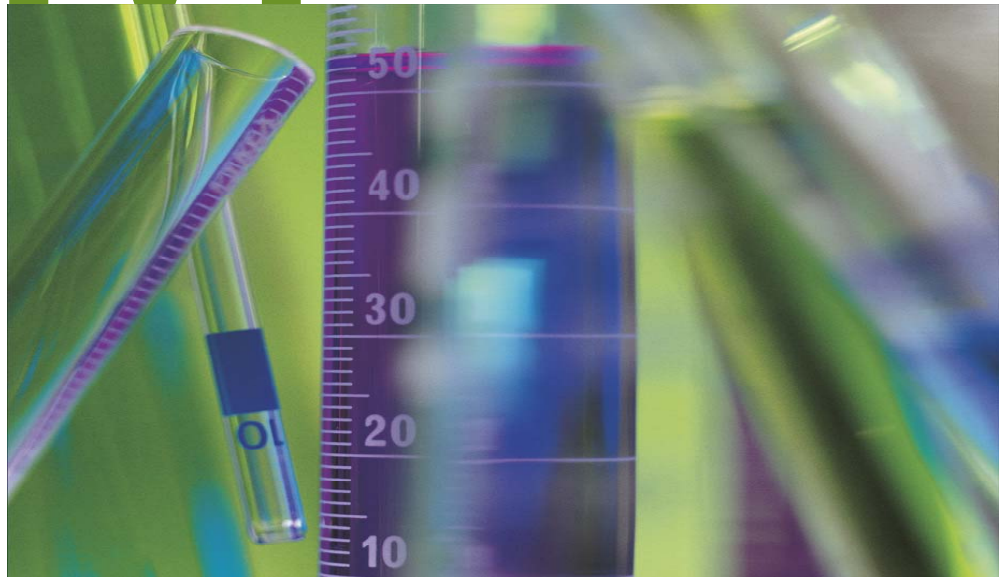


M

Méthodes de laboratoire

Évaluation de structures mycologiques par examen microscopique

MÉTHODE ANALYTIQUE 360



Applicabilité

Cette méthode est utilisée pour l'évaluation semi-quantitative des structures mycologiques.

Norme(s)¹

Aucune norme.

Système d'échantillonnage

Lame autoadhésive, éponge stérile et contenant stérile.

Volume et débit d'échantillonnage recommandés

N.A.

Analyse

Microscopie à la lumière transmise.

Valeur minimale rapportée (VMR)

N.A.

Domaine d'application

N.A.

Fidélité

3,6 % répliquabilité; 6,4 % répétabilité.

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
2007
ISBN : 978-2-89631-196-5 (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
sac.labo@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
2007

Méthodes de laboratoire

Évaluation de structures mycologiques par examen microscopique

MÉTHODE ANALYTIQUE 360

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

*Alain Lajoie, M.Sc., directeur
Direction de la recherche et de l'expertise, IRSST*

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



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
4. Réactifs.....	3
5. Échantillonnage	3
6. Protocole analytique.....	3
6.1 Préparation des solutions	3
6.2 Préparation des échantillons	3
6.3 Analyse	4
7. Paramètres d'application	5
7.1 Limite de détection et limite de quantification	5
7.2 Fidélité	5
7.3 Exactitude	5
7.4 Incertitude de mesure	5
8. Références.....	5
9. Bibliographie.....	6

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. L'échantillon ainsi prélevé est soumis à un examen microscopique.

Cette méthode est limitée à la confirmation d'une croissance visible de moisissures.

2. INTERFÉRENCES

La méthode d'analyse au laboratoire est réalisée par examen microscopique à lumière transmise. La densité mycologique présente, ainsi que l'opacité de l'échantillon peuvent influencer la capacité de détection des structures mycologiques. Le prélèvement d'une quantité importante de poussière ou de matériel peut masquer la présence des structures mycologiques et résulter en un faux négatif ou en un échantillon non analysable.

Une évaluation de la densité de débris est enregistrée dans le cahier de manipulation. Elle peut être notée de la façon suivante :

- 0 : Aucun débris.
- 1 : Quantité faible en débris \Rightarrow Aucune interférence.
- 2 : Quantité importante de débris \Rightarrow Interférence possible. Interpréter avec précaution.
- 3 : Trop de débris \Rightarrow Analyse impossible. Échantillon inadéquat.

3. MATÉRIEL

- ✓ Microscope à lumière transmise muni d'un contraste de phase
- ✓ Oculaire 12,5X
- ✓ Objectif 40X
- ✓ Objectif 100X
- ✓ Lame et lamelle
- ✓ Tube à centrifuger stérile 50mL en plastique
- ✓ Stéréo microscope 20X-120X
- ✓ Source lumineuse à fibre optique
- ✓ Maxi-Vortex
- ✓ Centrifugeuse de table
- ✓ Réfrigérateur
- ✓ Compteur manuel
- ✓ Pince pouvant être stériliser
- ✓ Pipettes jetables stérilisée
- ✓ Pipette et embout stériles
- ✓ Autoclave

4. RÉACTIFS

- ✓ Eau peptonée 0,01% stérile (BBL 299111)
- ✓ Tween 20
- ✓ Acide lactique avec bleu coton

5. ÉCHANTILLONNAGE

La surface suspectée d'être contaminée par des moisissures est prélevée soit :

1. avec une lame-autoadhésive qui est appliquée directement sur la région cible;
2. avec une éponge stérile, utilisée pour prélever la région cible;
3. en prélevant une partie de la région cible avec des d'outils désinfectés à l'alcool (échantillon de procédé).

Il n'est pas nécessaire de fournir un témoin.

Éviter de prélever des surfaces friables avec les lames autoadhésives car elles doivent conserver une certaine transparence.

Utiliser des contenants propres pour le transport des échantillons (ex. : pot utilisé pour les échantillons d'urine, sac « sandwich »).

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 Préparation des solutions

- ✓ Solution d'extraction pour éponge stérile et échantillons de procédé :

Préparer une solution d'eau peptonée 0,01% (BBL) stérile additionnée de Tween 20 à une concentration finale de 0,05%. Cette solution favorise le bris des agrégats de spores qui pourraient être présents dans l'échantillon.

6.2 Préparation des échantillons

Pour les échantillons sur lames, faire un montage humide avec de l'acide lactique et du bleu coton directement sur l'échantillon.

Pour les éponges, ajouter un volume de 10 à 100 mL de la solution d'eau peptonée stérile 0,01% additionnée de Tween 20 directement dans le contenant de transport de l'échantillon.

Pour les échantillons de procédés, transférer une fraction de l'échantillon dans un tube à centrifuger stérile de 50 mL et ajouter 5 à 20 mL de la solution d'eau peptonée stérile 0,01% additionnée de Tween 20.

6.3 Analyse

6.3.1 Examen semi-quantitatif des lamelles auto-collantes :

- 6.3.1.1 Pour chaque lame, une observation à faible grossissement (100X-200X) est réalisée afin d'identifier les régions de la lame qui contiennent du matériel mycologique.
- 6.3.1.2 L'analyse à 400X-600X de la lame se concentre sur la ou les régions qui ont été identifiées comme ayant du matériel présent. Si aucune région ne peut être identifiée, la lame entière est balayée pour l'analyse.
- 6.3.1.3 Chaque champ contenant une structure mycologique est compté comme étant positif.
- 6.3.1.4 Un pourcentage de champs positifs est compté par rapport au nombre total de champs jusqu'à un maximum de 100 champs au total OU de 31 champs positifs.
- 6.3.1.5 Les résultats semi-quantitatifs sont rapportés selon les critères suivants :

RÉSULTATS RENDUS	POURCENTAGE
Négligeable	0 à 5 %
+	6 à 30 %
++	31 à 60 %
+++	61 à 100 %

6.3.2 Examen des microorganismes contenus dans une éponge stérile

Lorsque possible, l'examen d'un premier montage humide entre lame et lamelle est réalisé directement à partir de l'échantillon. Si le résultat est négatif, une extraction est réalisée. L'extraction des microorganismes contenus dans une éponge stérile s'effectue à l'aide d'eau peptonée. Le contenant dans lequel est transportée l'éponge sert de contenant pour l'extraction. De 10 mL à 100 mL de la solution d'eau peptonée stérile 0,01% additionnée de 0,05% Tween 20 est ajouté au sac selon la charge microbienne estimée du prélèvement et une extraction par pétrissage est réalisée. La suspension obtenue est placée entre lame et lamelle et est examinée au microscope afin de déterminer la présence de structures mycologiques. Avant d'enregistrer l'échantillon comme n'ayant pas de structures mycologiques (i.e. suspension négative), au moins 5 montages entre lame et lamelle sont effectués.

6.3.3 Examen des microorganismes contenus dans une matrice solide (échantillons de procédés)

Lorsque possible, l'examen d'un premier montage humide entre lame et lamelle est réalisé directement à partir de l'échantillon. Si le résultat est négatif, une extraction est réalisée. L'extraction des microorganismes contenus dans une matrice solide s'effectue à l'aide d'eau peptonée. Si la matrice le permet, la matière solide est transférée dans des bouteilles stériles contenant 5 à 20 mL de la solution d'eau peptonée stérile 0,01% additionnée de 0,05% Tween 20. Les bouteilles sont agitées au maxi-vortex pour 20 minutes. La suspension obtenue est placée entre lame et lamelle et est examinée au microscope afin de déterminer la présence de structures mycologiques. Avant d'enregistrer l'échantillon comme n'ayant pas de structures mycologiques (i.e. suspension négative), au moins 5 montages entre lame et lamelle sont effectués.

7. PARAMÈTRES D'APPLICATION

7.1 Limite de détection et limite de quantification

Non évaluées.

7.2 Fidélité

La répétabilité de la méthode semi-quantitative a été évaluée à 6,4 %. La première évaluation a été effectuée à l'aide de 9 lames provenant du terrain (4 niveaux de concentration, 6 réplicats par lame), et ce, par un analyste. La seconde évaluation a été effectuée par l'analyse de 45 lames terrains de 4 niveaux différents, et ce, par 3 analystes. La valeur rapportée de 6,4 % correspond à la moyenne des deux évaluations. D'autre part, la réplicabilité a été évaluée à 3,6 %.

7.3 Exactitude

À venir.

Le laboratoire réalise un contrôle de qualité intra-laboratoire. Au moins 5 % des échantillons sont analysés en duplicata afin de calculer le RDP (pourcentage de différence relative).

7.4 Incertitude de mesure

Non évaluée.

8. 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/PubIRSST/T-06.pdf>

9. BIBLIOGRAPHIE

- 2 ACGIH. *Assessing Bioaerosols in indoor Environment*, Sponsored by the University of Michigan and ACGIH, Oct. 4-8, 1988, Ann Arbor, Michigan.
- 3 COLLINS, C.H. *Microbiological Methods*, Sixth Edition, Butterworths, London, 1989, 409 p.
- 4 HURST, C.J., et al., *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, 1997, 894 p.