

Microorganismes aérobies M-147

Cette méthode décrit le prélèvement Actif sur cassette et l'analyse par comptage de la (des) substance(s) : **Microorganismes aérobies**

Données de validation _____ Validation partielle

Numéro de la méthode _____ M-147

Ancien numéro de fiche _____ 121

Substances

Informations générales

Nom	Synonymes
microorganismes aérobies	Microorganismes du groupe pathogène 1 et 2; bactéries et moisissures hétérotrophes aérobies.

Substance	données de validation
microorganismes aérobies	Validation_137

Famille de substances

- AGENTS BIOLOGIQUES
- BIOAEROSOLS

Principe et informations

Ce protocole est destiné à l'analyse des microorganismes du groupe pathogène 1 et 2 tel que défini dans l'arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes, modifié par les arrêtés des 17 avril 1997 et 30 juin 1998. Il importe de respecter les recommandations concernant les règles d'hygiène et de sécurité pour la prévention des risques en général et notamment les risques biologiques. En particulier, les manipulations doivent être effectuées sous un poste de sécurité microbiologique et dans un laboratoire dont le niveau de confinement est suffisant et par du personnel qualifié.

Par ailleurs, toutes les manipulations doivent être effectuées avec du matériel stérile et en conditions aseptiques afin d'éviter les contaminations lors des analyses et dans le respect des normes relatives aux règles pour les examens microbiologiques et pour le mesurage des microorganismes dans l'air.

Principe de prélèvement et d'analyse

Etat physique _____ Particules en suspension (liquides ou/et solides)

Type de prélèvements _____ Actif

Nom du dispositif _____ cassette

Technique analytique _____ COMPTAGE

Domaine d'application

Substance
microorganismes aérobies

Liste des réactifs

- MILIEUX DE CULTURE GELOSES
- SOLUTION D'ELUTION
- TRYPTONE SEL

consignes de sécurité pour les manipulations en laboratoire ¹

¹ <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20953>

Méthode de prélèvement

Prélèvement des aérosols par cassette fermée²

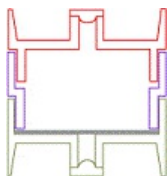
² <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cassette/metropol-prelevement-cassette.pdf>

Nombre d'éléments (dispositifs) composant le dispositif en série _____ 1

Dispositif de prélèvement

- Type de dispositif _____
- CASSETTE 37 mm 3 pièces
- Support ou substrat de collecte _____
- MEMBRANE POLYCARBONATE 0,8 µm
 - TAMPON EN CELLULOSE

Commentaires, conseils, consignes :



Conditions de prélèvement

Débit (L/min) _____ 2

Temps de prélèvement maximum en heures _____ 8

Pompe de prélèvement

- Pompe à débit de 1 à 5 L/min compensant les fortes pertes de charges (sup, à 20 pouces d'eau)

Conditionnement particulier

Choix conditionnement particulier _____ autre

Description :

Toutes les dispositions concernant l'assemblage et l'étanchéité des cassettes devront être vérifiées.

Les échantillons sont transportés le plus rapidement possible au laboratoire dans une enceinte réfrigérée à 4°C. Dans tous les cas, les échantillons doivent être analysés dans les 24 heures après le prélèvement.

Remarque : Le peu de données disponibles actuellement ne permet pas de mieux préciser les conditions de conservation des filtres après l'échantillonnage.

Préparation des dispositifs de prélèvement en vue d'une intervention en entreprise³

³ <http://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-intervention-preparation.pdf>

Méthode d'analyse

Principe général de l'analyse en laboratoire⁴

⁴ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-principe/metropol-analyse-principe.pdf>

Préparation de l'analyse

Durée de conservation testée et validée pour les prélèvements _____ 1jour(s)

Conditions de conservation testée et validée pour les prélèvements :

4°C

Nombre d'étapes de préparation _____ 4

Commentaires sur les étapes :

La première étape consiste à extraire les microorganismes qui ont été collectés sur le filtre lors du prélèvement, ainsi que ceux qui ont pu se déposer sur les parois internes de la cassette, et de les remettre en suspension dans une solution aqueuse stérile. La seconde étape consiste à diluer la suspension obtenue. La troisième est l'étape d'étalement sur le milieu de culture et la dernière correspond à l'incubation.

4 étapes de préparation :

Etape de préparation n° 1

Solvant ou solution _____ ■ SOLUTION STERILE (TWEEN 80 0.01% PEPTONE 0.1% EAU)

Type de préparation _____ ■ Extraction

Volume _____ 10mL

Temps d'agitation _____ 20min

Commentaires :

- Retirer le bouchon d'entrée de la(es) cassette(s)
- Introduire 10 mL de solution d'éluion dans chaque cassette.
- Remettre le bouchon d'entrée de la(es) cassette(s)
- Agiter la(es) cassette(s) pendant 20 minutes à 2000 rpm à l'aide d'un agitateur à rotation orbitale.
- Récupérer la suspension puis la transférer dans les tubes stériles pour analyse.
- Cette suspension constitue la suspension mère à analyser.

Pour les prélèvements conduisant à une collecte des particules aéroportées dans un liquide, le liquide de collecte constitue la **suspension mère à analyser** dont il faut définir ou ajuster le volume.

Etape de préparation n° 2

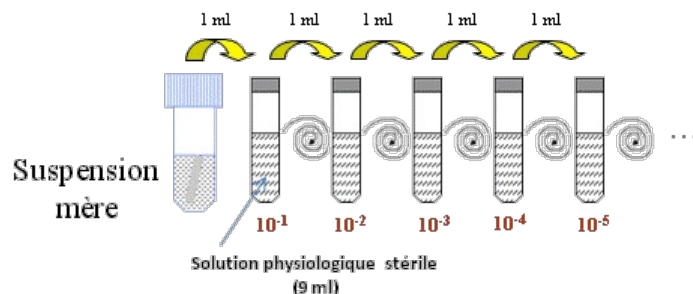
Solvant ou solution _____ ■ SOLUTION PHYSIOLOGIQUE (TYPE TRYPTONE DE SEL TS)

Type de préparation _____ ■ Dilution

Volume _____ 9mL

Commentaires :

- La suspension mère est diluée successivement dans une solution physiologique stérile, par exemple de tryptone sel (TS).
- La dilution décimale en cascade est effectuée en transférant une prise d'essai de 1 mL de suspension à diluer dans un tube contenant 9 mL de TS.
- Pour les dilutions autres que la dilution décimale, la quantité de TS est ajustée à la prise d'essai.
- Le nombre de dilutions nécessaires est choisi en fonction de la concentration attendue en microorganismes dans la suspension.



Dilution en série de l'échantillon dans une solution physiologique :  agitation au vortex

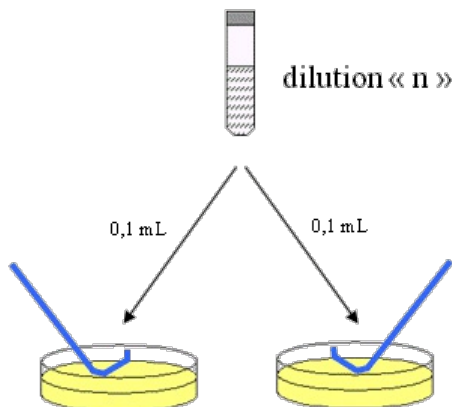
Etape de préparation n° 3

Type de préparation _____ ■ Etalement

Commentaires :

Étalement de la suspension à analyser sur le milieu de culture :

- Déposer 0,1 mL de la suspension à analyser (suspension mère et/ou l'une des dilutions) sur le milieu de culture
- Étaler de façon uniforme à l'aide d'un étaleur stérile jusqu'à ce qu'il ne reste plus de liquide visible à la surface du milieu.
- Chaque dilution est étalée sur deux boîtes de milieu et pour au moins trois dilutions successives.
- Étalement de la suspension diluée sur les milieux de culture



Étape de préparation n° 4

Type de préparation _____ ■ Incubation

Commentaires :

- Les boîtes de Pétri contenant les milieux de cultureensemencés sont disposées (en position retournées) dans un incubateur par piles d'un maximum de 6.
- L'incubation des boîtes de Pétri est effectuée dans les conditions appropriées. Les conditions d'incubation (température de consigne (T °C) ; humidité relative de l'air ; durée d'incubation) sont définies en fonction des exigences des microorganismes recherchés (cf annexe I dans les données de validations complémentaires).
- L'incubateur est réglé sur la température de consigne (T °C) +/-2°C désirée.
- Un récipient contenant de l'eau est placé dans l'incubateur de manière à maintenir dans l'enceinte une humidité relative élevée. L'incubateur peut être réfrigéré et programmable.

1 condition analytique :

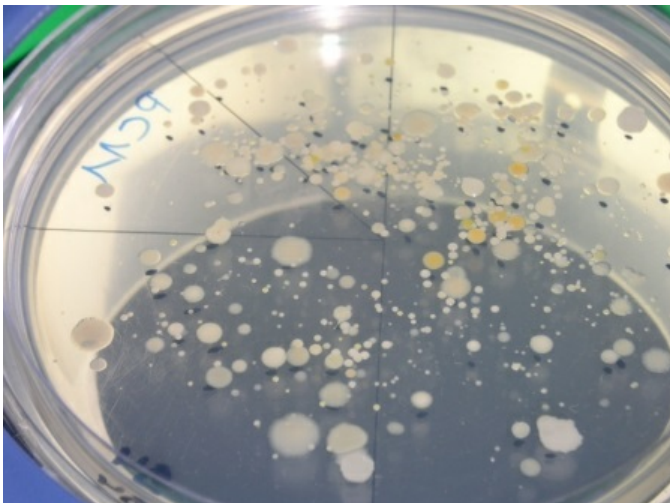
Condition analytique n° 1

Les conditions analytiques utilisées lors du développement de la méthode sont fournies avec les données de validation.

Technique analytique _____ ■ COMPTAGE

Commentaires, conseils ou conditions particulières :

- Les colonies ou UFC (Unités Formant Colonies) qui se sont développées à la surface du milieu de culture sont comptées, si possible, tous les jours et sur toute la durée de l'incubation (photos 1 et 2).
- Le comptage est effectué visuellement à l'aide éventuellement d'une loupe pour les boîtes contenant entre 0 et 300 colonies visibles.
- Selon le milieu de culture et les conditions d'incubation choisis, les colonies bactériennes et les colonies fongiques peuvent être distinguées.
- En fonction des objectifs de la mesure, une identification des colonies peut être nécessaire. Cette identification peut être effectuée après repiquage par des méthodes phénotypiques, biochimiques ou moléculaires.
- Les résultats de dénombrement sont consignés pour exploitation ultérieure.
- Les résultats provenant des boîtes présentant plus de 300 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation sont consignés avec une mention spéciale (par exemple « >300 »).

Moisissures développées sur milieu MEA après incubation :**Bactéries développées sur milieu TSA après incubation :****Notes :**

- Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C dans l'attente d'une ré-analyse ultérieure.
- Les déchets doivent être traités par la filière des déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI).

Etalonnage et expression des résultats

La méthode d'étalonnage indiquée est celle utilisée lors du développement. Elle n'a cependant pas de caractère obligatoire

Méthodes d'étalonnage pour la quantification des polluants⁵

⁵<http://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-etalonnage.pdf>

Calcul de la quantité de substance sur le dispositif :

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Cas général : entre 15 à 300 colonies visibles à la surface du milieu de culture

Le cas général s'applique lorsque au moins une boîte de Pétri présente au minimum 15 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation.

- ■ Sélectionner les boîtes de Pétri exploitables pour le calcul. Ces boîtes correspondent à celles provenant de deux dilutions successives et dont au moins une boîte présente au minimum 15 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation (soit au maximum 4 boîtes). Les boîtes présentant plus de 300 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation ne sont pas exploitables.
- ■ Calculer le nombre « C » d'UFC (**Unités Formant Colonies**) sur les boîtes exploitables correspondantes à l'aide de la formule suivante :

$$C = \sum_{i=1}^{i=4} C_i$$

Avec :

$$\sum_{i=1}^{i=4} C_i$$

: somme des colonies comptées sur l'ensemble des boîtes de Pétri sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ; seules les boîtes correspondant à un nombre d'UFC inférieur ou égal à 300 sont considérées dans le calcul).

- ■ Calculer la concentration « N_p » (UFC/mL) en microorganismes cultivables dans la prise d'essai de l'échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{v(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Avec :

C : nombre d'UFC (unités formant colonies) observées sur l'ensemble des boîtes sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ; seules les boîtes correspondant à un nombre d'UFC inférieur ou égal à 300 sont considérées dans le calcul)

v : volume de la suspension étalée à la surface des milieux en mL (par exemple 0,1 mL).

n₁ : nombre de boîtes retenues à la première dilution (la plus faible).

n₂ : nombre de boîtes retenues à la seconde dilution (la plus forte)

d : taux de dilution correspondant à la dilution la plus faible retenue (d = 1 pour l'échantillon non dilué ; d = 0,01 pour la dilution au 1/100^{ième} etc...).

- ■ Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule et sont exprimés en UFC par mL dans la suspension cellulaire d'origine.

Exemple chiffré N°1 :

Dilution	Boîtes de Pétri	Résultats de Comptage	Boîtes retenues	n1	n2	d	C	N _p	Résultat arrondi (UFC/ml)
1/10	Boite n°1	>300		2	2	1/100	362	164545	1,65 x 10 ⁵
1/10	Boite n°2	>300							
1/100	Boite n°1	119	x						
1/100	Boite n°2	212	x						
1/1000	Boite n°1	15	x						
1/1000	Boite n°2	16	x						

Exemple chiffré N°2 :

Dilution	Boîtes de Pétri	Résultats de Comptage	Boîtes retenues	n1	n2	d	C	N _p	Résultat arrondi (UFC/ml)
1	Boite n°1	>300		2	2	1/10	202	9181,82	9,18 x 10 ³
1	Boite n°2	>300							
1/10	Boite n°1	88	x						
1/10	Boite n°2	99	x						
1/100	Boite n°1	5	x						
1/100	Boite n°2	10	x						

Estimation des petits nombres : de 1 à 14 colonies visibles à la surface du milieu de culture

Le cas de l'estimation des petits nombres s'applique lorsque aucune des boîtes de Pétri ne présente plus de 14 colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation.

- Sélectionner les boîtes de Pétri provenant d'une seule et même dilution contenant le plus d'UFC parmi toutes les boîtes disponibles. Aucune des boîtes disponibles ne doit présenter un nombre de colonies visibles à la surface du milieu de culture après incubation supérieur ou égal à 15.
 - Calculer le nombre « C » d'UFC (unités formant colonies) sur les boîtes sélectionnées et exploitables à l'aide de la formule suivante :

$$C = \sum_{i=1}^{i=4} C_i$$

Avec :

$$\sum_{i=1}^{i=4} C_i$$

: somme des colonies comptées sur les boîtes de Pétri sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de l'étalement d'une seule et même dilution et présentant un nombre d'UFC strictement inférieur à 15).

- Calculer la concentration « N_p » (UFC/mL) en microorganismes cultivables dans la prise d'essai de l'échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$N_p = \frac{C}{v \times n \times d}$$

Avec :

N : nombre d'UFC (unités formant colonies) observées sur l'ensemble des boîtes sélectionnées

v : volume de la suspension étalée à la surface des milieux en mL

n : nombre de boîtes exploitables (1 ou 2 dans ce cas)

d : taux de dilution de la suspension étalée sur les boîtes de Pétri retenues pour le calcul. (d = 1 pour l'échantillon non dilué ; d = 0,01 pour la dilution au 1/100 ième etc...).

Exemple chiffré :

Dilution	Boîtes de Pétri	Résultats de Comptage	Boîtes retenues	<i>n</i>	<i>d</i>	<i>C</i>	<i>N_p</i>	Résultat arrondi (UFC/ml)
1	Boite n°1	4	x	2	1	10	50	50
1	Boite n°2	6	x					
1/10	Boite n°1	1						
1/10	Boite n°2	0						
1/100	Boite n°1	0						
1/100	Boite n°2	0						

Aucune colonie visible à la surface du milieu de culture

Si aucune des boîtes Pétri ne présente au moins 1 colonie microbienne visible à la surface du milieu de culture après incubation le résultat doit être exprimé de la manière suivante :

- ■ C_p = inférieure à la limite de détection de la méthode (1 UFC/mL).

Calcul de la concentration atmosphérique⁶

⁶<http://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-resultat-calcul-concentration.pdf>

Contacts

metropol@inrs.fr

Bibliographie

Historique

Version	Date	Modification(s) faisant l'objet de la nouvelle version
121/V01.01	31/03/2014	Création.
Microorganismes aérobies M-147	Novembre 2015	Mise en ligne Fusion des fiches prélèvement et analyse Prélèvement sur cassette fermée