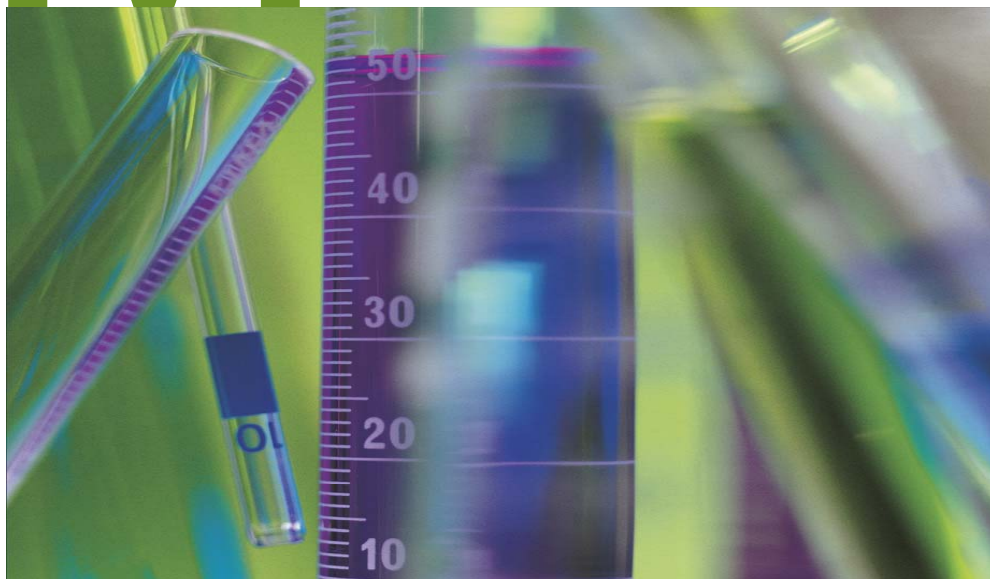


M

Méthodes de laboratoire

Identification des bactéries cultivables

MÉTHODE ANALYTIQUE 341



Applicabilité

Cette méthode est utilisée pour identifier des bactéries cultivables.

Norme(s)¹

Aucune norme.

Système d'échantillonnage

Matrices multiples.

Volume et débit d'échantillonnage recommandés

N.A.

Analyse

Stéromicroscopie à fibre optique, microscopie à la lumière transmise, 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 : 978-2-89631-346-4 (PDF)

ISBN : 978-2-89631-255-9 (1^{re} édition, 2008)

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

Identification des bactéries cultivables

MÉTHODE ANALYTIQUE 341

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, IRSST*

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	4
1. Principe de la méthode.....	5
2. Interférences	5
3. Matériel	5
4. Réactifs.....	5
5. Échantillonnage	6
6. Protocole analytique.....	6
7. Paramètres d'application	7
7.1 Limite de détection et limite de quantification	7
7.2 Fidélité	7
7.3 Exactitude	7
7.4 Incertitude de mesure	7
8. Contrôle de qualité	7
8.1 Contrôle inter laboratoire	7
8.2 Contrôle des produits utilisés	7
9. Santé et sécurité	8
10. Références.....	8
11. Bibliographie.....	8

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

Isoler en culture pure des colonies de bactéries. Procéder à leur identification à partir de caractérisations macro et microscopiques, du profil en acide gras (méthode IRSST-344) ainsi que de tests biochimiques.

2. INTERFÉRENCES

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- ✓ La rencontre des conditions de croissance des microorganismes à leur développement ;
- ✓ Une surpopulation ;
- ✓ L'envahissement de microorganismes sur un pétri qui rend l'isolement difficile ;
- ✓ L'obtention d'une culture pure de chaque colonie.^{[1](#)}

3. MATÉRIEL

- ✓ Géloses :
 - Trypticase de soya
 - Autres selon les besoins
- ✓ Tige bouclée
- ✓ Microscope à lumière transmise muni d'un contraste de phase
- ✓ Oculaire 10X ou 12,5X
- ✓ Objectifs (ex :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 informatique « *Sherlock* »
- ✓ Base de données informatique « *Biolog* »
- ✓ Réfrigérateur à température constante ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)
- ✓ Incubateur ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- ✓ Autoclave (121°C , 15 PSI)
- ✓ Hotte à flux laminaire

4. RÉACTIFS

- ✓ Eau stérile
- ✓ Coloration de GRAM
- ✓ Produits « *Biolog* »
- ✓ Réactifs oxydase
- ✓ Réactifs catalase
- ✓ Huile à immersion

5. ÉCHANTILLONNAGE

Non applicable

6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

- 6.1 Faire le repiquage, en culture pure, de toutes les colonies différentes retrouvées sur le pétri d'origine.
- 6.2 Confirmer la pureté de la colonie au stéréomicroscope. Si une culture mixte est identifiée, il faut tenter à nouveau l'isolement des colonies présentes. Il faut s'assurer de ne pas doubler l'identification d'un isolement déjà réalisé à partir du pétri de départ. Bien comparer les repiquages avec la colonie de départ.
- 6.3 D'autres milieux de culture peuvent être utilisés pour faciliter l'identification de certains genres.
- 6.4 Pour chaque colonie isolée en culture pure, vérifier les caractéristiques macroscopiques de la colonie (dimension, couleur, texture, pigmentation du milieu, etc.).
- 6.5 Un montage humide effectué à l'aide de l'eau peptonée permet de vérifier les caractéristiques microscopiques de la bactérie décrites dans les livres de référence ²⁻³.
- 6.6 Un test d'oxydase permet de vérifier la présence du cytochrome C caractéristique à certains genres bactériens.
- 6.7 Une coloration de Gram permet de différencier entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif.
- 6.8 Selon les résultats des tests biochimiques, faire une analyse du profil en acide gras ou une analyse par tests biochimiques, tel que décrit ci-dessous :
 - 6.8.1 En présence d'un **Gram positif ou d'un Gram négatif à l'oxidase positive**, effectuer l'analyse du **profil en acides gras** selon la méthode IRSST 344.
 - 6.8.2 En présence d'un **Gram négatif à l'oxidase négative**, effectuer une identification à partir des plaques d'identification de **BIOLOG** ou **Microscan** ou d'autres systèmes d'identification pour vérifier les caractéristiques biochimiques de la souche à identifier. Effectuer une inoculation des plaques en suivant les recommandations du manufacturier pour inoculer, et lire les réactions biochimiques ⁴.

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. CONTRÔLE DE QUALITÉ

8.1 Contrôle inter laboratoire

Un contrôle de qualité interlaboratoires est effectué avec l'AIHA (American Industrial Hygiene Association). Les échantillons sont acheminés au laboratoire à trois reprises à chaque année. Chaque série d'échantillons contient au moins trois inconnus de bactéries qui nous proviennent sous forme lyophilisée. Dans certains envois, des échantillons d'eau ou de poussières contenant une ou plusieurs bactéries doivent également être traités.

8.2 Contrôle des produits utilisés

8.2.1 Un contrôle de qualité est effectué pour chaque coloration de Gram. Les lames utilisées pour réaliser les colorations de Gram sont inoculées avec une bactérie à Gram positif et une à Gram négatif. La coloration obtenue doit correspondre à celle attendue.

8.2.2 Un contrôle de qualité est réalisé sur les plaques d'identification *BIOLOG* ou autres pour chaque nouveau lot reçu. Des souches pour contrôle de qualité sont inoculées dans les plaques d'identification respectives. Les réactions biochimiques sont connues pour ces microorganismes et les résultats doivent correspondre aux réactions attendues.

9. SANTÉ ET SÉCURITÉ

9.1 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.

9.2 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 toute les surfaces (murs, comptoirs, béciers...) ayant possiblement été en contact avec le contaminant soient décontaminées.

10. RÉFÉRENCES

1. *Microbial Identification System*, Operating manual, Version 6, MIDI Inc., Newark, Delaware, 1998.
2. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. et Williams, S.T., Ninth edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Murray, R.G.E., Brenner, J.D., Bryant, M.P., Holt, G.J., Krieg, R.N., Moulder, J.W., Pfennig, N., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Mair, N.S., Sharpe, M.E. et Williams, S.T., vol 1 et 2, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
4. Manuel d'utilisation des plaques d'identification et manuel contrôle de qualité, *BIOLOG*.

11. BIBLIOGRAPHIE

1. *Microbiological Methods*, Collins, C.H., Sixth Edition, Butterworths, London. 409p. 1989.
2. *Assessing Bioaerosols in Indoor Environment Workshop*, sponsored by the University of Michigan and ACGIH, Oct. 4-6 1988, Ann Arbor, Michigan.