TRAVAUX D'INTERCOMPARAISON EN VUE D'HARMONISER LA VALIDATION DES METHODES DE MESURE DES BIOAEROSOLS : DESCRIPTION DE LA METHODOLOGIE

P. Loison [1]*, L. Alonso[1], C. Coulais[1], C. Dziurla[1], C. Pogner[2], N. Turgeon[3] et X. Simon[1]

[1]Laboratoire de Métrologie des Aérosols, INRS, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France
[2]Center for health & bioresources, unit bioresources, AIT, Konrad-Lorenz-Straße 24, 3430 Tulln, Austria
[3]Laboratoire de recherche sur les bioaérosols, IUCPQ-UL, 2725, Chemin Sainte-Foy, Québec, Canada
*Courriel de l'orateur : pauline.loison@inrs.fr

TITLE

Intercomparison work to harmonize the validation of bioaerosol measurement methods: description of the methodology

RESUME

La mesure de l'exposition des travailleurs aux bioaérosols nécessite une démarche métrologique particulière qui apporte des informations utiles pour la prévention. De nombreuses méthodes de mesure existent, toutefois, les normes existantes sont trop générales pour permettre une réelle harmonisation des pratiques. Se basant sur des travaux de recherche, ce projet a pour objectif principal de proposer des préconisations sur la mise au point et la validation des méthodes de prélèvement et d'analyse des bioaérosols. Pour ce faire, des travaux d'inter-comparaison sur la mesure de bioaerosols expérimentaux seront menés avec deux autres équipes reconnues au niveau international. Une démarche expérimentale harmonisée ainsi qu'une procédure commune de recueil et de traitement des résultats seront employées.

ABSTRACT

Measurement of the worker exposure to bioaerosols needs a specific metrological approach that gives some useful information for prevention. Many measurement methods exist, however, actual standards are too general to allow a real harmonization of the practices. Based on research works, this project aims to propose recommendation on the development and the validation of sampling and analysis methods of bioaerosols. To do this, intercomparison works on the measurement of experimental bioaerosols will be lead with two other recognized international teams. An experimental harmonized approach as well as a common process of recovery and treatment of results will be used.

MOTS-CLES : banc d'essais de bioaérosols, spores fongiques et bactériennes, phages, biocollecteurs /
KEYWORDS: bioaerosol test bench, fungal and bacterial spores, phages, biosamplers

1. CONTEXTES ET OBJECTIFS

De nombreux secteurs professionnels sont concernés par les risques biologiques et la survenue d'affections respiratoires chez les salariés en lien avec l'inhalation de bioaérosols: agro-alimentaire, agriculture, maintenance, traitement et valorisation des déchets, santé, tertiaire, etc (Balty et Bayeux-Dunglas, 2018). La mesure de l'exposition des travailleurs aux aérosols biologiques nécessite une démarche métrologique particulière qui apporte des informations utiles pour la prévention. Toutefois, les connaissances actuelles ne permettent pas d'établir une relation entre les niveaux de concentration mesurés et les symptômes observés. Ainsi, l'interprétation des données d'exposition aux bioaérosols en termes de risques encourus est encore incertaine ou repose sur des valeurs guides pragmatiques. Par conséquent, le développement des méthodes et des stratégies de mesure doit se poursuivre afin de mieux appréhender la complexité des expositions aux bioaérosols dans les environnements professionnels.

Une méthode de mesure comprend non seulement le prélèvement du bioaérosol (à l'aide de biocollecteurs) mais également sa conservation et son analyse. Le développement et la validation de telles méthodes de mesure repose sur des travaux complémentaires (a) de laboratoire sur des bioaérosols expérimentaux modèles, dans des conditions contrôlées et (b) de terrain sur des bioaérosols réels complexes, dans des conditions variables et non maîtrisées. L'approche de laboratoire permet ainsi, par exemple, d'évaluer les performances physique et biologique de différents biocollecteurs ou d'étudier une nouvelle méthode d'analyse en produisant simultanément de multiples échantillons contaminés de manière homogène et maîtrisée. La Figure 1 représente ainsi la démarche générale utilisée lors de l'évaluation des performances d'un protocole de mesure des bioaérosols.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24816 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

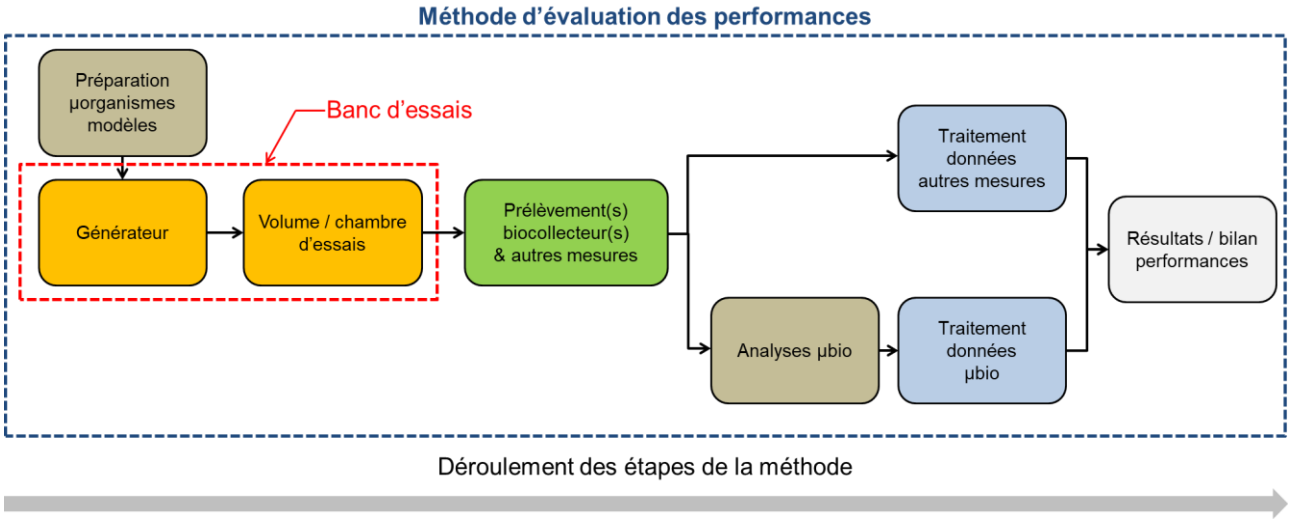

Figure 1. Démarche générale de la méthode d'évaluation des performances des protocoles de mesure des bioaérosols.

Cette démarche demande de disposer d'une expertise pluridisciplinaire, de savoir-faire (choix et préparation des microorganismes modèles, génération de bioaérosols expérimentaux, conduite d'analyses, traitement des résultats) et d'outils (banc d'essais, techniques analytiques). A ce jour, les différents éléments de cette démarche ne sont ni harmonisés entre les équipes de recherche, ni suffisamment encadrés par les textes normatifs (EN 13098, EN 14583). Les normes existantes sont trop générales pour permettre une réelle harmonisation des pratiques. Ainsi, de nombreux paramètres ne sont pas homogènes d'une étude à l'autre et dépendent à la fois des moyens à la disposition des différentes équipes ou des objectifs recherchés : méthode de mise en suspension des agents biologiques, caractéristiques de la chambre d'essai, modalités des essais, choix et préparation des microorganismes modèles, méthodes analytiques utilisées, traitement des résultats, etc.
Cette absence de consensus freine le développement et le transfert des méthodes de mesure des bioaérosols et rend difficile la comparaison des résultats et conclusions entre travaux de recherches. Ce manque d'harmonisation des pratiques a fait l'objet de discussions lors d'un congrès international à Vienne en 2016 intitulé « Bioaerosol chamber expert meeting » ainsi que lors d'un "Bioaerosol Standardization Workshop" à l'IAC 2018 et est régulièrement souligné dans la littérature (Simon et Loison, 2020).

Sur la base de ces constats, et convaincus de l'intérêt d'un travail d'harmonisation, un projet de recherche a été initié par les laboratoires de Métrologie des Aérosols de l'INRS, le Center for Health & Bioresources de l'AIT en Autriche ainsi que Biochemistry, Microbiology and Bio-informatics de l'Université Laval au Québec, chaque équipe possédant une expertise solide et reconnue en conduite d'expérimentations basées sur la génération de bioaérosols. S'appuyant sur des travaux de recherche et le partage de savoir-faire, ce projet a pour objectif principal de proposer des préconisations sur la mise au point et la validation des méthodes de prélèvement et d'analyse des bioaérosols (*e.g.* la mesure des performances de biocollecteurs).
Afin de répondre à cet objectif, plusieurs échanges scientifiques entre les trois laboratoires ont souligné l'intérêt d'un travail expérimental d'inter-comparaison. En pratique, cela signifie principalement (i) la préparation (ii) la génération (ii) le prélèvement et (iv) l'analyse d'un bioaérosol issu d'un pool microbien complexe par chaque équipe sur son propre banc d'essai. Excepté les bancs d'essais, chaque étape doit être réalisée selon des modalités et des protocoles communs. Ce travail permettra d'objectiver et de comprendre les similarités ou différences de résultats obtenus à partir de bancs d'essais distincts.

2. MATERIELS ET METHODES

Le projet comporte 6 principales actions, qui se déroulent sur 36 mois. Certaines des actions décrites par la suite ont d'ores et déjà été initiées. Des résultats préliminaires ont été obtenus et sont actuellement en cours d'analyse et ne seront donc pas détaillés dans ce résumé.

2.1 Travaux préliminaires (action en cours):

Cette première étape vise à l'obtention d'un bioaérosol expérimental complexe constitué d'un mélange de plusieurs microorganismes.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24816 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

En s'appuyant sur l'expertise des différentes équipes, des travaux préliminaires ont consisté à choisir et discuter les microorganismes d'intérêt ainsi que les protocoles d'analyse associés :

- Afin de travailler avec un pool représentatif d'une biodiversité complexe, il a été décidé de travailler sur trois microorganismes issus de domaines microbiens différents : des spores fongiques (*Penicillium chrysogenum),* des spores bactériennes (*Geobacillus stearothermophilus*) ainsi qu'un coliphage (ΦX174). Les microorganismes ont été choisis selon différents critères tels que les conditions de croissance et la distribution granulométrique (permettant de les discriminer lors des analyses) ou encore leur résistance au stress. Les productions de phages et de spores bactériennes sont réalisées selon des protocoles détaillés partagés entre les trois équipes. Concernant les spores fongiques, elles ont été produites par l'AIT et envoyées à chaque laboratoire dans le but de standardiser au maximum la production.
- Le mélange des trois microorganismes est réalisé dans un tampon phosphate afin de conserver la viabilité des microorganismes.
- Afin de quantifier les microorganismes en solution et après aérosolisation, plusieurs méthodes d'analyses sont utilisées : culture aux conditions spécifiques de chaque microorganisme (T° et temps de croissance, milieu de culture), extraction et quantification du génome par qPCR et quantification sur cellule de comptage pour les spores fongiques.
- Outre les concentrations en agents microbiens, d'autres paramètres devront être mesurés par chaque équipe lors de la génération : suivi en temps réel de la concentration en nombre de particules et distribution granulométrique du bioaérosol généré (TSI OPS 3330, TSI NanoScan 3910, DEKATI ELPI+), humidité relative, température de l'air, etc.

2.2 Traitement de données, recherche d'indicateurs, incertitudes (action en cours):

Cette étape vise à proposer une procédure commune de recueil et de traitement des résultats de mesure et notamment la recherche d'indicateurs de performances pertinents, capables d'intégrer les données, nombreuses et diversifiées, qui seront obtenues. De plus, chaque laboratoire devra évaluer les incertitudes globales sur l'ensemble de son processus de mesure (génération + prélèvement + analyse ; Figure 1).

2.3 Inter-comparaisons analytiques sur des suspensions

Une étude d'inter-comparaison des méthodes analytiques doit être préalablement menée sur les suspensions microbiennes dans chaque laboratoire. Ce travail est nécessaire à la fois pour vérifier la standardisation du protocole commun de préparation des cultures liquides avant génération mais également la maîtrise des protocoles harmonisés des méthodes d'analyse (concentration cellulaire, concentration en copies de génomes, etc.). Au cours de l'étude, il conviendra de décider si l'envoi d'échantillons croisés est pertinent pour vérifier la maîtrise des protocoles d'analyse.

2.4 Pré-essais de génération de bioaérosols et choix des modalités expérimentales (action en cours)

Lors de cette étape, chaque laboratoire réalise des essais de génération avec son propre banc d'essais afin de déterminer la plage de concentrations qu'il lui est possible de générer pour chaque microorganisme. Le fait que chaque équipe utilise son propre banc d'essais constitue le point essentiel de cette étude comparative.

- Le banc d'essais GENBIO proposé par l'INRS est composé d'un générateur bulleur de bioaérosols et d'une enceinte de comparaison (Figures 2a et 2b). La mise en suspension dans l'air des microorganismes s'effectue par bullage d'air comprimé à travers un film de suspension liquide microbienne, suivant une méthodologie décrite précédemment (Simon *et al*, 2011). L'enceinte est constituée d'une entrée conique d'une longueur d'environ 50 cm et d'une zone d'échantillonnage cylindrique (longueur de 35 cm et diamètre d'environ 40 cm) dans laquelle deux biocollecteurs peuvent être placés côte à côte, au sein du flux d'air. La géométrie de l'enceinte permet d'insérer deux tiroirs qui accueillent chacun un dispositif de prélèvement.
- Le banc d'essais proposé par l'AIT est composé d'un générateur bulleur de bioaérosols commercial et d'une chambre d'essais à flux laminaire vertical (Figure 2c). Sa description et ses données de validation sont détaillées dans une récente publication (Pogner *et al*., 2019).
- Le banc d'essais de l'Université Laval n'est pas encore précisé. En effet, l'équipe dispose de plusieurs bancs d'essais et devra choisir celui qui sera utilisé pour mener l'étude comparative. Le générateur devrait être de type nébuliseur ou atomiseur (Figure 2d).

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2021-24816 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

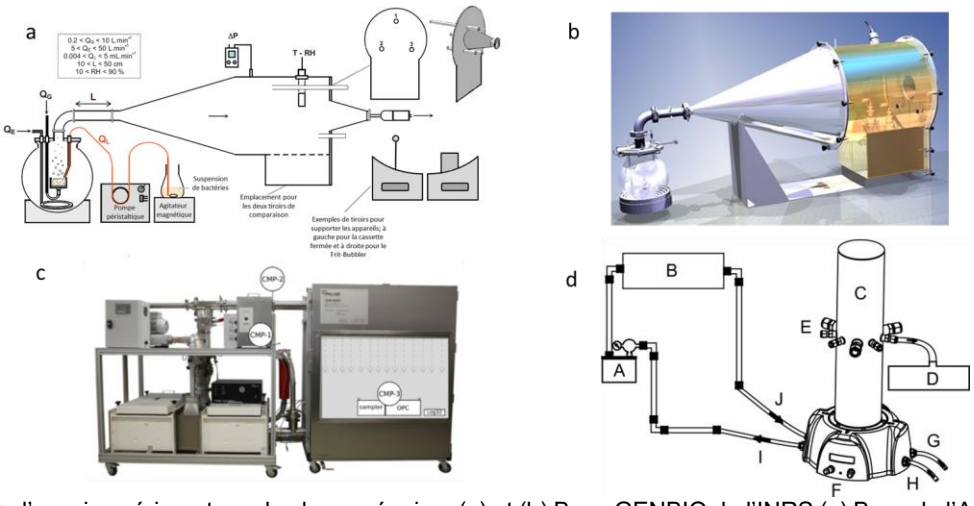

Figure 2: Bancs d'essai expérimentaux de chaque équipe. (a) et (b) Banc GENBIO de l'INRS (c) Banc de l'AIT (d) Exemple de banc de l'Université Laval.

Les essais expérimentaux reposeront sur l'utilisation et l'étude des performances de deux biocollecteurs candidats : la cassette fermée 3 pièces de 37 mm de diamètre qui constituera le support de collecte en voie sèche sur filtre en polycarbonate et le BioSampler SKC (20 mL) qui constituera le dispositif représentatif d'un mode de collecte en voie liquide. Le liquide de collecte (ou la solution d'élution) utilisé pour ces deux biocollecteurs sera du PBS + Tween 20 à 0,01%.
Cette action permettra de définir précisément les plages de concentrations que chacun des partenaires est capable de générer pour chaque microorganisme. Ceci permettra de choisir les niveaux de concentrations (≥ 3) communs à utiliser dans l'étape d'inter-comparaison.

2.5 Conduite des expériences / travaux en inter-comparaison

Cette étape constitue le point central du projet. En effet, c'est lors de cette action expérimentale que les biocollecteurs candidats et les méthodes analytiques associées seront étudiés dans le banc d'essais de chaque partenaire. Les essais se dérouleront selon les protocoles et les modalités expérimentales définies lors des actions précédentes. Ces expérimentations seront réalisées le plus conjointement possible entre les trois laboratoires afin de pouvoir réaliser d'éventuels ajustements de protocoles, si nécessaire. C'est cette action, particulièrement innovante, qui permettra d'objectiver et de comprendre les similarités ou différences de résultats obtenues à partir de bancs d'essais distincts.

2.6 Recueil, compilation et interprétation des résultats

Le recueil et le traitement de données seront par la suite mis en œuvre par chaque équipe, en utilisant la procédure commune élaborée lors de l'étape 2. Les résultats seront ensuite mis en commun, discutés et interprétés collégialement. En cas de résultats hétérogènes ou contradictoires (comme parfois observés dans la littérature), il s'agira d'utiliser l'ensemble des données mesurées afin de (1) comprendre les raisons de ces différences et/ou (2) d'obtenir des résultats comparables en ayant recours à des indicateurs de performances pertinents et plus exhaustifs. En fonction des conclusions, il conviendra de statuer sur la nécessité de mener d'autres séries de travaux expérimentaux comparatifs.

3. CONCLUSION :

Ces travaux d'inter-comparaison permettront de proposer des préconisations d'harmonisation internationale de méthodes d'évaluation des performances de biocollecteurs et plus largement, de protocoles de mesures des bioaérosols. Au-delà de ces avancées, la prise en main et la production d'un bioaérosol complexe constitué de trois microorganismes différents permettront de valider des méthodes de mesure dans des conditions plus représentatives des atmosphères professionnelles. Le poster présentera la méthodologie générale du projet mais également les éléments de caractérisation physique et microbiologique des bioaérosols expérimentaux de bactéries, moisissures et phages, seuls et en mélange.

Balty I. and Bayeux-Dunglas M-C. (2018) Hygiène et Sécurité du Travail 252, 24-28.
Pogner C, Konlechner A, Unterwurzacher V, Kolk A, Hinker M, Mölter L, et al. (2019) Aerosol Sci Technol. 53(4), 355-70.
Simon, X., Duquenne, P., Koehler, V., Piernot, C., Coulais, C. and Faure M. (2011) J Aerosol Sci 42, 517-531.
Simon, X. and Loison, P. (2020) Reference Module in Life Sciences, 10 p. (https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00009-3)