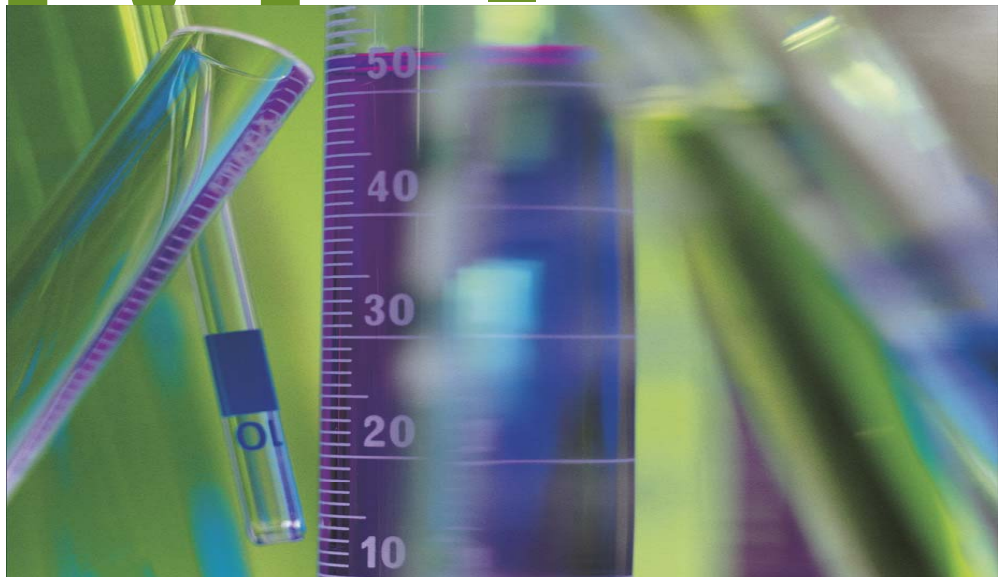


M

Méthodes de laboratoire

Méthode d'échantillonnage et d'identification de bactéries et de moisissures par la méthode de prélèvements de surface

MÉTHODE ANALYTIQUE 343



Applicabilité

Cette méthode est utilisée pour échantillonner et identifier des microorganismes à partir d'une surface.

Norme(s)¹

Aucune norme.

Système d'échantillonnage

Éponge stérile.

Volume et débit d'échantillonnage recommandés

N.A.

Analyse

Microscopie et chromatographie en phase gazeuse.

Valeur minimale rapportée (VMR)

N.A.

Domaine d'application

N.A.

Fidélité

N.A.

Incertitude analytique (CV_A)

N.A.



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

Mission *travaillent pour vous !*

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : 1-877-221-7046

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales
2009
ISBN : 978-2-89631-280-1 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
2009

Méthodes de laboratoire

Méthode d'échantillonnage et d'identification de bactéries et de moisissures par la méthode de prélèvements de surface

MÉTHODE ANALYTIQUE 343

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document.

En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Les méthodes d'analyses ou d'étalonnage sont celles mises au point ou retenues par l'IRSST pour l'exécution de ses différents mandats. Elles peuvent requérir l'utilisation de matériels, d'opérations ou d'équipements dangereux. Ces méthodes n'ont pas pour but de mentionner tous les problèmes de sécurité associés avec leur utilisation. C'est la responsabilité de l'utilisateur d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées. L'utilisation des données incluses dans ces méthodes se fera aux seuls risques de l'utilisateur : l'IRSST se dégage de toute responsabilité relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de telle utilisation et de telle application. Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication

Responsable technique de la méthode

*Geneviève Marchand, Ph.D.
microbiologiste, Services et expertises de laboratoire*

Approbation

*Geneviève Marchand, Ph.D., microbiologiste,
Marie-Claude Barrette, M.Sc., chimiste,
responsable du programme d'assurance qualité
et Jacques Lesage, M.Sc., chimiste, directeur,
Services et expertises de laboratoire, IRSST*

Autorisation pour publication

*Marie Larue, M.Sc. Présidente-directrice générale
Présidence-direction générale, IRSST*



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.
www.irsst.qc.ca

Ce document technique a été financé par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSS

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

TABLE DES MATIÈRES

Préambule	1
1. Principe de la méthode.....	2
2. Interférences	2
3. Matériel	2
3.1 Échantillonnage	2
3.2 Laboratoire	2
4. Réactifs.....	3
5. Échantillonnage	3
5.1 Protocole de Prélèvement	3
5.2 Transport	3
6. Protocole analytique.....	4
6.1 Extraction des microorganismes	4
6.2 Isolement d'une culture	4
6.3 Identification d'un microorganisme	4
7. Paramètres d'application	4
7.1 Limite de détection et limite de quantification	4
7.2 Fidélité	4
7.3 Exactitude	4
7.4 Incertitude de mesure	4
8. Santé et sécurité	5
8.1 Déversement mineur	5
8.2 Déversement majeur	5
9. Références.....	5
10. Bibliographie.....	5

Préambule

La [Loi sur la santé et la sécurité du travail](#) au Québec a comme objet l'élimination à la source des dangers pour la santé, la sécurité et l'intégrité physique des travailleurs. Des valeurs d'exposition admissibles (VEA) aux substances chimiques ont été fixées à l'annexe 1 du [Règlement sur la santé et la sécurité de travail](#) (RSST). L'article 44 de ce règlement intitulé « *Méthodes* » spécifie que :

« ... Ces gaz, ces fumées, ces vapeurs, ces poussières et ces brouillards présents dans le milieu de travail doivent être prélevés et analysés de manière à obtenir une précision équivalente à celle obtenue en appliquant les méthodes décrites dans le Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail publié par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail ... »

Pour atteindre ces objectifs, des méthodes d'analyse visant à quantifier le degré d'exposition des travailleurs sont développées et rédigées pour implanter les moyens de contrôle adéquats. Afin d'assister les intervenants en milieu de travail, l'IRSST publie, révisé périodiquement et diffuse le [Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail](#) et la direction Services et expertises de laboratoire publie des méthodes d'analyses des contaminants.

Ces méthodes doivent être utilisées de concert avec les références réglementaires et normatives suivantes :

- ✓ *Loi sur la santé et la sécurité du travail*. L.R.Q., chapitre S-2.1. Éditeur officiel du Québec, (1^{er} août 2007). http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/S_2_1/S2_1.html
- ✓ *Règlement sur la santé et la sécurité du travail*. S-2.1, r.19.01, Décret 885-2001. Éditeur officiel du Québec (25 juillet 2007). http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=%2F%2FS_2_1%2FS2_1R19_01.htm
- ✓ *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail*. Direction des opérations, IRSST, T-06 Guide technique, Montréal, Québec, (mars 2005). <http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/T-06.pdf>
- ✓ NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health .
- ✓ ISO Guide 30, Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence, 2^e édition, 1992.
- ✓ ISO, Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie, 2^e édition, 1993.
- ✓ American Industrial Hygiene Association (AIHA), organisme qui accrédite le laboratoire de l'IRSST dans le domaine de l'analyse des contaminants chimiques en milieu de travail et pour l'analyse environnementale microbiologique.

Par ailleurs, toute la terminologie utilisée dans cette méthode est décrite dans l'instruction de travail « I-G-014 » du système de gestion documentaire associée au système qualité de l'IRSST.

1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La surface suspectée d'être contaminée par des moisissures est prélevée sur une éponge. L'échantillon ainsi prélevé est soumis à des examens microbiologiques pour en déterminer l'identité.

2. INTERFÉRENCES

Cette méthode permet de déterminer la présence ou l'absence de la bactérie recherchée dans le prélèvement effectué. Elle ne permet pas un dénombrement des bactéries pathogènes, mais seulement une détection de leur présence.

La présence de désinfectant sur la surface à prélever peut également provoquer une interférence malgré l'utilisation du tampon neutralisant qui ne peut neutraliser tous les types de désinfectants et toutes les concentrations résiduelles.

Un système d'échantillonnage témoin sert à vérifier les possibilités de contamination durant l'ensemble du processus analytique sauf à l'étape de prélèvement.

3. MATÉRIEL

3.1 Échantillonnage

Trousse de prélèvement contenant une éponge humectée d'un tampon neutralisant (pour neutraliser les désinfectants ayant des effets bactéricides et bactériostatiques), des gants stériles et un sac refermable.

3.2 Laboratoire

- ✓ Géloses :
 - Trypticase de soya
 - Extrait de malt
 - Autres selon les besoins
- ✓ Tige bouclée
- ✓ Microscope à lumière transmise muni d'un contraste de phase
 - Oculaire 12,5X
 - Objectifs 10X, 40X, 60X et 100X
- ✓ Lame et lamelle
- ✓ Stéréomicroscope 20X-120X
- ✓ Source lumineuse à fibre optique
- ✓ Chromatographe en phase gazeuse avec colonne de silice fondue
- ✓ Base de données « *Sherlock* »
- ✓ Base de données « *Biolog* »
- ✓ « *Stomacher* »
- ✓ Pipette
- ✓ Embouts stériles
- ✓ Réfrigérateur à température constante (4°C ± 3°C)

- ✓ Incubateur (25°C ± 2°C)
- ✓ Autoclave (121°C, 15 PSI)
- ✓ Hotte à flux laminaire
- ✓ Gants

4. RÉACTIFS

- ✓ Eau peptonée 0,01% stérile
- ✓ Tween 20

5. ÉCHANTILLONNAGE

La surface suspectée d'être contaminée par des microorganismes est prélevée à l'aide d'une éponge stérile selon le protocole décrit en 5.1. Le changement de gants entre chaque échantillonnage est important afin d'éviter les contaminations d'un autre lieu avec celui tout juste échantillonné. Des manipulations favorisant l'asepsie sont utilisées.

5.1 Protocole de Prélèvement

- 5.1.1 Ouvrir une enveloppe contenant une éponge
- 5.1.2 Découvrir une partie de l'éponge et la saisir à l'aide de gants stériles sans toucher à l'enveloppe
- 5.1.3 Frotter vigoureusement l'éponge sur la surface à échantillonner. S'il y a trop de liquide, presser l'éponge et récupérer le liquide extrait de façon aseptique et le déverser dans le sac refermable
- 5.1.4 Couvrir la plus grande surface possible jusqu'à 1 m²
- 5.1.5 Ouvrir le sac refermable de façon à pouvoir introduire l'éponge sans toucher l'intérieur du sac
- 5.1.6 Fermer le sac de façon hermétique
- 5.1.7 Enlever et jeter les gants

5.2 Transport

Faire parvenir au laboratoire le plus tôt possible (l'analyse doit être effectuée dans les 24 à 48 heures suivant le prélèvement).

Fournir un témoin pour chaque série de prélèvement.

Pour plus de détails sur la préparation du matériel d'échantillonnage, l'étalonnage et la stratégie utilisée, se référer au Guide d'échantillonnage de l'IRSST¹.

6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

6.1 Extraction des microorganismes

- 6.1.1 Ajouter 5 à 20 mL, c'est-à-dire un volume minimal d'eau peptonée 0,01% stérile additionnée de 0,05% Tween 20, directement dans le sachet contenant l'éponge.
- 6.1.2 Agiter 30 secondes avec le Stomacher.
- 6.1.3 Diluer l'échantillon 1 :10 pour obtenir une solution d'extraction dont les concentrations attendues sont entre 30 et 300 colonies sur chaque milieu de croissance². Étaler au moins trois dilutions. Le volume d'étalement est de 100 µL. Chaque concentration est étalée en triplicata. Les pétris sont incubés aux températures requises pour la croissance des microorganismes recherchés après l'étalement.

6.2 Isolement d'une culture

Faire le repiquage en culture pure de toutes les colonies de types différents retrouvées sur le pétri d'origine.

6.3 Identification d'un microorganisme

- 6.3.1 Pour l'identification des bactéries, vous référez à la méthode IRSST MA-341
- 6.3.2 Pour l'identification des moisissures, vous référez à la méthode IRSST MA-340

7. PARAMÈTRES D'APPLICATION

7.1 Limite de détection et limite de quantification

Non applicable

7.2 Fidélité

Non applicable

7.3 Exactitude

Non applicable

7.4 Incertitude de mesure

Non applicable

8. SANTÉ ET SÉCURITÉ

8.1 Déversement mineur

Lors d'un petit déversement (quelques pétris) de microorganismes, le technicien doit mettre un produit désinfectant (alcool, eau de javel...) sur la surface contaminée. Recouvrir ensuite, puis quitter le laboratoire pendant environ trente (30) minutes pour que les particules se déposent. Mettre une affiche sur la porte du laboratoire afin d'en limiter l'accès si nécessaire. Après ce trente minutes, bien nettoyer la surface. Il faut autoclaver tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant.

8.2 Déversement majeur

Lors d'un gros déversement (plusieurs pétris), le technicien doit sortir du laboratoire, mettre une affiche sur la porte pour limiter l'accès au laboratoire, puis aviser le professionnel responsable et son supérieur. Après 30 minutes d'attente pour que les particules se soient déposées, il faut mettre un produit désinfectant (alcool, eau de javel ...) sur la surface contaminée et recouvrir pour laisser agir. Après une trentaine de minutes, bien nettoyer la surface contaminée. Il faut autoclaver tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant. **Le port d'un masque N-95 est nécessaire lors du nettoyage.** Selon l'ampleur du déversement, le professionnel responsable pourrait demander que toutes les surfaces (murs, comptoirs, planchers...) ayant possiblement été en contact avec le contaminant soient décontaminées.

9. RÉFÉRENCES

- 1 *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail.* Direction des opérations, IRSST, T-06 Guide technique, Montréal, Québec, (Février 2005).
<http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PublIRSST/T-06.pdf>
- 2 *Microbiological Methods*, Collins, C.H., Sixth Edition, Butterworths, London. 409p. 1989.

10. BIBLIOGRAPHIE

- 1 *Assessing Bioaerosols in indoor Environment*, ACGIH, Sponsored by the University of Michigan and ACGIH, Oct. 4-8, 1988, Ann Arbor, Michigan.
- 2 *Manual of Environmental Microbiology*, HURST, C.J., et al., ASM Press, 1997, 894 p.