intoxications dues à un biotype humain ?

1.3.2.2 - Les toxines bactériennes sont classées en deux groupes, sur la base de leur nature chimique.

Nommer ces deux groupes de toxines.

Comparer les propriétés respectives des deux types de toxines.

1.3.2.3 - Afin de déterminer les conditions de la toxinogénèse, la croissance de *Staphylococcus aureus* a été étudiée. Une préculture de la souche utilisée pour cette étude, *Staphylococcus aureus* SA2, est ensemencée dans une fiole d'Erlenmeyer contenant 50 mL de milieu Trypcase Soja (TS) et incubée dans un bain thermostaté à 37 °C sous agitation. La croissance est suivie par méthode turbidimétrique. La courbe de croissance est présentée dans le **document n° 7**.

Le milieu TS est un milieu empirique.

Différencier un milieu empirique et un milieu synthétique.

Donner le principe du suivi de croissance par opacimétrie.

Définir les paramètres de la croissance et les estimer.

Donnée : $\ln 2 = 0,7$.

1.3.3 - Les *Staphylococcus aureus* sont dénombrés dans les aliments à l'aide d'une méthode normalisée NF EN ISO 6888-1 qui préconise l'isolement sur milieu de Baird-Parker puis la confirmation par la recherche de la coagulase. Ce dénombrement permet de répondre à l'un des critères établis par l'arrêté du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation sous forme de poudre de lait :

Staphylococcus aureus : $m = 10$, $M = 100$, $n = 5$, $c = 2$.

1.3.3.1 - Donner la signification de m , M , n , c .

1.3.3.2 - Rappeler le(s) rôle(s) des composants suivants du milieu de Baird-Parker : pyruvate de sodium, émulsion de jaune d'œuf, tellurite de potassium.

1.3.3.3 - Décrire l'aspect caractéristique des colonies de *Staphylococcus aureus* sur ce milieu, en justifiant tous les éléments de la réponse.

1.3.3.4 - La confirmation se réalise par mise en évidence d'un caractère spécifique des *Staphylococcus aureus* : la présence d'une coagulase.

Préciser le rôle de cette enzyme dans le mécanisme des infections provoquées par *Staphylococcus aureus*.

Donner le principe de mise en évidence de cette activité enzymatique.

1.3.4 - La méthode normalisée NF EN ISO 6888-2 propose un isolement sur milieu de Baird-Parker au plasma de lapin et au fibrinogène.

Quel avantage présente cette méthode par rapport à la précédente ? Justifier.

2 - Parasitoses d'origine alimentaire. (6 points)

Les aliments peuvent être le véhicule de formes infestantes de parasites. Sous nos climats sont particulièrement concernés les plathelminthes ainsi que certains protozoaires : toxoplasmes, amibes.

2.1 - L'amibiase.

C'est une parasitose due à l'amibe dysentérique *Entamoeba histolytica*, protozoaire strictement humain et électif du côlon.

2.1.1 - Préciser à quel règne appartient ce parasite.

2.1.2 - Citer les principales caractéristiques permettant de différencier une cellule procaryote et une cellule eucaryote.

2.1.3 - Indiquer la famille de parasites à laquelle appartient *Entamoeba histolytica* en précisant son mode de déplacement.

2.2 La toxoplasmose.

Une étude de 1995 a permis de déterminer la prévalence (séroprévalence) en France à 54 % et l'incidence par grossesse à 0,66 pour 100 grossesses.

2.2.1 - Définir incidence et prévalence.

2.2.2 - Citer les principaux aliments sources de contamination.

2.2.3 - Donner les moyens de prévention contre ce parasite.

2.2.4 - Présenter les manifestations cliniques de la toxoplasmose chez l'adulte.

Préciser pourquoi ce problème sanitaire est très important chez la femme enceinte.

DOCUMENT N°1 : RECHERCHE DES SALMONELLA

- 1) On broie 25 g d'aliment solide dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée, puis on incube le broyat pendant 18 H. à 37 °C.
- 2) On introduit 10 mL de broyat dans 100 mL de bouillon sélénite-cystine et 0,1 mL de broyat dans 10 mL de bouillon Rappaport-Vassiliadis (RV) au vert de malachite et chlorure de magnésium. Ces bouillons sont alors incubés 24 H. à 37 °C (bouillon au sélénite) ou 42 °C (bouillon RV).
- 3) On isole chacun de ces bouillons sur deux géloses sélectives : une gélose VB-RP (vert brillant et rouge de phénol) et une autre gélose sélective choisie librement par le laboratoire (par exemple le milieu Rambach)
- 4) Après 24 H. d'incubation, on recherche des colonies suspectes sur ces géloses. Celles-ci sont ensuite identifiées.

DOCUMENT N°2 :**COMPOSITION DES MILIEUX D'ISOLEMENT**Composition du milieu VB-RP
(en g par L)

Peptone	10
Extrait de levure	3
Lactose	10
Saccharose	10
Vert brillant	0,005
Rouge de phénol	0,09
K ₂ HPO ₂	1
NaH ₂ PO ₄	0,6
Agar	12

Composition du milieu Rambach
(en g par L)

Propylène glycol	10
Peptone	5
Extrait de levure	3
Désoxycholate de sodium	1
Rouge neutre	0,03
Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside)	1,5
Agar	15

Rq : le catabolisme du propylène Glycol conduit à une acidification.

Rq : le Xgal est un chromogène dont le produit d'hydrolyse est bleu.

CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DE DIFFÉRENTES BACTÉRIES

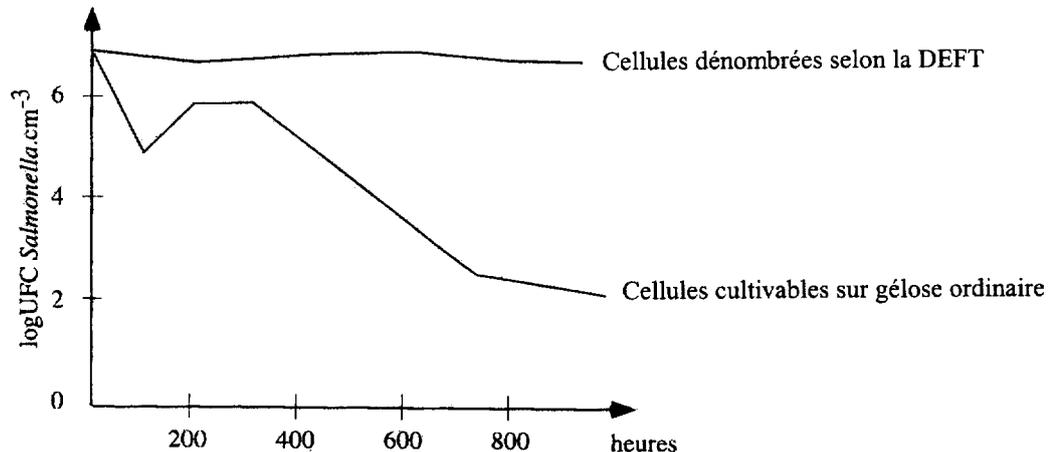
	Saccharose	Lactose	β-galactosidase	Propylène Glycol
<i>Salmonella</i> spp	-	-	-	+
<i>Escherichia</i>	+/-	+	+	-
<i>Proteus</i>	+/-	-	-	-
<i>Morganella</i>	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	-	+/-	+	-/+

DOCUMENT N°3 : EXTRAIT DE LA BASE DE DONNÉES API 20 E

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S
<i>Salmonella Paratyphi A</i>	0	1	0	99	0	5
<i>Salmonella spp</i>	3	69	96	95	75	85

DOCUMENT N°4 : PROFIL BIOCHIMIQUE EXPÉRIMENTAL

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S
-	+	+	+	+	+

DOCUMENT N°5 :

Salmonella incubées en eau de mer, à l'obscurité, à 10°C.

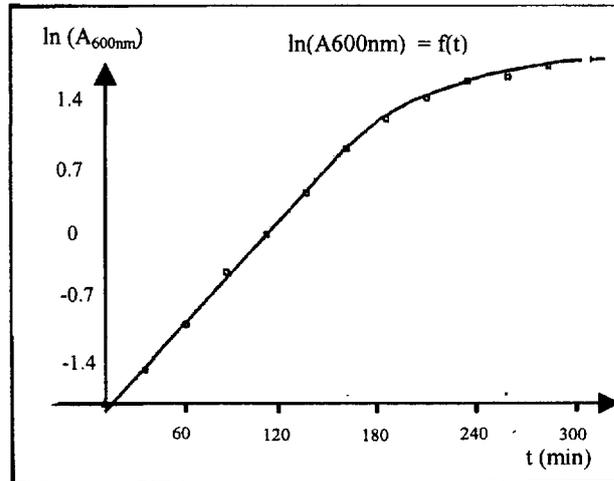
DOCUMENT N°6 :

This kit provides sensitive, single-step, fluorescence-based assays for bacterial cell viability. The assays can be completed in minutes, do not require wash steps and can be applied to bacterial suspensions or bacteria trapped on filters. This kit may be used with a fluorescence microscope or flow cytometer.

The kit utilizes two nucleic acid stains – the green-fluorescent stain and the red-fluorescent stain. These stains differ in their ability to penetrate healthy bacterial cells. When used alone, the green-fluorescent stain labels both live and dead bacteria. In contrast, the red-fluorescent stain penetrates only bacteria with damaged membranes, reducing green fluorescence when both dyes are present. Thus, live bacteria with intact membranes fluoresce green, while dead bacteria with damaged membranes fluoresce red.

**DOCUMENT N°7 : COURBE DE CROISSANCE DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SA2 EN MILIEU TS**

t en minutes	Ln A _{600nm}
0	- 1,83
30	- 1,45
60	- 0,99
90	- 0,443
120	- 0,04
150	0,41
180	0,871
210	1,19
240	1,4
270	1,60
300	1,63
330	1,74
360	1,81



Conditions de culture :

- température = 37°C
- bain thermostaté agité (180 translations par minute)
- 50 mL de milieu TS en erlen de 150 mL