



Vérification de la viabilité de moisissures et/ou de spores de moisissures – Protocole de prélèvement

Mai 2017 - Thi-Phuong Nguyen, chargée de mission sur les questions de conservation préventive et curative.

1/ Localiser et documenter la zone contaminée :

- Indiquer la cote et les caractéristiques du document sur lequel les prélèvements sont réalisés, ainsi que les raisons qui motivent le prélèvement.
- Prendre des photographies des zones de prélèvement ou faire un relevé graphique en prenant soin d'y inclure des repères métriques (prendre une photographie de la zone de prélèvement à proximité de laquelle est placée une règle graduée par exemple).

2/ Préparer le matériel de prélèvement

Le matériel de prélèvement consiste en :

- une paire de gants en polymère synthétique jetables,
- un kit SRK : écouvillon sec + flacon contenant 2,5 mL de liquide Ringer et neutralisant, le tout emballé dans un sachet stérilisé (Image 1),
- une pipette graduée dans son emballage stérile (Image 2),
- un milieu de culture déshydraté Petrifilm™ pour levures et moisissures (Image 3),
- un diffuseur pour Pétrifilm™ (image 4),
- un feutre permanent à pointe fine.



Image 1



Image 2



Image 3



Image 4

3/ Réaliser le frottis

- Enfiler les gants ;
- extraire l'écouvillon de son sachet ;
- frotter doucement la zone de prélèvement avec l'embout cotonné en le tournant sur lui-même afin de récupérer un maximum de moisissures et/ou de spores (Image 5). L'écouvillon ne doit être mis en contact avec aucune autre surface que celle désignée pour le prélèvement. Un écouvillon ne doit servir que pour une seule zone de prélèvement. S'il s'agit de documents précieux, le prélèvement ne doit pas être réalisé dans une zone où le papier est pulvérulent. Dans la mesure du possible et pour permettre une mesure semi-quantitative, le prélèvement se fera dans une zone de 5 cm x 5 cm ; un carré de papier ou carton évidé pourra servir de gabarit (Image 6). Chaque gabarit en papier ne doit être utilisé qu'une fois afin d'éviter la propagation des spores d'un document à l'autre. Si le gabarit est en plastique, il doit être nettoyé avec de l'alcool à 70° et un coton propre entre chaque prélèvement. Pour le prélèvement, frotter le document dans un sens sur

toute la surface définie par le gabarit, puis une seconde fois dans le sens perpendiculaire au premier ;

- plonger l'écouvillon dans le liquide, l'agiter légèrement pendant environ 20 secondes afin d'en extraire les moisissures et les spores ;
- si la mise en culture n'est pas immédiate, casser la tige de l'écouvillon au niveau du tiers supérieur, insérer celle-ci dans l'orifice du bouchon (Image 7) et reboucher le flacon hermétiquement (Image 8). Placer le tout au réfrigérateur. La mise en culture doit se faire dans les 48 h. Si la mise en culture est immédiate, l'écouvillon peut être jeté après extraction des moisissures et spores dans le liquide.

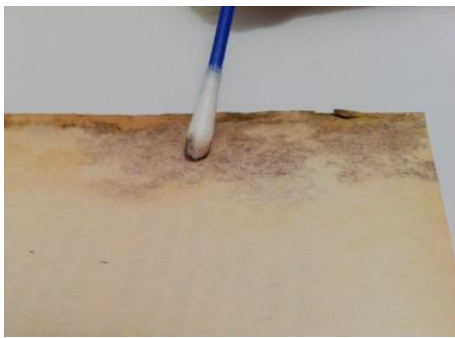


Image 5

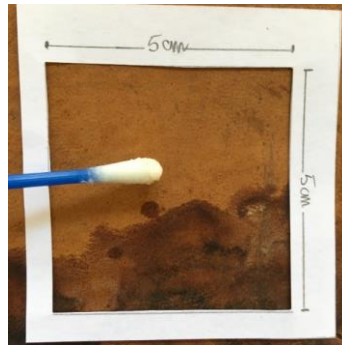


Image 6

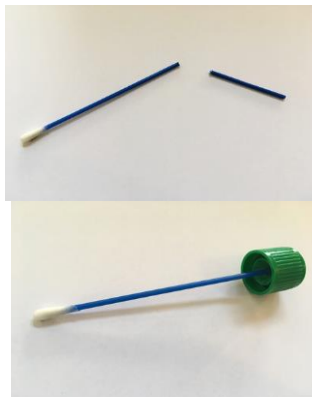


Image 7



Image 8

4/ Mettre en culture

- Placer le Petrifilm™ sur une surface plane et bien propre ;
- Sortir la pipette de son sachet plastique, prélever 1 ml de solution Ringer en s'aidant de la graduation (Images 9 et 10) et en pressant et relâchant délicatement la poire tout en maintenant la pointe toujours plongée dans le liquide. Eviter autant que possible, la formation de bulle dans le liquide prélevé. Cette phase du prélèvement est sans doute celle qui pose le plus de difficulté ; il

est donc fortement conseillé, avant toute mise en culture, de s'entraîner avec une autre pipette et un petit récipient rempli d'eau ;

- soulever le film supérieur du Pétrifilm™ (Image 11) ;
- tout en maintenant le film supérieur d'une main, verser lentement avec l'autre main, tout le contenu de la pipette au centre Pétrifilm™ ; le liquide doit former une goutte bien ronde (Image 12) ;
- lâcher le film supérieur ;
- positionner rapidement le diffuseur sur le Pétrifilm™ (image 13), le presser légèrement afin d'étaler uniformément la goutte de liquide qui doit rester cantonnée à l'intérieur du cercle défini par le diffuseur (Image 14). Laisser la gélose gonfler pendant environ 1 minute ;
- afin d'éviter l'empoussièrement du Pétrifilm™ durant la phase d'incubation, le placer à l'intérieur d'un sachet en plastique transparent sans fermer celui-ci de manière hermétique ;
- placer le Pétrifilm™ dans un endroit propre et chauffé à environ 25°C (à proximité d'un radiateur par exemple, sans toutefois le placer directement sur celui-ci) ;
- avant chaque réutilisation, le diffuseur doit être nettoyé avec de l'alcool à 70° et un coton propre.



Image 9



Image 10

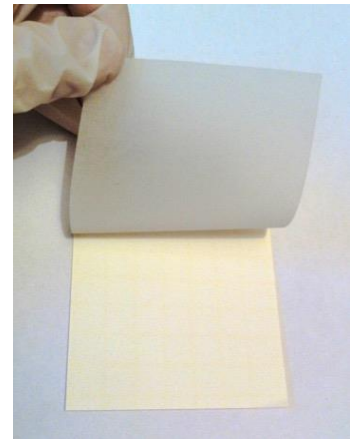


Image 11

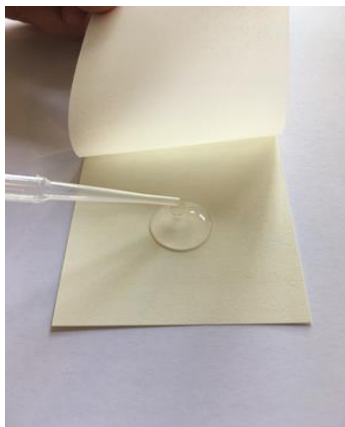


Image 12



Image 13



Image 14

5/ Analyser les résultats

Après au moins 3 jours d'incubation, si les moisissures et/ou les spores de moisissures sont viables, des taches commencent à apparaître sur le Pétrifilm™ ; elles s'élargissent et deviennent plus visibles à 5 ou 7 jours.

- Les moisissures forment des colonies aux contours diffus, présentant des couleurs variables ; le centre de la colonie (1 tache = 1 colonie) présente une coloration plus intense.
- Les Pétrifilm™ choisis favorisent également le développement des levures. Il ne faut pas tenir compte de ces dernières, qui se présentent sous la forme de petits ronds aux contours bien définis et de couleur bleue foncée qui ne s'étendent pas. Attention, des moisissures peuvent également produire une couleur bleue, mais la tache présentera alors un noyau central foncé entouré d'un halo plus clair (Images 15 et 16).
- Si le Pétrifilm™ ne présente aucune tache au bout de 10 jours, les moisissures sont mortes et les spores, non revivifiables.

*Il est beaucoup plus aisé de dénombrer les moisissures dans leur tout premiers stades de développement ; elles s'étendent en effet ensuite, et finissent par s'occulter les unes les autres. C'est la raison pour laquelle il est fortement **conseillé de réaliser les mises en culture le vendredi**, veille du week-end, afin de ne pas rater ces premiers stades de développement.*

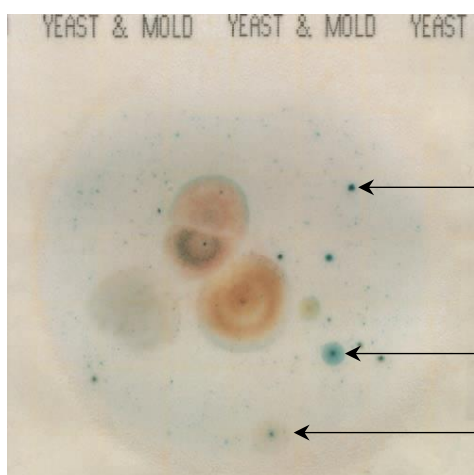


Image 15
(Comptage = 7 levures – 7 moisissures)

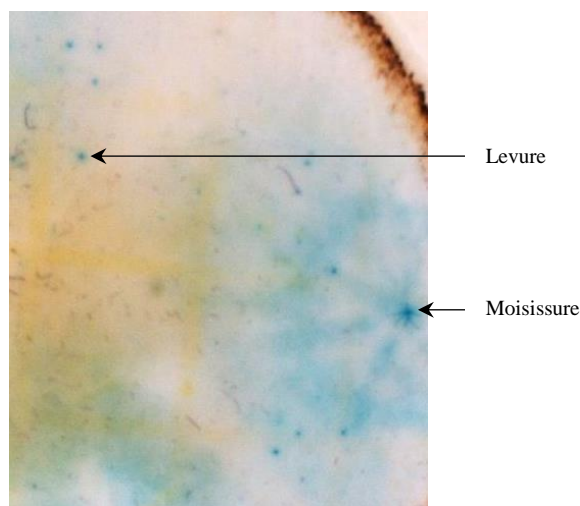
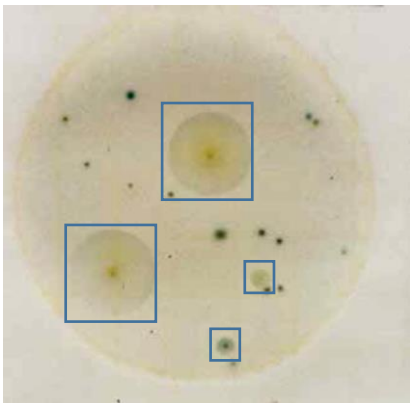


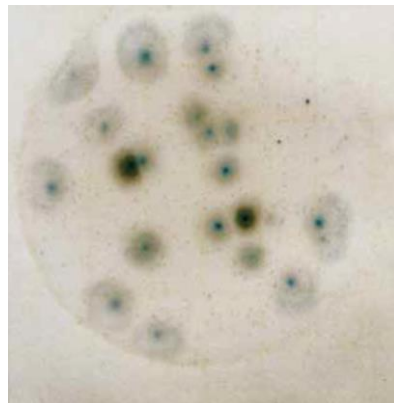
Image 16

Prendre une photographie du Pétrifilm™ et compter le nombre de colonies de moisissures (1 tache = 1 colonie) à 3, 5 et 7 jours. Retenir le chiffre le plus élevé. Seuls les prélèvements réalisés sur une surface bien définie (25 cm² ou 100 cm² en général) pourront apporter une indication du degré de contamination de cette surface. En ce cas, la formule permettant de calculer le nombre d'UFC (unités formant colonie) est la suivante :

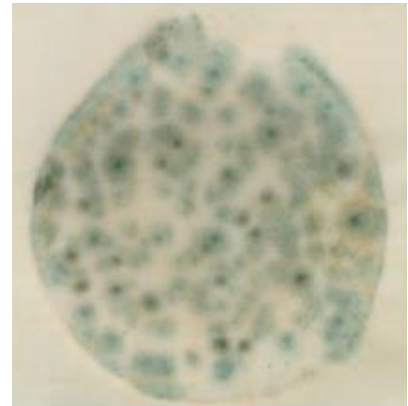
$$n\text{UFC}/\text{cm}^2 = \frac{(\text{Nombre de colonies développées sur le Pétrifilm}) \times \text{volume de solution versée}}{\text{surface de prélèvement}}$$



Moisissures : 4 UFC
Risque faible



Moisissures : 21 UFC
Risque moyen



Moisissures : >100 UFC
Risque élevé

- À retenir -

Dès lors que les prélèvements et la mise en culture sur Pétrifilm™ sont réalisés en dehors de conditions de laboratoire normalisées, et par du personnel non compétent en microbiologie, les résultats obtenus ne sont qu'indicatifs et ne permettent pas de statuer sur le degré de nocivité des moisissures ni sur l'ampleur d'une contamination. Seule une analyse complémentaire réalisée par un laboratoire spécialisé peut alors conforter et préciser les résultats.

Cette technique est utile si l'on souhaite connaître par exemple :

- le caractère revivifiable (capacité des spores à germer puis à générer des moisissures actives en cas d'augmentation de l'humidité relative ambiante) ou non de traces douteuses présentes sur des documents anciennement contaminés,
- vérifier l'efficacité d'un dépoussiérage,
- identifier la zone géographique d'où provient une contamination (bouche d'arrivée d'air neuf, point froid, etc.).

Si des moisissures en pleine croissance sont clairement décelables à l'oeil nu, taches duveteuses et en relief, document humide, odeur prégnante de moisi, etc., cette méthode n'aura pas d'utilité puisqu'elle ne fera que confirmer l'évidence.