



**LE RÉSEAU DE CRÉATION  
ET D'ACCOMPAGNEMENT PÉDAGOGIQUES**

**Ce document a été mis en ligne par le Canopé de l'académie de Bordeaux  
pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

## 2<sup>ème</sup> JOUR

Durée de l'épreuve : 2 H 15

### 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. Vous prendrez donc soin de bien lire l'ensemble du sujet avant de commencer les manipulations.

**Documents interdits - Calculatrice autorisée**

**ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**  
**Techniques de microbiologie**  
**2<sup>ème</sup> JOUR**

**DÉTECTION DES SALMONELLES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES.**

**1 - Contrôle de l'identité de la souche test de salmonelle. (26 points)**

**1.1 - Matériel et Réactifs :**

- Fiche technique de la galerie API 20 E et logiciel pour l'identification à disposition.
- Plaque de verre.
- Eau physiologique et sérums mélanges ou monovalents pour le sérotypage.
- Tableau de Kauffmann-White et composition des différents sérums (**annexe 3**).

**1.2 - Protocole opératoire.**

Lire la galerie API 20 Eensemencée par la souche test.

Réaliser le sérotypage de la souche à partir de l'isolement sur GN, en s'appuyant sur les documents fournis (**annexe 4**).

On s'arrêtera à la détermination du groupe O.

**Présenter la plaque de sérotypage avec le résultat obtenu à un examinateur.**

**1.3 - Compte rendu.**

Vérifier l'identité de la souche test à l'aide d'un logiciel adapté. Préciser l'indice de typicité et les tests à l'encontre.

Présenter les résultats du sérotypage en précisant la logique de la démarche lors des manipulations. Conclure.

L'ensemble de ces résultats permet-il de valider l'identité de la souche test (*Salmonella Newport*) ?

**2 - Validation de l'étape d'enrichissement sélectif. (37 points)**

**2.1 - Dénombrement des coliformes totaux dans un bouillon RV T<sub>0</sub>. (15 points)**

À l'aide de l'**annexe 4**, déterminer la concentration de coliformes totaux dans le bouillon RV T<sub>0</sub>.

**2.2 - Suivi des l'évolution des deux populations de micro-organismes dans le bouillon RV. (16 points)**

Relier le caractère biochimique lu sur la gélose Mac-Conkey (composition donnée en **annexe 1**) avec chaque population de micro-organismes.

Pour chaque population et chaque bouillon RV, à l'aide de l'**annexe 4**, déterminer les concentrations dans les différents bouillons RV.

Présenter l'ensemble des résultats sous forme d'un tableau.

À l'aide de l'outil informatique, construire un graphique représentant l'évolution des deux populations (unité : UFC.cm<sup>-3</sup>) en fonction du temps (unité : heures).

Interpréter les résultats et conclure.

En déduire les caractéristiques du bouillon RV.

**2.3 - Recherche des *Salmonella* dans RV T<sub>18</sub>. (6 points)**

Décrire l'aspect macroscopique des colonies obtenues sur la gélose SMID<sub>2</sub>.

Interpréter les résultats et conclure.

Fiche technique de la gélose SMID<sub>2</sub> fournie par le centre.

**3 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une  $\beta$ -lactamine vis-à-vis d'une souche de *Salmonella*. (17 points)**

Compléter les tableaux de l'annexe 2.

Indiquer et justifier l'intervalle de valeurs encadrant la CMI de la  $\beta$ -lactamine pour la souche étudiée.

Conclure sur le caractère résistant de la souche test sachant que la c (Concentration Critique inférieure) est égale à 0,4 mg/L.

**Remarque : La c (Concentration Critique inférieure) correspond à la concentration en antibiotique atteinte dans le sang du patient pour une posologie normale.**

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel  
Réseau CANOPE



**ANNEXE 1 - JOUR 2****Milieu Rappaport-Vassiliadis (RV)**

Composants	Quantité pour 1 dm <sup>3</sup>
Peptone de soja	4,5 g
Vert de malachite	36 mg
Chlorure de magnésium	7,2 g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,5 g
Chlorure de magnésium hexahydraté	37,3 g
pH = 5,2	

**Milieu VRBL (Violet Rouge neutre bile lactose)**

Composants	Quantité pour 1 dm <sup>3</sup>
Peptone de viande	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Mélange de sels biliaires	1,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar-agar	13,0 g
pH = 7,4	

**Milieu Mac-Conkey**

Composants	Quantité pour 1 dm <sup>3</sup>
Peptone de caséine	17,0 g
Peptone de viande	17,0 g
Lactose	3,0 g
Chlorure de sodium	10 g
Mélange de sels biliaires	1,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,001 g
Agar-agar	13,5 g
pH = 7,1	

**ANNEXE 3 - JOUR 2****SALMONELLA : SÉROTYPAGE**

Sérum-mélange	Groupes agglutinés	Antigènes O correspondants
OMA	A, B, D, E, L	1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 19, 21, 46
OMB	C, F, G, H	6, 7, 8, 11, 13, 14, 20, 22, 23, 24
OMC	I, J, K, L, M, N, O, P	16, 17, 18, 28, 30, 35, 38

**Tableau 1 : Sérums-mélanges O**

Anti O	Anti H
1,2	a
4,5	b
6,7,8	c
7	d
8	g,m
9	g, p
3, 10, 15	h
10	i
15	k
1, 3, 19	m
11	p
13, 22, 23	r
6, 14, 24	v
	w
	x
	z
	z10
	z15
	2
	5
	6
	7

**Tableau 2 : Sérums « anti O » et « anti H ».**

**ANNEXE 3 - JOUR 2 (SUITE)**

Groupe (Fréquence en France)	Nom Usuel	Antigènes O	Antigènes H	
			Phase 1	Phase2
B(54,3 %)	<i>Typhimurium</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	i	1, 2
	<i>Saintpaul</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12, <u>27</u>	e, h	1, 2
	<i>Brandenburg</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	i, v	e, n, z15
	<i>Agona</i>	<u>1</u> , 4, 12	f, g, s	-
	<i>Bredeney</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	l, v	1, 7
	<i>Derby</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	f, g	[1, 2]
	<i>Heidelberg</i>	<u>1</u> , 4, 12	r	1, 2
	<i>Paratyphi B</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2
	<i>Coeln</i>	4, [5], 12	y	1, 2
	<i>Wien</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	b	l, w
	<i>Abortusovis</i>	4, 12	c	1, 6
	<i>Stanley</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12, <u>27</u>	d	1, 2
	<i>Duisburg</i>	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	d	e, n, z15
	<i>Chester</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	e, n, x
	<i>Reading</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	1, 5
	<i>Essen</i>	4, 12	g, m	-
	C (17,5 %) C1	<i>Virchow</i>	6, 7	r
<i>Infantis</i>		6, 7	r	1, 5
<i>Choleraesuis</i>		6, 7	c	1, 5
<i>Isangi</i>		6, 7	c	1, 5
<i>Livingstone</i>		6, 7	c	l, w
<i>Eimsbuttel</i>		6, 7, <u>14</u>	c	l, w
<i>Montevideo</i>		6, 7	g, m, s	-
<i>Oranienburg</i>		6, 7	m, t	-
<i>Thompson</i>		6, 7	k	1, 5
<i>Paratyphi C</i>		6, 7, [VI]	c	1, 5
C2	<i>Bovismorbificans</i>	6, 8	r	1, 5
	<i>Goldcoast</i>	6, 8	r	l, w
	<i>Newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
	<i>Hadar</i>	6, 8	z10	e, n, x
	<i>Manhattan</i>	6, 8	d	1, 5
	<i>Blockley</i>	6, 8	k	1, 5
	<i>Lichtfilz</i>	6, 8	l; v	1, 2
	<i>Muenchen</i>	6, 8	d	1, 2
D (17,3 %)	<i>Enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	-
	<i>Dublin</i>	1, 9, 12	g, p	-
	<i>Panama</i>	1, 9, 12	l, v	1, 5
	<i>Typhi</i>	9, 12, [VI]	d	-
	<i>Gallinarum</i>	<u>1</u> , 9, 12	-	-
	<i>Strasbourg</i>	9, 46	d, m	1, 7
E (7 %) E1	<i>Anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
	<i>London</i>	3, 10	l, v	1, 6
	<i>Give</i>	3, 10, [15]	l, v	1, 5
	<i>Meleagridis</i>	3, 10	e, h	l, w
	<i>Muenster</i>	3, 10	e, h	1, 5
E4	<i>Senftenberg</i>	1, 3, 19	g, [s], t	-
G (2 %) E1	<i>Kedougou</i>	<u>1</u> , 13, 23	i	l, w
	<i>Worthington</i>	<u>1</u> , 13, 23	z	1, 5
A (0,26 %)	<i>Paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	-

Facteurs entre crochets peuvent être absents sans que le sérotype soit changé  
Facteurs O soulignés : liés à la conversion phagique (lysogénique)

**Tableau 3 : Extrait du tableau de Kauffman-White :  
Formules antigéniques des sérotypes les plus fréquents en France**

**ANNEXE 4 : JOUR 2****Formule normalisée AFNOR**

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times (n_1 + 0,1n_2) d}$$

où :

- c est la somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes considérées ;
- v est le volume de l'inoculumensemencé (en mL) ;
- n<sub>1</sub> est le nombre de boîtes prises en compte à la première dilution ;
- n<sub>2</sub> est le nombre de boîtes prises en compte à la deuxième dilution ;
- d est le facteur de dilution correspondant à la première dilution prise en compte.



## REF 43 291 / 43 299

08542 C - FR - 2002/07

## Gélose SM ID (SM)

IVD

Milieu chromogène pour l'isolement sélectif et la différenciation des *Salmonella*

## INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

La gélose SMID est un milieu d'isolement sélectif et de différenciation destiné à la recherche des *Salmonella* à partir de prélèvements cliniques (selles) (1).

Selon les normes ISO 6579 (5), NF EN 12824 (7) et NF V 08-052 (6), elle peut être utilisée pour la recherche des *Salmonella* dans les produits alimentaires (1).

## PRINCIPE

La coloration des colonies est obtenue grâce à l'association de substrats (3) :

- deux substrats nutritifs hydrocarbonés (sorbitol et glucuronate) combinés à un indicateur coloré (rouge neutre) qui entraîne la coloration en rose des colonies de *Salmonella*.
- deux substrats chromogènes qui entraînent la coloration en bleu des colonies possédant une  $\beta$ -galactosidase ou une  $\beta$ -glucosidase (non *Salmonella*).

	<i>Salmonella</i>		Autres bactéries	
	+	-	+	-
Glucuronate ou sorbitol	+	-	+	-
$\beta$ -galactosidase ou $\beta$ -glucosidase	-	+	+	-
Coloration de la colonie	Rose	Violette	Bleue	Incolore

L'inhibition de la plupart des germes Gram (+) est obtenue par un mélange de sels biliaires et de colorants.

## PRÉSENTATION

Milieux prêts à l'emploi	
REF 43 291	Coffret de 2x10 boîtes (90 mm)
REF 43 299	Coffret de 10x10 boîtes (90 mm)
SM *	

\* imprimé sur chaque boîte

## COMPOSITION

Formule théorique en g/l d'eau purifiée.

Ce milieu peut être ajusté et/ou supplémenté en fonction des critères de performances imposés:

Peptones de caséine et de viande (bovin et porcin).....	6
Extrait de levure.....	2
Sels biliaires (bovin ou ovin).....	4
Rouge neutre.....	0,025
Tampon Tris.....	0,65
Vert brillant.....	0,3 mg
Substrat chromogène 1 (galactopyranoside).....	0,17
Sodium glucuronate.....	12
Substrat chromogène 2 (glucopyranoside).....	0,025
Sorbitol.....	8
Agar.....	13,5

pH 7,6

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Etuve bactériologique.

## REACTIFS COMPLEMENTAIRES

- Bouillon Sélénite F (Réf. 42 099 ou 51 017).
- Bouillon Rappaport (Réf. 42 091).

## PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.

- Pour usage professionnel uniquement.

Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).

- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation; se référer à "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue, Approved Guideline* - December 1997". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, HHS Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993)", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.

- Les milieux de culture ne doivent pas être utilisés comme matériau ou composant de fabrication.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas utiliser des boîtes contaminées ou exsudées.
- Les performances présentées ont été obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut modifier les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques et éventuellement des résultats d'autres tests.
- L'utilisation du milieu peut être délicate pour des personnes ayant des difficultés d'appréciation des couleurs.

## CONDITIONS DE STOCKAGE

- Les boîtes se conservent entre 2°C et 8°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
- Conserver à l'abri de la lumière.
- La durée de conservation des boîtes hors du coffret, en sachet cellophane, est de 2 semaines à 2-8°C.



**ECHANTILLONS****Utilisation en bactériologie médicale :**

Le milieu est directementensemencé à partir de selles liquides, d'une suspension de selles (en eau physiologique stérile) ou d'un bouillon d'enrichissement. Il convient de respecter les bonnes pratiques en terme de prélèvements et de transport.

**Utilisation en bactériologie alimentaire :**

Suivre les recommandations des normes en vigueur pour la réalisation des prélèvements et la préparation des échantillons.

**MODE OPERATOIRE****Utilisation en bactériologie médicale :**

La recherche de *Salmonella* dans les selles grâce à la gélose SMID peut se faire suivant le schéma habituel de la coproculture :

1. Laisser les boîtes revenir à température ambiante.
2. Ensemencer la gélose SMID directement à partir des selles ou après enrichissement en bouillon Rappaport ou Sélénite F.
3. Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C en aérobiose. Le choix de la température d'incubation est de la responsabilité de l'utilisateur en fonction de l'application et des normes en vigueur. Les cultures sont examinées après 24 heures d'incubation.

**Utilisation en bactériologie alimentaire :**

Ce milieu est parfaitement adapté à l'application simplifiée du protocole normalisé NF ISO 6579 et NF-EN 12824 pour la recherche des *Salmonella* dans les produits alimentaires.

Dans ce cas, l'isolement sur SM ID est réalisé après pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée et enrichissement en milieu Rappaport-Vassiliadis et Sélénite Cystine.

En cas d'application intégrale du protocole NF ISO 6579 ou NF-EN 12824, ce milieu peut être utilisé comme second milieu d'isolement en complément de la gélose XLD, Hektoen ou Vert Brillant modifiée.

1. Laisser les boîtes revenir à température ambiante.
2. Ensemencer l'échantillon pré-enrichi.
3. Incuber à l'étuve, couvercle en bas, entre 35 et 37°C en aérobiose.  
Les cultures sont examinées généralement après 18 à 24 heures d'incubation.

Ce milieu a été validé pour la détection des *Salmonella* par culture après immunoconcentration en VIDAS ICS et pour la confirmation des résultats positifs obtenus par VIDAS SLM.

**LECTURE ET INTERPRETATION**

- Après incubation, observer la croissance bactérienne.
- Noter la présence de colonies caractéristiques de *Salmonella* : colonies roses, présentant parfois un contour incolore.
- L'identification du ou des micro-organismes isolés doit être poursuivie par des tests biochimiques et immunologiques.

**CONTROLE DE QUALITE****Protocole :**

La fertilité du milieu peut être testée vis-à-vis de la souche suivante:

- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

**Résultats attendus :**

Souche	Résultats à 33-37°C	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Croissance en 24 heures	Colonies roses

**Remarque :**

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de prendre en compte la nature de l'application et la législation locale en vigueur pour la mise en oeuvre du contrôle de qualité (fréquence, nombre de souches, température d'incubation...).

**LIMITES DU TEST**

- Une durée d'incubation supérieure à 24 heures peut entraîner une réalcalinisation du milieu qui modifie la coloration des colonies.
- La gélose SM ID a été évaluée sur les principales matrices alimentaires et sur un grand nombre de souches bactériennes. Compte tenu de la diversité des produits alimentaires, des procédés de fabrication et de la flore microbienne, il peut être nécessaire de vérifier que la gélose SM ID est bien adaptée à la spécificité des produits à tester.
- Certains sérotypes de *Salmonella* (habituellement non isolés chez l'homme) en particulier *S. arizonae*, *S. pullorum*, *S. gallinarum* peuvent donner des colonies non caractéristiques.
- Certaines entérobactéries autres que *Salmonella* peuvent présenter des colonies caractéristiques. Il est donc nécessaire de réaliser une identification complète par des tests complémentaires.
- Le développement est fonction des exigences propres à chaque micro-organisme. Il est donc possible que certaines souches de *Salmonella* ayant des exigences spécifiques ne se développent pas.
- En fonction des prélèvements analysés, il est recommandé d'associer la gélose SM ID avec des milieux complémentaires destinés à la coproculture (par exemple géloses Campylosel, Yersinia, Clostridium difficile ...).

**PERFORMANCES**

Les performances ont été évaluées, à 37°C, sur 76 *Salmonella* et 185 autres souches bactériennes Gram (-) et Gram (+).

**Fertilité :**

Les 76 souches de *Salmonella* testées se sont développées dès 24 heures. Les 70 souches  $\beta$ -galactosidase (-) ont donné des colonies roses en 24 heures. Les 6 souches  $\beta$ -galactosidase (+) ont donné des colonies non caractéristiques.

172 des 177 autres souches de bactéries Gram (-) testées ont également présenté une croissance après 24 heures. Parmi celles-ci, 37 souches ont présenté des colonies roses.

**Sélectivité :**

Les 8 souches Gram (+) testées ont été inhibées en 48 heures.







**ELIMINATION DES DECHETS**

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. DAVIES R.H., WRAY C. – Evaluation of SMID agar for identification of salmonella naturally contaminated veterinary samples - *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, vol. 18, p. 15-17.
2. MANAFI M., WILLINGER B. – Comparison of three rapid methods for identification of *Salmonella* spp. – *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, vol. 19, p. 328-331.
3. PIGNATO S., GIAMMANCO G., GIAMMANCO G et al. – Rambach agar and SM-ID medium sensitivity for presumptive identification of *Salmonella* subspecies I-VI. – *J. Med. Microbiol.*, 1995, vol. 43, p. 68-71.
4. RUIZ J., NUNEZ M.L., DIAZ J et al. – Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. – *J. Clin. Microbiol.*, Mar. 1996, vol. 34, p. 686-688.
5. *Microbiologie. Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonella* – NF ISO 6579 - Déc 93 – AFNOR – ISSN 0335-3931
6. *Microbiologie des aliments. Recherche des Salmonella. Méthode de routine* – NF V 08-052 - Mai 97 - AFNOR – ISSN 0335-3931
7. *Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella* – NF EN 12824 – Fév. 98 – AFNOR – ISSN 0335-3931.

**TABLE DES SYMBOLES**

Symbole	Signification
REF	Numéro de référence
IVD	Pour usage "in vitro"
	Fabricant
	A conserver entre X - Y°C
	Date de péremption
LOT	Numéro de lot
	Se reporter aux instructions d'utilisation
	Conserver à l'abri de la lumière
	Pour <X> tests.



**bioMérieux® sa**  
au capital de 11 879 045 €  
673 620 399 RCS LYON

69280 Marcy-l'Etoile / France  
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

**CE**  
Imprimé en France

Le logo est une marque déposée et protégée qui est la propriété exclusive de bioMérieux sa ou de l'une de ses filiales.