

OPTIMISATION DE LA MÉTHODE DE MESURE DES ENDOTOXINES DANS L'AIR DES LIEUX DE TRAVAIL : ESSAIS SUR DES BIOAÉROSOLS EXPERIMENTAUX

X. Simon*, C. Coulais, C. Dziurla et P. Loison

Laboratoire de Métrologie des Aérosols, INRS, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

*Courriel de l'orateur : xavier.simon@inrs.fr

TITLE

Optimization of the measurement method for airborne endotoxins in workplace atmospheres: tests using laboratory generated bacterial aerosols

RESUME

L'INRS propose depuis 2005 une méthode de mesure des endotoxines, constituants de la membrane externe de certaines bactéries susceptibles d'engendrer par inhalation des effets délétères sur la santé des travailleurs. En l'absence de certaines données de validation et avec l'évolution des connaissances, de nouveaux travaux de recherche ont été initiés afin d'optimiser cette méthode. Un bioaérosol expérimental issu d'un mélange de 3 bactéries a été utilisé et permet de produire des concentrations maîtrisées en endotoxines. Les influences de la nature du filtre de collecte, d'une élution directe dans la cassette et de la conservation ont été étudiées. La méthode actuelle semble ainsi pouvoir être optimisée bien que des essais complémentaires de terrain soient nécessaires pour valider ces résultats.

ABSTRACT

Since 2005, INRS has been proposing a method for measuring endotoxins, components of the outer membrane of gram negative bacteria that can cause harmful effects on the health of workers by inhalation. Some validation data are missing and with the evolution of knowledge, a new study has been initiated to optimize this method. An experimental bioaerosol from a mixture of 3 bacteria has been used to produce controlled concentrations of endotoxins. The influences of the collection filter type, a direct elution in the cassette and the storage temperature were studied. It seems that the current method can be optimized, although additional field measurements are needed to validate these results.

MOTS-CLÉS : bactéries Gram négatif, distribution granulométrique, prélèvement par filtration, analyse LAL

KEYWORDS: Gram negative bacteria, size distribution, filtration sampling, LAL analysis

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les endotoxines sont des constituants de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Elles sont émises à partir de réservoirs solides (poussières, déchets, boues, compost, végétaux, etc.) ou liquides (eaux usées, fluides de coupe, eaux de procédés, etc.) contenant ou ayant contenus de la matière organique. Les bactéries et les endotoxines de ces réservoirs sont mises en suspension dans l'air au cours de certaines tâches professionnelles qui génèrent des aérosols. Par conséquent, les endotoxines sont présentes dans les atmosphères de travail de nombreux environnements professionnels. On estime que plusieurs centaines de milliers de travailleurs sont concernés. Les expositions aux endotoxines engendrent des effets délétères sur la santé des travailleurs : atteintes de l'état général, symptômes respiratoires aigus et altérations de la fonction respiratoire qui peuvent devenir irréversibles au fil du temps. La mesure des concentrations en endotoxines s'avère bien souvent cruciale, voir indispensable, dans une démarche métrologique visant à évaluer les risques liés à la présence de bioaérosols. Il n'existe pas de Valeur Limite d'Exposition Professionnelle, cependant, des valeurs guides (200 et 1000 UE.m⁻³) ont été établies afin d'harmoniser l'interprétation des concentrations rencontrées en milieu professionnel (Balty *et al*, 2015).

Une méthode de mesure a été proposée par l'INRS dès 2005 (MétroPol M-154). Le prélèvement des endotoxines s'effectue par filtration dans une cassette fermée de 37 mm à un débit de 2 L.min⁻¹ et le dosage est réalisé suivant la méthode cinétique et chromogénique au Lysat d'Améboocytes de Limule (kit LAL). Le protocole de mesure suit en partie les recommandations de la norme 14031 (Afnor, 2003 – en révision depuis 2018). Cependant, l'évolution des connaissances et l'absence de certaines données de validation nécessitent d'engager de nouveaux travaux de recherche :

- Dans la version actuelle de la méthode M-154, seul le filtre de collecte en fibres de verre (FV, porosité 1,0 µm, dépyrogénéisé) est extrait et analysé. Les endotoxines déposées sur les parois de la cassette ne sont pas prises en compte dans le processus analytique. Pourtant, de tels dépôts ont déjà été mis en évidence (Walters *et al*, 1994; Duquenne *et al*, 2015). Ne pas intégrer à la mesure ces endotoxines déposées sur les parois internes de la cassette conduit à systématiquement sous-estimer, d'une manière importante et aléatoire, les concentrations mesurées dans l'air des lieux de travail.

- Différents types de filtres peuvent être utilisés dans le dispositif de prélèvement (FV, polycarbonate PC, PTFE, PVC, etc.). Selon la nature des matériaux constituant et leur capacité à libérer ou au contraire à retenir les endotoxines lors de l'étape d'éluion, ils peuvent avoir une influence importante sur les résultats de mesure de concentrations dans l'air (Spaan *et al*, 2007; Duquenne *et al*, 2018). Les filtres sont également susceptibles de libérer des substances inhibitrices ou activatrices de la réaction de dosage. Il ne ressort pas de la littérature que les filtres en FV constituent le support de collecte le plus approprié pour réaliser des mesures d'endotoxines dans l'air des atmosphères professionnelles.
- Il n'existe pas, non plus, de consensus concernant les conditions de transport et de conservation des échantillons destinés à l'analyse des endotoxines. Les échantillons sont habituellement transportés le plus rapidement possible au laboratoire à température ambiante ou dans une enceinte réfrigérée à 4°C pour être analysés dans les 24h suivant la fin du prélèvement. Ce manque de latitude dans la conservation des échantillons oblige à réaliser les dosages sur une journée et restreint, de ce fait, le nombre de prélèvements qui peuvent être réalisés sur le terrain. L'absence de données expérimentales ou bibliographiques robustes ne permet pas de mieux préciser les conditions de transport et de conservation des filtres.

Dans ce contexte, les objectifs de ces travaux sont (1) d'optimiser l'éluion des échantillons prélevés afin de prendre en compte la totalité des endotoxines captées dans les cassettes et (2) d'étudier la conservation des échantillons avant analyse. Dans le cadre de l'objectif (1), les influences de 4 types de filtres, de 2 volumes et de 2 durées d'éluion seront étudiées. L'objectif (2) s'intéressera à 3 modalités de conservation pendant 8 jours. Un objectif préliminaire à ces travaux de laboratoire consistera à mettre en œuvre et caractériser un bioaérosol expérimental constitué d'un mélange de plusieurs bactéries.

2. MATERIELS ET METHODE

Le banc d'essais est constitué d'un générateur de type bulleur et d'une enceinte permettant le conditionnement et l'échantillonnage du bioaérosol (Figure 1). Il est confiné dans un Poste de Sécurité Microbiologique de classe II afin d'éviter une exposition des expérimentateurs.

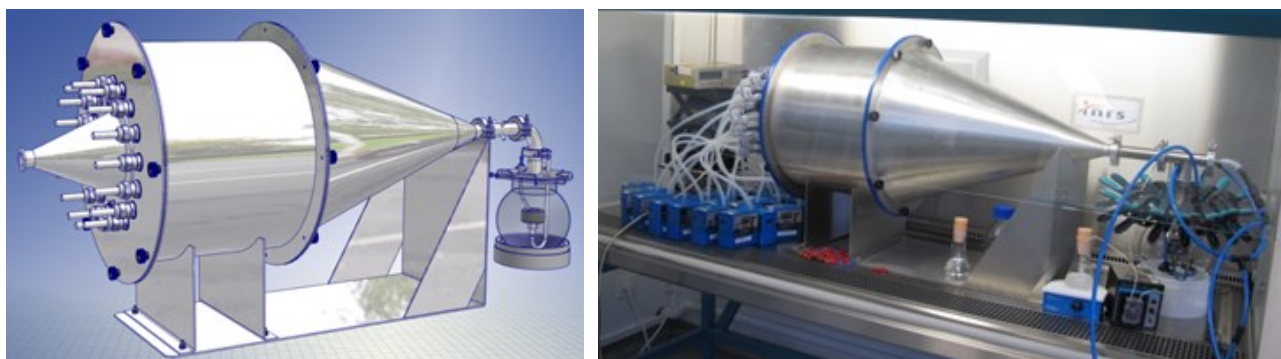


Figure 1. Schéma et photographie du banc de génération de bioaérosols expérimentaux

La mise en suspension dans l'air des microorganismes s'effectue par bullage d'air comprimé à travers un film de culture liquide bactérienne, suivant une méthodologie décrite précédemment (Simon *et al*, 2011). Une enceinte dédiée au prélèvement simultané de 15 échantillons complète le banc d'essais. Elle est constituée d'une entrée conique d'une longueur de 50 cm et d'une zone d'échantillonnage cylindrique (longueur 30 cm; diamètre 40 cm). L'échantillonnage du bioaérosol expérimental est réalisé par des sondes à bord mince présentant un diamètre interne de 10 mm et une longueur de 20 cm. L'expansion du jet d'air en provenance du générateur se fait de manière symétrique dans la zone conique et s'accompagne d'une diminution progressive des vitesses d'air. Les orifices d'entrée des sondes sont positionnés dans une zone de mesure caractérisée par un écoulement laminaire et des lignes de courant parallèles. Cette géométrie favorise une répartition homogène de l'aérosol sur les différentes sondes : <1,5% d'écart entre les valeurs moyennes de concentrations en nombre de particules de deux sondes distinctes. Pour chaque expérimentation, les valeurs de température et d'humidité relative de l'air sont mesurées en continu par un thermo-hygromètre (Rotronic®, HygroPalm 2) dont la sonde (Rotronic®, HygroClip®) est introduite au sein du flux d'air. L'humidité relative de l'air était contrôlée à $50 \pm 2\%$.

Un protocole de préparation des cultures liquides a été élaboré afin de produire un bioaérosol expérimental constitué d'un mélange de trois bactéries Gram négatif modèles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*. Pour chaque bactérie, des cultures en phase stationnaire de croissance sont lavées deux fois à l'eau distillée stérile par centrifugation puis ajustée à une DO_{600nm} de 1.

La caractérisation physique des bioaérosols a été réalisée sur chaque bactérie générée individuellement, puis sur un mélange équivolume des trois modèles. Le niveau et la stabilité de la concentration en nombre de particules étaient mesurés en continu par un compteur optique Grimm G1109. La distribution granulométrique des particules générées a été mesurée ponctuellement avec un combo TSI OPS 3330 + NanoScan 3910 (utilisation du logiciel MIM) et un TSI APS 3321.

Le bioaérosol expérimental constitué du mélange des trois bactéries a été utilisé en routine pour contaminer de manière homogène des séries de 10 à 12 cassettes de 37 mm de diamètre afin d'investiguer l'influence de plusieurs paramètres ou modalités :

- 4 natures de filtre : fibres de verre (FV, Whatman GF/B 1,0 μm), polycarbonate (PC, Whatman Nuclepore 0,8 μm), PTFE (Millipore Fluoropore 1,0 μm) et PVC (Pall GLA-5000 5,0 μm).
- 2 modalités d'éluion : filtre seul (FV selon MétroPol M-154) et éluion directe dans la cassette.
- 2 volumes d'éluion : 5 et 10 mL d'eau purifiée stérile et apyrogène (Otec, Aguetant).
- 2 durées d'éluion : 20 et 60 min.
- 3 températures de conservation : ambiante ($\sim 20^\circ\text{C}$), 4°C et -20°C pendant 8 jours.

Pour l'analyse suivant la méthode M-154 des particules collectées sur le filtre seul, le filtre (en FV) était retiré de la cassette puis transféré dans un tube de 50mL en polypropylène stérile et apyrogène (Cellstar tubes, Greiner Bio-One) contenant 10 mL d'eau purifiée stérile et apyrogène. Le tube était ensuite agité pendant 1 min à 2500 rpm à l'aide d'un vortex, puis de nouveau pendant 60 min à 2000 rpm (Heidolph, Multi-Reax shaker). Les éluats étaient centrifugés 10 min à 2000 rpm (Sigma, 3-18K) à 4°C puis les surnageant étaient transférés dans un nouveau tube. Pour l'éluion directe dans la cassette, un volume de 5 ou 10 ml d'eau purifiée stérile et apyrogène était introduit directement dans la cassette qui était ensuite agitée pendant 20 ou 60 min à 2000 rpm. L'étape de centrifugation n'est pas nécessaire pour ces éluats

Le dosage des endotoxines dans les éluats a été effectué immédiatement après l'éluion par la méthode cinétique et chromogénique au « Lysat d'Ameobocyte de Limule » (LAL) avec des kits Kinetic-QCL (Lonza Group Ltd., France).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Caractérisation du bioaérosol expérimental constitué d'un mélange de trois bactéries

La distribution granulométrique en nombre du bioaérosol complexe constitué de trois bactéries présente une population relativement monodispersée, centrée sur un diamètre optique proche de 0,4 μm pour les mesures avec le COP Grimm G1109 (Figure 2a) et sur un diamètre aérodynamique proche de 0,65 μm pour les mesures avec l'APS. Générées individuellement, les trois espèces modèles présentent en effet des distributions granulométriques très similaires en termes de diamètre médian et d'écart-type géométrique.

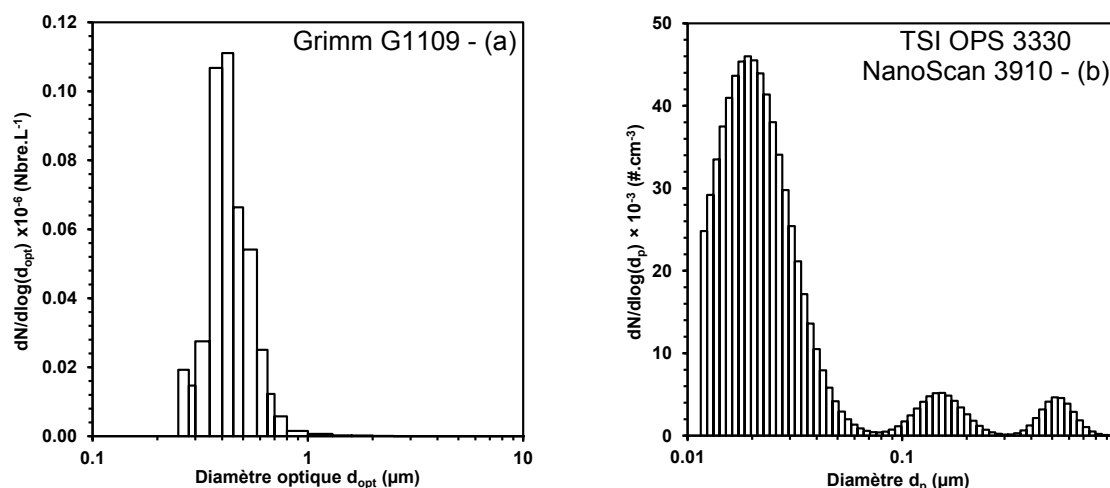
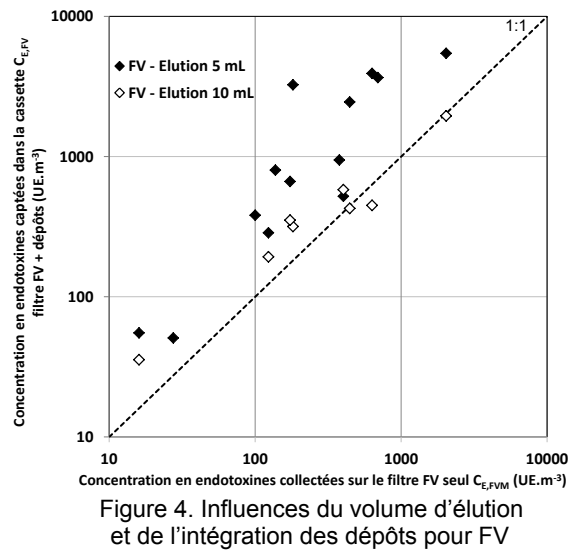
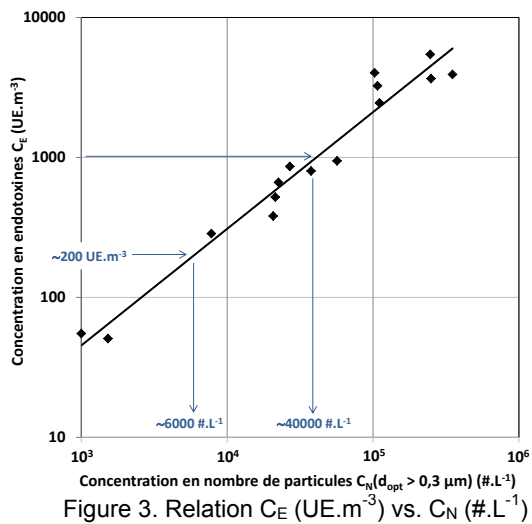


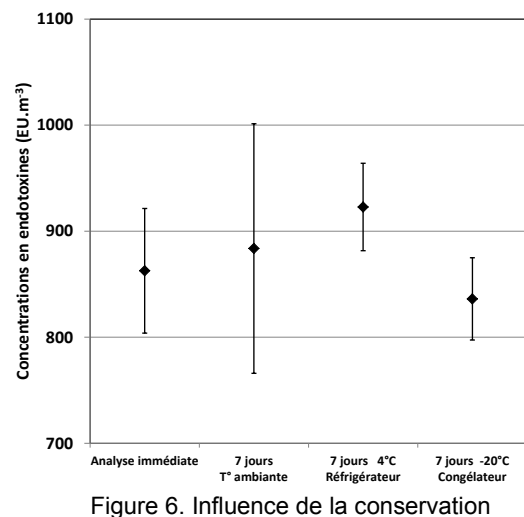
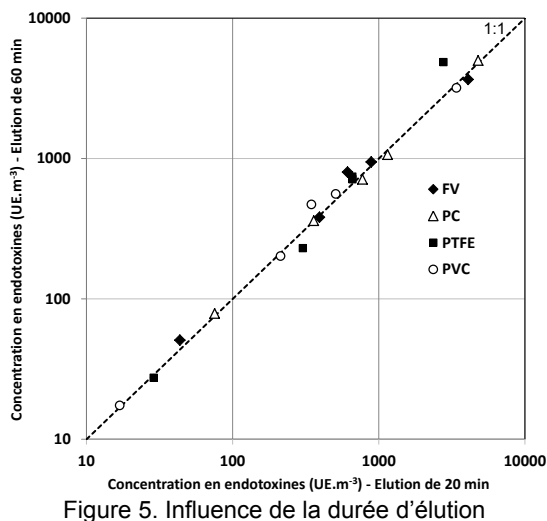
Figure 2. Distributions granulométriques du mélange de cellules *E. coli*, *S. marcescens* et *P. aeruginosa*

La population de cellules bactériennes est parfaitement détachée de particules résiduelles plus fines présentant des modes proches de 20 nm et 150 nm (Figure 2b) : résidus de préparation, débris de cellules encore présents dans la culture liquide malgré les lavages successifs, impuretés initialement présentes dans l'eau sous forme dissoutes, etc. Le non recouvrement de la population d'intérêt avec ces particules résiduelles permet d'utiliser les mesures en temps réel du Grimm ($C_N(d_{\text{opt}} > 0,3 \mu\text{m})$) pour assurer la stabilité et la reproductibilité des essais et prédire les concentrations générées en endotoxines (Figure 3). La méthodologie employée permet de produire des concentrations maîtrisées en endotoxines (C_E) qui s'étalent entre ~ 10 et $\sim 10^4$ unités endotoxines par mètre cube d'air ($\text{UE} \cdot \text{m}^{-3}$), représentatives de celles rencontrées dans les atmosphères professionnelles (valeurs guides proposées en France : 200 et $1000 \text{ UE} \cdot \text{m}^{-3}$).



3.2. Influences des modalités d'élution et de conservation sur C_E

Les concentrations en endotoxines mesurées après une élution directe dans la cassette avec un volume d'élution de 5 mL sont systématiquement supérieures, d'un facteur compris entre 1,3 et 18, à celles mesurées après élution du filtre seul (Figure 4, exemple pour FV). Pour un volume d'élution de 5 mL et quel que soit le filtre considéré, la durée d'élution (60 min vs. 20 min) ne modifie pas significativement les concentrations captées dans la cassette (Figure 5). Une diminution de 40 min du temps de traitement de l'échantillon semble donc envisageable pour simplifier la méthode.



Pour un volume d'élution de 5 mL, la température de conservation pendant 8 jours ne modifie pas significativement les concentrations en endotoxines captées dans la cassette (Figure 6, exemple pour FV et $C_E \approx 850 UE.m^{-3}$). Une durée de conservation de plusieurs jours semble donc pouvoir être proposée afin d'apporter une plus grande liberté de gestion des échantillons à l'analyste.

4. CONCLUSIONS

Les résultats expérimentaux de laboratoire ont permis de mesurer les influences de la nature du filtre, des modalités d'élution (prise en compte des endotoxines déposées sur les parois, volume et durée d'élution) et de trois températures de conservation. L'influence de la nature du liquide d'élution sera également étudiée dans de prochains essais. Enfin, l'utilisation d'échantillons prélevés dans des atmosphères professionnelles variées permettra de valider les résultats de laboratoire afin de proposer une méthode de mesure MétroPol M-154 des endotoxines simplifiée et optimisée.

AFNOR (2003) Norme NF EN 14031 13p.

Balty, I., Bertrand, N., David, C., Burzoni, S., Clerc, F., Duquenne, P., Simon, X. *et al* (2015) HST 239, 46-50.

Duquenne, P., Simon, X., Demange, V., Harper, M. and Wild P. (2015) Ann Occup Hyg 59 (4), 504-513.

Duquenne, P., Coulais, C., Bau, S. and Simon, X. (2018) J Aerosol Sci 116, 92-105.

Simon, X., Duquenne, P., Koehler, V., Piernot, C., Coulais, C. and Faure M. (2011) J Aerosol Sci 42, 517-531.

Spaan, S., Heederik, D.J.J., Thorne, P.S. and Wouters, I.M. (2007) Appl Environ Microbiol 73 (19), 6134-6143.

Walters, M., Milton, D.K., Larsson, L. and Ford, T. (1994) Appl Environ Microbiol 60 (3), 996-1005.