

L'OUVERTURE DES TUBES CENTRIFUGÉS GÈNÈRE-T-ELLE DES AÉROSOLS ?

X. Simon¹, R. Payet¹

¹Laboratoire de Métrologie des Aérosols du Département Métrologie des Polluants
Institut National de Recherche et de Sécurité, France

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

TITLE

Does the opening of centrifuged tubes generate aerosols?

RÉSUMÉ

Ces travaux avaient pour objectif de produire des données scientifiques inédites permettant de se prononcer sur l'existence d'une émission de particules ou de gouttelettes lors de l'ouverture de tubes centrifugés.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce new scientific data making it possible to rule on the existence of an aerosol's emission when opening centrifuged tubes.

MOTS-CLÉS : boîte à gants, bruit de fond, compteur de noyaux de condensation, compteur optique de particules /
KEYWORDS: glove box, background particle concentration, condensation particle counter, optical particle counter

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Depuis de nombreuses années, l'INRS est régulièrement questionné, notamment par des laboratoires manipulant des liquides biologiques, sur l'existence réelle et les risques associés à une émission de bioaérosol (particules et/ou gouttelettes) lors de l'ouverture de tubes centrifugés. Les travailleurs de ces laboratoires craignent en effet que l'ouverture de tels tubes, immédiatement ou rapidement après une centrifugation, puisse conduire à l'inhalation des particules qui pourraient être émises et provoquer une exposition professionnelle à des bioaérosols.

De nombreuses procédures portant sur les bonnes pratiques de laboratoire mentionnent en effet clairement qu'une émission d'aérosols peut se produire au cours de différentes manipulations ou étapes de traitement d'un échantillon liquide. La centrifugation et l'ouverture de tubes sont fréquemment identifiées comme des « activités de routine » présentant un risque d'émission d'aérosols. Li *et al* (2012) précisent que ~80% des infections contractées lors de manipulations en laboratoire résultent de pratiques normales et habituelles et ne sont pas imputables à des situations accidentelles. Selon eux, l'inhalation de particules infectieuses aérosolisées lors de manipulations en routine d'échantillons compte pour une grande part des infections contractées au laboratoire. Par ailleurs, des articles scientifiques ou d'autres documents, parfois récents, rappellent que les échantillons à risques (sang, urine, suspension microbienne, préparation pharmaceutique, liquide céphalo-rachidien, etc.), doivent être manipulés par du personnel technique portant des équipements de protection individuel et dans un poste de sécurité microbiologique de classe II, conformément aux directives de l'OMS (2004) et des CDC (2020). Dans le cas de centrifugations de tels fluides à caractère infectieux, l'OSHA (2011) recommande d'attendre 10 minutes après l'arrêt complet du rotor avant d'ouvrir le couvercle de la centrifugeuse et les tubes centrifugés. Cette recommandation peut ensuite varier d'un document à l'autre et le temps d'attente recommandé peut être compris entre 10 et 30 minutes.

En première approche, il paraît en effet tout à fait concevable qu'une procédure de manipulation d'un échantillon qui transmet de l'énergie à une suspension microbiologique puisse être à l'origine de la production d'un aérosol contenant des particules biologiques, des agents infectieux, des acides nucléiques, etc., comme le stipulaient Collins et Kenedy (1999). En 2004, Barkham expliquait, brièvement et uniquement de manière théorique, que le débouchage d'un tube de prélèvement provoque l'émission de particules et de gouttelettes du fait d'un phénomène d'égalisation des pressions entre l'intérieur du tube et la pression ambiante. Toutefois, les preuves scientifiques et expérimentales de la réalité, de la fréquence et de l'ampleur de ce phénomène d'émission, notamment s'agissant de la question précise de l'ouverture de tubes centrifugés, restent parcellaires pour ne pas dire inexistantes.

Ainsi, une recherche bibliographique consciencieuse, axée entre autres sur les journaux spécialisés sur les aérosols, n'a pas permis de réunir d'éléments concrets publiés qui permettraient d'attester de la survenue ou de l'absence d'une émission d'aérosols lors de l'ouverture de tubes centrifugés. Ce constat a été récemment relayé par Dubuis et Duchaine (2021) dans un contexte de manipulations d'échantillons en lien avec la pandémie de SARS-CoV-2. Ces auteurs reconnaissent qu'en 2021, à leur connaissance, les données quantitatives concernant la génération d'aérosol sur ce type de procédure de laboratoire n'existent pas ou ne sont pas disponibles dans la littérature.

Dubuis et Duchaine (2021) ont ensuite mené une étude afin de déterminer si les principales procédures pré-analytiques menées sur des échantillons (sang et urine) dans un laboratoire de biochimie clinique pouvaient produire des aérosols. Quatre procédures de laboratoire courantes susceptibles de produire des aérosols ont été sélectionnées : ouverture de tubes de prélèvement sanguin, aliquotage avec pipettes de transfert jetables, centrifugation de tubes d'échantillon de sang et agitation vortex d'échantillons d'urine. Les essais ont été menés grâce à une bactérie modèle : *Serratia plymuthica* (ATCC 4261). Les résultats des prélèvements d'air (placés à 40 - 50 cm de l'activité) montrent que la bactérie modèle, volontairement insérée dans les échantillons, n'a été détectée dans aucune des mesures « aérosol » réalisées. Les conclusions générales mentionnent que le risque professionnel pour les travailleurs apparaît comme faible en termes d'exposition aux aérosols concernant le traitement des échantillons de patients atteints du SARS-CoV-2.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux expérimentaux était de produire des données scientifiques inédites permettant de statuer quant à l'existence d'une émission de particules ou de gouttelettes lors de l'ouverture de tubes centrifugés et, le cas échéant, de caractériser les aérosols émis.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les essais ont été menés dans une boîte à gants selon une approche basée sur l'utilisation d'instruments de mesure aérosols en temps réel (compteur de noyaux de condensation et compteur optique de particules).

Les ouvertures de tubes centrifugés ont été menées dans une boîte à gants spécialement équipée afin d'abaisser au maximum la concentration en nombre de particules ambiantes dans la zone d'essais (Figure 1). La boîte à gants est pourvue d'un sas pour pouvoir faire entrer les tubes après centrifugation dans un délai le plus court possible tout en préservant la qualité du bruit de fond de l'environnement à l'intérieur de l'enceinte.

Deux débitmètres massiques thermique (Brooks) permettent d'alimenter l'intérieur de la boîte à gants et du sas avec de l'air comprimé filtré, exempt de particule. L'air propre est injecté dans la boîte à gants par deux buses équipées de frittés pour diffuser l'air à faibles vitesses (~0,8 cm/s). Un échappement équipé d'une capsule HEPA est installé à l'opposé de l'admission d'air. La perte de charge de la capsule engendre une légère surpression dans la boîte à gants, empêchant ainsi les particules présentes dans le laboratoire (environ 800 p/cm³) d'entrer dans la boîte à gants. L'ensemble des parois de la boîte à gants, du sas, ainsi que les gants ont été préalablement et régulièrement nettoyés minutieusement à la lingette humide pour enlever les poussières et le talc qui auraient pu être remis en suspension lors des essais.

Deux instruments en temps réel, dédiés à la mesure de la concentration en nombre de particules avec une fréquence d'acquisition d'un point par seconde, ont été utilisés : un compteur optique de particules Promo 2300 (COP Palas – 5 L/min – 0,2 à 10 µm) et un compteur de noyaux de condensation CNC 3007 (TSI – 0,7 L/min – 0,01 à >1,0 µm). A noter que la vitesse d'aspiration dans la sonde de prélèvement du CNC (~12 cm/s) est ~15 fois supérieure à la vitesse de balayage de l'air propre dans la boîte à gants et que cette condition constitue un paramètre favorable pour le captage d'éventuelles particules qui seraient émises.

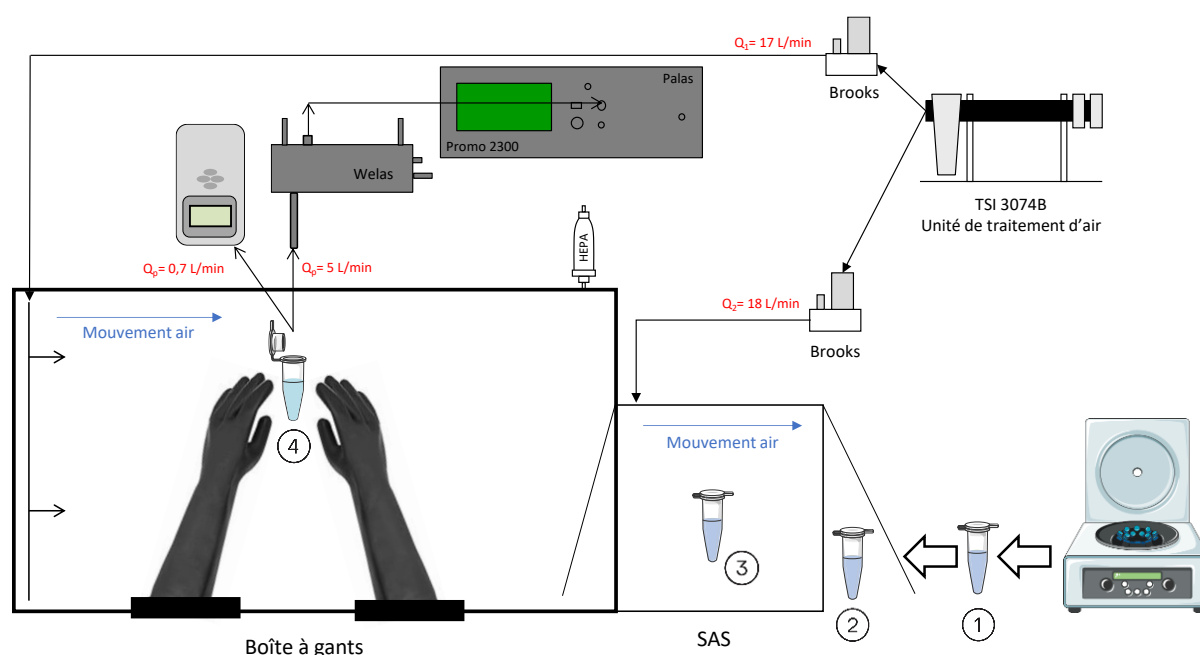


Figure 1 : Illustration du banc d'essais. Parcours du tube pendant l'essai : (1) le tube est centrifugé pendant 2 min puis immédiatement sorti de la centrifugeuse, (2) transfert du tube dans le sas, (3) mise en attente du tube pour renouveler l'air propre dans le sas et (4) transfert du tube dans la boîte à gants et ouverture devant le CNC et le COP.

Dix types de tubes différents, classiquement utilisés dans les laboratoires de recherche ou d'analyses médicales, ont été étudiés. Ils présentent des contenances (0,5 à 50 mL) et des bouchons de fermetures (à visser ou à enclipser) différents. Les tubes ont été remplis avec une solution tampon de phosphate salin (ou PBS pour phosphate-buffered saline) couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et du chlorure de potassium. En général, la concentration de ces sels est représentative de celle rencontrée dans le corps humain (isotonicité). Il y a deux avantages à avoir utilisé ce liquide d'essais : 1) il s'agit d'un liquide aqueux qui peut a priori avoir une propension à former un aérosol plus importante qu'un liquide organique visqueux ; 2) l'émission éventuelle d'un aérosol lors de l'ouverture d'un tube récemment centrifugé conduirait soit à la formation d'une gouttelette, soit à la formation d'une particule de sel résiduelle si l'eau de la gouttelette venait à s'évaporer dans l'air ou dans la ligne de prélèvement. Les caractéristiques et performances des instruments de mesure en temps réel utilisés sont adaptés à tous les cas de figure, autant pour la détection de gouttelettes microniques ou submicroniques que pour des particules de sel submicroniques ou nanométriques. Le taux de remplissage des tubes a été volontairement élevé (compris entre 75% et 95%), en formulant l'hypothèse que cela constituait un élément favorable à la création d'un aérosol consécutivement à l'ouverture d'un tube centrifugé.

En fonction de la nature et de la taille du tube, deux modèles de centrifugeuses Eppendorf ont été utilisées : centrifuge 5910 R et centrifuge 5418. Deux cycles de centrifugation ont été étudiés : 1 min à 1500 g et 10 min à 3000 g, précédé de 30s d'accélération et suivi de 30 s de décélération. Les tubes étaient systématiquement ouverts pendant 20 s (étape 4 de la Figure 1) et ce, 60 s après la fin du cycle de centrifugation. Ce temps d'attente court entre la fin de la centrifugation et l'ouverture des tubes pourrait constituer une condition favorable à l'émission de particules, en comparaison aux temps d'attente recommandée compris entre 10 et 30 min. Trois répétitions ont été réalisées par type de tube et par vitesse de centrifugation. Des tubes vides ont également été manipulés et ouverts pour caractériser le bruit de fond en l'absence de liquide. Les signaux temporels mesurés par le CNC sur les tubes centrifugés remplis de liquide ont ensuite été traités et moyennés. Les valeurs des concentrations moyennes en particules ont été comparées à celles obtenues pour des tubes vides, ainsi qu'à celle de l'aérosol de fond présent dans la boîte à gants. Un traitement statistique de type test T de Student a été effectué pour comparer les moyennes de concentrations en nombre sur trois répétitions au niveau de signification de 0,05 (OriginPro, version 2019b).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Aucune particule n'a jamais été mesurée au cours des essais avec le COP Promo 2300.

Des exemples de résultats de mesures au CNC, pour certains tubes et pour une vitesse de centrifugation de 1500 g, sont synthétisées sur la Figure 2.

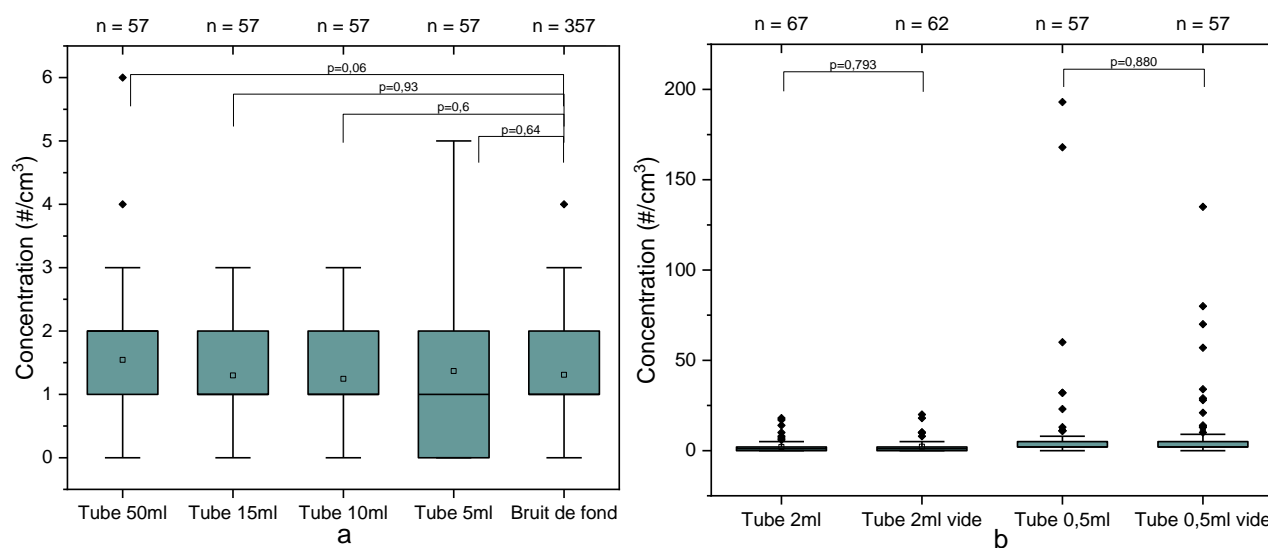


Figure 2 : Représentation des données de concentrations mesurées au CNC sous forme de boîtes à moustaches pour 6 types de tube (a - bouchon à visser ; b - bouchon à enclipser). Les valeurs de probabilité p issues du test de Student pour la comparaison des moyennes sont également indiquées sur les graphiques.

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations mesurées lors de l'ouverture des tubes centrifugés contenant du PBS et pourvus de bouchons de fermeture à visser (Figure 2a) et les concentrations en particules mesurées en tant que bruit de fond dans la boîte à gant.

De même, les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les concentrations mesurées lors de l'ouverture des tubes centrifugés contenant du PBS et pourvus de bouchons de fermeture à enclipser (Figure 2b) et les concentrations en particules mesurées lors de l'ouverture des mêmes lots de tubes vides. Les concentrations en nombre lors de l'ouverture de ces lots de tubes présentent des pics de valeurs de quelques secondes qui sont semblables que les tubes soient remplis de PBS ou vides et qui n'existent pas pour les tubes présentant des bouchons à visser. Par conséquent, les particules détectées proviennent de la friction du bouchon à enclipser contre le tube lors de l'ouverture de celui-ci et n'ont pas pour origine le liquide centrifugé contenu dans le tube.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude indiquent que, dans les conditions d'essais, il n'y a pas d'émission de particules submicroniques (mesures par CNC) ou de gouttelettes microniques (mesures par COP) en lien avec le contenant liquide (PBS) lors de l'ouverture de tubes centrifugés. Ils sont d'autant plus notables que certaines conditions d'essais semblaient initialement favorables à une émission de particules :

- l'existence de vitesses d'aspirations induites par le CNC ou le COP qui aurait pu favoriser le captage d'éventuelles particules émises (et qui n'existent pas en situation normale de manipulation des tubes) ;
- le choix du PBS comme liquide d'essais qui, en tant que liquide aqueux, pourrait avoir une propension à former un aérosol plus importante qu'un liquide organique visqueux et qui conduirait, dans tous les cas, à la détection d'une émission soit directement sous forme de gouttelettes, soit indirectement sous forme de particules de sel résiduelles si l'eau de la gouttelette venait à s'évaporer au cours de son transport ;
- un temps d'attente court d'une minute entre la fin de la centrifugation et l'ouverture des tubes qui pourrait constituer une condition favorable à l'émission de particules, en comparaison aux temps d'attente recommandés compris entre 10 et 30 min.

Les résultats viennent ainsi confirmés, par une approche différente et en ciblant cette fois l'émission au plus proche du tube, les conclusions générales de Dubuis et Duchaine (2021) qui mentionnaient que le risque professionnel pour les travailleurs manipulant ces tubes apparaît comme faible en termes d'exposition aux aérosols.

Dans les conditions expérimentales employées, l'absence de détection de particule dans les conditions les plus favorables à leur production tend à montrer l'absence d'émission d'aérosol lors de l'ouverture de tubes centrifugés. Ces résultats permettent d'apporter un regard critique sur les recommandations actuelles concernant cette opération. Dans le même temps, ils appuient scientifiquement l'élaboration de recommandations plus adaptées. Ainsi, au regard de cette étude, il ne paraîtrait pas justifié d'attendre entre 10 et 30 minutes avant d'ouvrir les tubes centrifugés, ni de faire porter des appareils de protection respiratoire aux personnels ouvrant des tubes centrifugés.

Remerciements

Les auteurs remercient (a) Lise Alonso pour ses recherches lors de l'achat de la boîte à gant et le traitement de certains résultats, (b) Sébastien Bau pour son apport dans la représentation et le traitement de certains résultats, (c) Marielle Pfrimmer et (d) Cécile Dziurla pour leur implication technique dans les essais expérimentaux et (e) Christine David pour les échanges sur le sujet, sur le choix des tubes et pour son travail sur l'évolution des recommandations.

Références

- Barkham, T.M.S. (2004) *Ann. Aca. Med.* 33(2), 252-256.
- Collins, C.H., and Kennedy, D.A. (1999) *Laboratory-acquired infections : history, incidence, causes and prevention.* 4th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 324 p.
- Dubuis, M.-E., and Duchaine, C. (2021) *Front. Public Health* 9, 5 p..
- Li, Z., Li, J., Zhang, Y., Li, L., Ma, L., Li, D., Gao, F., and Xia, Z. (2012) *Virology* 9, 146-153.
- WHO (2004) *Laboratory biosafety manual.* 3rd ed. 178 p.
- CDC (2020) Available from: <https://www.cdc.gov/sars/guidance/f-lab/app5.html>. 2020.
- OSHA (2011) *OSHA QuickFacts - Laboratory Safety Centrifuges.*
Available from: <https://www.osha.gov/Publications/laboratory/OSHAquickfacts-lab-safety-centrifuges.pdf>.