

## 2 Recherche et développement

Pour quantifier la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'air, la méthode utilisée par Muscatello décrit l'utilisation d'un appareil à impaction, le M Air T (Millipore) dans lequel sont insérés des milieux de culture solides spécifiques NANAT. Une hybridation permet de détecter les souches virulentes comportant vap A. Dans cette étude l'appareil est placé à 5 cm du sol. En 2009, le laboratoire de pathologie équine de Dozulé a fait l'acquisition d'un appareil à impaction du même type : l'air idéal 3P® possédant les mêmes caractéristiques. Les essais pratiqués dans les haras bas-normands ont mis en évidence des résultats décevants et des difficultés à distinguer les souches virulentes des souches avirulentes. Nous avons donc comparé différentes techniques de collecte de la bactérie dans l'air et développé des protocoles pour obtenir des résultats optimaux.

### 2.1 REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LIEUX CONTAMINÉS

#### 2.1.1 Les lieux

##### 2.1.1.1 Les parcelles, milieu extérieur

Dans un premier temps, nous avons souhaité tester différents types d'analyseurs microbiologiques. Dans cette perspective, il nous a d'abord fallu recréer des situations établies afin de pouvoir comparer les appareils dans des conditions identiques. Nous avons donc créé des lieux contaminés artificiellement par *Rhodococcus equi*. Ainsi le 25 août 2010 nous avons délimité deux parcelles carrées de 4 mètres de côté, initialement indemnes de *Rhodococcus equi*. Ces parcelles, situées au sud du bâtiment de l'unité d'Épidémiologie et d'Anatomie Pathologie (ÉAP) du laboratoire de pathologie équine de l'ANSES, ont été contaminées par *Rhodococcus equi*. De plus, pour reproduire les variations observées selon le type de terrain, nous avons décidé de laisser une parcelle plantée d'une herbe abondante et de retourner la terre de la deuxième pour obtenir une parcelle entièrement bêchée et donc davantage poussiéreuse par temps sec (photographie n° 5). Ce dernier type de parcelle est appelé parcelle « en terre » est présenté à la photographie n° 6. Chaque parcelle a été délimitée par une clôture afin de prévenir toute entrée par inadvertance. Des surchaussures à usage unique sont nécessaires pour rentrer sur chaque parcelle.

*Photographie n° 5: Du côté sud du bâtiment de l'unité de l'ÉAP, les deux parcelles contaminées par Rhodococcus equi. Au sud, côté est, la parcelle contaminée en herbe*



*Photographie n° 6: Au sud, côté ouest, la parcelle contaminée en terre*



### 2.1.1.2 Le box, milieu confiné

Afin de pouvoir comparer par la suite les concentrations de *Rhodococcus equi* dans l'air ainsi que les performances des appareils, nous avons également reproduit les conditions d'un milieu confiné contaminé. Nous avons retenu le modèle du box paillé comme le montrent les photographies n° 7 et n° 8. Il s'agit d'un box carré de 3,5 mètres de côté, fermé par une porte en bois et correctement paillé. Nous avons choisi ce type de modèle car le box paillé est le plus communément rencontré dans les élevages. De plus la paille est une litière propice à la mise en suspension de particules dans l'air contrairement au lin ou bien aux copeaux. Ce box est initialement indemne en *Rhodococcus equi*.

Photographie n° 7: Les box vus de l'extérieur



Photographie n° 8: Le box paillé contaminé



### 2.1.2 Protocole de contamination

Le protocole utilisé pour ensemer les surfaces est reproduit pour assurer une contamination similaire. Nous avons utilisé une souche de *Rhodococcus equi* virulente issue de la souchothèque construite à partir de souche isolées lors des autopsies. La souche utilisée est celle prélevée sur le poulain Urola recueillie en 2005. Les souches de *Rhodococcus equi* sont conservées à -80 °C sur cryobilles.

*Matériel :*

- Souche de *Rhodococcus equi* virulente sur cryobille,
- 36 ml de BHI Biomérieux (milieu Brain Heart Infusion dont la composition est donnée en annexe n° 1),
- 4 tubes avec leurs bouchons,
- Autoclave,
- Pipette graduée 100 µl,
- Pipeteur automatique,
- 4 bouteilles de 500 ml,
- Gants en latex,
- 2 l de milieu cœur cerveau,
- 10 kg de crottins frais exempts de *Rhodococcus equi*,
- Boîte de gélose ANC (composition en annexe n° 2).

*Protocole :*

- Mettre 2 cryobilles contenant la souche de *Rhodococcus equi* dans 9 ml de BHI Biomérieux,
- Répéter cette opération pour avoir 4 tubes distincts,
- Mettre ensuite ces préparations à + 37 °C pendant 24 h,
- Préparer 2 l de milieu de culture cœur cerveau,
- Stériliser le milieu à + 121 °C pendant 15 min à l'autoclave,
- Mélanger le contenu d'un tube de culture de *Rhodococcus equi* à 500 ml de milieu cœur cerveau stérilisé,
- Mettre en culture les 4 bouteilles obtenues à + 37 °C pendant 48 h sous agitation,
- Prélever 100 µl pour le comptage et ensemercer une boîte de gélose ANC,
- Mélanger ensuite le contenu d'une bouteille à 2,5 kg de crottins indemnes de *Rhodococcus equi* et fraîchement récoltés.

Avant le mélange avec les crottins, un comptage est réalisé. Le comptage révèle la présence de  $4.10^8$  *Rhodococcus equi*/500 ml de solution soit  $1,6.10^5$  *Rhodococcus equi*/g de fèces. Les crottins contaminés sont donc déposés le 30 août 2010 d'une manière assez homogène dans les parcelles côté sud. Elles sont désormais contaminées.

La préparation des cultures de *Rhodococcus equi* destinées à la contamination du box paillé a débuté le 8 septembre 2010. Les crottins contaminés sont déposés dans le box le 13 septembre 2010. Un comptage avant le dépôt des crottins a révélé la présence de  $4.10^6$  *Rhodococcus equi* par gramme de fèces.

### 2.1.3 Vérifications périodiques de la persistance de la contamination

Plusieurs contrôles du niveau de contamination ont été menés suite à cette opération de contamination. Nous avons donc vérifié la présence de *Rhodococcus equi* le 8 septembre, le 30 septembre et le 20 octobre. Pour évaluer ce niveau, nous avons prélevé du crottin en surface ainsi que de la terre à environ 5 centimètres de profondeur sous les crottins. Un prélèvement de terre situé entre les deux parcelles contaminées constitue le témoin négatif. Ce site est distant d'environ 2 mètres de chaque parcelle contaminée.

#### Matériel :

- Balance,
- Eau physiologique stérile,
- Pipette graduée de 100 µl,
- Pipeteur automatique,
- Bec bunsen,
- Tubes 50 ml à fond conique et leurs bouchons,
- Pipette râteau,
- Étuve,
- Boîte de gélose ANC,
- Agitateur mécanique,
- Gants en latex.

#### Protocole :

- Peser 1 g de terre ou de fèces,
- Y ajouter 40 ml d'eau physiologique stérile,
- Placer sous agitation pendant 30 min à + 37 °C,
- Prélever 100 µl de la préparation obtenue et les déposer sur une gélose ANC,
- Étalement avec une pipette râteau,
- Placer les boîtes de gélose à +37 °C durant 24 puis 48 heures,
- La première lecture a donc lieu 24 h après ensemencement et la deuxième 72 h après ensemencement.

L'utilisation d'une gélose ANC Columbia avec 5 % de sang de mouton permet l'inhibition des bactéries Gram négatives grâce à la présence de deux antibiotiques : la colimycine et l'acide nalidixique. *Rhodococcus equi* est présent dans les fèces et dans les prélèvements de terre des parcelles contaminées en terre et en herbe. Enfin le témoin négatif qui était un échantillon de terre situé en dehors des parcelles contaminées est exempt de *Rhodococcus equi*. Nous avons donc recréé des conditions expérimentales exploitables.

## 2.2 RELEVÉ DES CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES

Afin de pouvoir repérer les paramètres météorologiques qui interviendraient dans des variations de la concentration de *Rhodococcus equi* dans l'environnement, nous avons déterminé et mis au point des protocoles pour réaliser ces relevés.

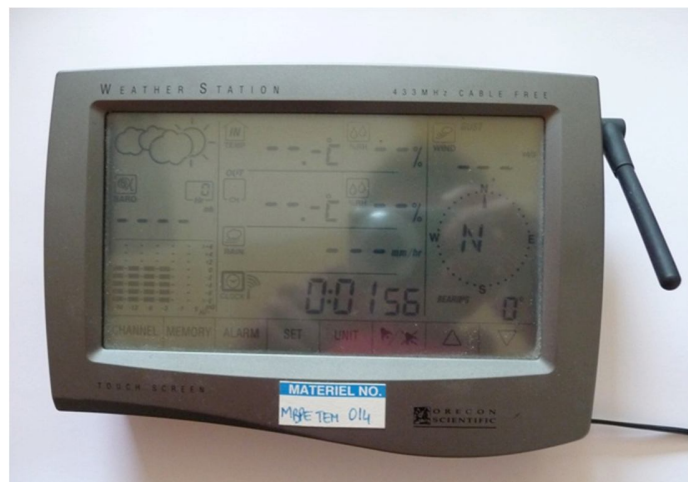
### 2.2.1 Les paramètres météorologiques étudiés dans la bibliographie

D'après la littérature, les conditions climatiques pourraient être en lien avec la concentration en *Rhodococcus equi* dans l'environnement ou bien l'incidence de la rhodococcose chez les poulains présents. Ainsi, les jours « venteux » et « secs » sont associés à une augmentation de la concentration de *Rhodococcus equi* dans le sol alors que les jours pluvieux sont eux associés à sa diminution (Takai *et al.*, 1987). Plus récemment, la corrélation entre l'incidence clinique et certains paramètres environnementaux tels que : l'humidité du sol, la hauteur de l'herbe, le pH du sol mais aussi des paramètres purement climatiques : température, humidité de l'air ou vitesse du vent ont été étudiés (Muscatello *et al.*, 2006a).

### 2.2.2 Les paramètres relevés avec la première station météorologique

Dès le début, il nous a paru important d'effectuer un relevé des conditions climatiques parallèlement aux mesures environnementales. Dans un premier temps, nous avons utilisé une station météorologique disponible dans le laboratoire de l'ANSES. La photographie n° 9 montre cette station de marque OREGON SCIENTIFIC® permettant une mesure de la température et de l'anémométrie grâce à des sondes fixées sur une potence fabriquée par nos soins (photographie n° 10). Les informations étaient transmises en temps réel par ondes radio à une centrale portable. Cette station s'est avérée très rapidement obsolète et encombrante.

Photographie n° 9: la centrale OREGON SCIENTIFIC®



Photographie n° 10: Les sondes fixées sur la potence



Photographie n° 11: La sonde CONRAD®



### 2.2.3 Les paramètres relevés avec la deuxième station météorologique

Afin de poursuivre le relevé des paramètres climatiques, nous avons donc fait l'acquisition d'une sonde CONRAD®, plus petite, plus maniable et offrant davantage de fonctionnalités. Ainsi outre la mesure de la vitesse du vent et la température, cette sonde évalue également l'hygrométrie. Cette sonde, présentée à la photographie n° 11 permet de réaliser des mesures instantanées. Elle n'autorise pas la programmation, les moyennes, ou la mémorisation.

Nous avons alors établi un protocole pour le relevé des conditions météorologiques. Après avoir relevé la date, les heures de l'expérience, nous notons si le temps est sec ou pluvieux puis nous mesurons la température, l'hygrométrie ainsi que l'anémométrie selon la direction du vent dominant.

Après avoir défini nos conditions expérimentales et nos instruments de mesures climatiques, nous pouvons désormais mettre à l'épreuve les analyseurs microbiologiques.

## 2.3 PRÉLÈVEMENTS D’AIR

### 2.3.1 Quantification de *Rhodococcus equi*

Les aérosols sont définis comme une suspension, dans un milieu gazeux, de particules solides ou liquides présentant une vitesse de chute négligeable (ISO 3649). Les bioaérosols sont des microorganismes aéroportés. Nous avons recherché les échantillonneurs d’aérosols disponibles sur le marché qui pourraient être susceptibles de recueillir *Rhodococcus equi* en aérosols. La détection et la quantification des micro-organismes dans les échantillons peuvent être ensuite effectuées par le biais des méthodes d’analyse utilisées en microbiologie. À ce titre nous avons rencontré Monsieur Didier Huonnic, agent de l’ANSES Ploufragan étudiant la qualité de l’air (Huneau-Salaun *et al.*, 2011) et ses conséquences sur la santé humaine dans les élevages de poules pondeuses (Huneau-Salaun *et al.*, 2010). Cette rencontre s’est tenue fin août 2010 à l’ANSES Ploufragan dans les Côtes d’Armor. Au cours de cette entrevue, Monsieur Huonnic et son équipe ont partagé leur expérience dans le domaine de l’échantillonnage des aérosols puis ont réalisé une démonstration du fonctionnement de deux types d’appareils : le Capteur individuel de Particule (CIP) et la pompe Deluxe 224-PCMTX8. Ensuite Monsieur Huonnic nous a prêté les appareils et les accessoires d’échantillonnage d’aérosol afin que nous puissions mener nos essais comparatifs. De notre côté, l’ANSES Dozulé disposait d’un autre échantillonneur d’aérosol, l’Air idéal<sup>®</sup>3P. Ce collecteur d’aérosols à impaction, semblable à celui décrit dans la technique proposée récemment (Muscatello et Browning, 2004), avait été acquis en 2009 pour une pré étude. Nous avons pu procéder à la comparaison de ces 3 analyseurs microbiologiques de l’air en toute objectivité dans des conditions définies. Avant de présenter les résultats des essais comparatifs, nous allons revenir sur les caractéristiques détaillées de chaque appareil ainsi que leur fonctionnement.

#### 2.3.1.1 Présentation du CIP, de l’Air idéal<sup>®</sup>3P et de la pompe DELUXE

##### 2.3.1.1.1 L’Air idéal<sup>®</sup>3P

###### 2.3.1.1.1.1 Caractéristiques

C’est ce type d’appareil qui a été utilisé par Muscatello *et al.* dans la seule technique décrite pour quantifier *Rhodococcus equi* dans l’air. L’Air idéal<sup>®</sup>3P est commercialisé par la société BioMérieux. Il a été développé pour les industriels du médicament comme outil garantissant un échantillonnage de l’air scientifiquement éprouvé. Il est également adapté au dénombrement de micro-organismes aéroportés issus d’environnements de travail moins contraignants comme l’industrie agroalimentaire. Il existe en deux versions : l’une permettant l’utilisation de milieux de culture en boîtes de Pétri de 65 ou 70 mm et l’autre conçue pour être

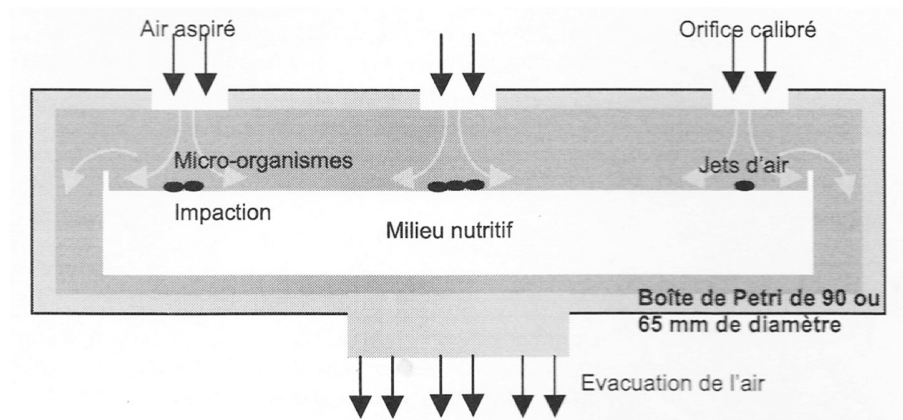


utilisée avec des boîtes de 90 mm de diamètre. C'est de cette dernière version dont nous disposons (photographie n° 12). Son numéro de série est le 091861. Il est étalonné annuellement par un laboratoire indépendant, le CETIAT. Il possède un débit d'aspiration de 100 l/min. Il a été certifié conforme pour la valeur de 100 l/min +/- 6,6 l/min. L'appareil est livré avec 5 cribles de prélèvement et est compatible avec une large gamme de milieu de culture. Il est utilisable dans une grande plage de température de +0 à +40 °C et d'hygrométrie ambiante de 0 à 95 %. Le crible de prélèvement est autoclavable. Il est conseillé de le stériliser pendant 18 minutes à +134 °C. L'Air idéal®3P est programmable et peut se suspendre à un crochet ou bien être maintenu par ses poignées. L'autonomie annoncée est de 5 heures de prélèvement

### 2.3.1.1.2 Mode de fonctionnement

L'Air idéal®3P est un collecteur d'air par impaction. C'est à dire que l'air aspiré passe à travers une série d'orifices et les particules viennent s'impacter sur une surface cible placée sur le trajet du flux d'air. Il permet donc la mise en évidence de germes viables présents dans l'environnement à contrôler par échantillonnage d'un volume d'air donné. L'air est aspiré par une turbine au travers d'une surface criblée comme le décrit la figure n° 1. L'accélération du flux d'air permet l'impaction des germes aéroportés sur la gélose.

Figure n° 1: Schéma présentant le principe de fonctionnement par impaction



Avant tout prélèvement, il faut avoir stérilisé le crible, décontaminé le circuit d'air ainsi que la partie extérieure. Nous mettons l'appareil sous tension et nous choisissons le volume du prélèvement. Nous enlevons alors la protection pour placer la boîte de pétri munie de son couvercle entre les clips de fixation. Nous ôtons son couvercle puis vissons le crible de prélèvement. Il faut alors mettre en route le prélèvement. À la fin de celui-ci, nous dévissons le crible de prélèvement (photographie n° 13) pour replacer le couvercle non contaminé sur la boîte de Pétri. Plusieurs programmes permettent de réaliser des prélèvements différés ou bien séquencés. La boîte de Pétri peut alors être analysée.

*Photographie n° 12: Présentation de l'Air idéal® 3P. Vue de la face avant montrant l'orifice d'aspiration, les lamelles de fixation et le capot de prélèvement*



*Photographie n° 13: Vue rapprochée du crible, échelle 1 :3*



### 2.3.1.1.3 Mise en culture du prélèvement et analyse

#### Matériel :

- Boîtes de gélose ANC extraites de l'Air idéal®3P,
- Étuve.

#### Méthode :

- Placer les boîtes de gélose à l'étuve à +37 °C pendant 24 puis 48 h,
- Première lecture 24 h puis 72 h après la mise à l'étuve.

Les boîtes doivent être incubées le plus rapidement possible. Après incubation, il faut compter le nombre d'UFC. Une correction statistique suivant la loi de Feller détaillée en annexe n° 3 permet de calculer le nombre probable de germes collectés par boîte. Cette correction traduit le passage aléatoire des germes à travers le crible autrement dit la probabilité que plusieurs germes traversent le même orifice et ne soient comptabilisés comme une seule colonie. Cependant pour un petit nombre d'UFC comptabilisées, cette correction est minime

### 2.3.1.1.2 La pompe DELUXE 224-PCMTX8

#### 2.3.1.1.2.1 Caractéristiques

La pompe DELUXE est fabriquée par la société anglaise SKC® et commercialisée en France par la société ARELCO. La pompe DELUXE possède un débit réglable de 500 à 4000 ml/min à +/- 5 % le débit initial. Elle s'arrête automatiquement s'il est impossible de maintenir un débit constant sur plus de 20 secondes. Le débitmètre à bille est incorporé. La batterie présente une autonomie de 8 heures. Le modèle testé est la pompe 224-PCMTX8. Il s'agit de la version programmable permettant de réaliser des prélèvements sur 7 jours avec branchement sur secteur. Elle autorise des prélèvements à des températures ambiantes s'échelonnant de -20 à +40 °C et une hygrométrie comprise entre 0 et 95 %.

*Photographie n° 14 : La pompe DELUXE, son tuyau, son porte cassette et ses cassettes de prélèvement.*



Elle est entièrement programmable pour réaliser des prélèvements différés ou bien séquencés. Un écran à cristaux liquide affiche le temps de fonctionnement effectif. L'autonomie de la batterie diffère quelque peu selon le débit d'aspiration choisi, mais est supérieure à 10 heures dans tous les cas. Le constructeur assure qu'elle est construite dans un matériau extrêmement résistant. Elle est livrée avec une sacoche qui permet de porter la pompe sur soi. Un banc d'étalonnage est également commercialisé afin de pouvoir ajuster soi-même le débit.

#### *2.3.1.1.2.2 Mode de fonctionnement*

La pompe située dans le boîtier entraîne un flux d'air provoquant une aspiration à proximité d'une cassette fixée sur son porte cassette. L'air entre par l'orifice de la cassette puis les aérosols aspirés s'impactent sur une membrane filtrante située au fond de la cassette. Il s'agit d'un échantillonnage par impaction. Les cassettes sont des boîtes filtres assemblées en usine afin d'obtenir une étanchéité parfaite de la cassette, une absence de contamination du filtre et un gain de temps dans la préparation du prélèvement.

Pour débiter un prélèvement, il faut avant tout s'assurer que le tuyau est correctement connecté à la pompe. Ensuite, nous fixons la cassette de prélèvement sur le porte cassette. Il est nécessaire d'ôter le bouchon de la cassette à usage unique avant de pouvoir la fixer. Il suffit alors d'appuyer sur le bouton « ON » puis de refermer la grille plastique de protection à l'aide d'un tournevis. Le compteur se déclenche sur l'écran LCD. A la fin du temps déterminé pour le prélèvement, nous ouvrons la grille de protection pour appuyer sur le bouton « OFF ». Il faut alors extraire la cassette puis la reboucher.

#### *2.3.1.1.2.3 Mise en culture du prélèvement et analyse*

Le traitement des cassettes peut se révéler fastidieux. Aussi dans l'unité de Monsieur Huonnic, les cassettes étaient envoyées au Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris pour y être analysées. Étant encore en phase d'essai et pour des raisons de coût, nous avons réalisé nous-même l'analyse des cassettes conformément à la norme NF ISO 16000-17 (février 2009). Le prix de chaque cassette atteint les 5 euros hors taxes. Il nous aurait fallu ajouter les frais d'envoi et de traitement.

### *Matériel :*

- Eau physiologique stérile,
- NaCl,
- Tween 80,
- Pince brucelles,
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Bec Bunsen et PSM,
- Étuve,
- Autoclave,
- Géloses sang,
- Pipette râteau,
- 2 flacons en verre de 1 000 ml,
- Pots en plastique stérile avec bouchon de 180 ml,
- Gants en latex.

### *Protocole*

- Préparation de la solution saline (8,5g de NaCl / 1 000 ml d'eau distillée),
- Préparation de la solution saline + tween 80 (ou polysorb 80) + 150 µl de tween 80,
- Stériliser les 2 solutions avant ajout de tween à +121°C pendant 15 min,
- Ouvrir la cassette sous le PSM et récupérer le filtre avec une pince bucelle stérile,
- Déposer le filtre dans 5 ml de solution saline stérile +tween 80 puis l'agiter à +37 °C pendant 15 min,
- Après avoir « essoré le filtre », faire des dilutions à  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  du prélèvement,
- Déposer 100 µl de chaque dilution dans 2 boîtes de gélose sang (duplicata) et ensemercer avec une pipette râteau (manipulation près d'un bec bensen),
- Placer les géloses à +37 °C,
- Les lectures sont réalisées quotidiennement pendant 72 h.

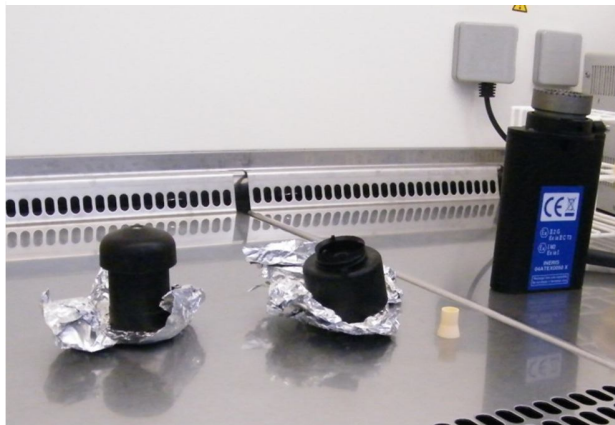
#### 2.3.1.1.3 Le capteur individuel de particules CIP 10 M

##### *2.3.1.1.3.1 Caractéristiques*

Le CIP 10 est un petit appareil de prélèvement de poussières en suspension dans l'air. Il a été conçu et développé dans les années 1980 au Centre d'Études et de Recherches de Charbonnage de France (CHERCHAR) désormais Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS). Il a été ensuite étudié à l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Il est fabriqué et commercialisé sous licence INERIS par ARELCO. En 2003, une nouvelle coupelle pour l'échantillonnage de microorganismes a été validée. Le CIP 10 équipé de cette coupelle a été baptisé CIP 10 M. C'est cette dernière version que nous étudierons dans un premier temps. Le CIP 10 présente des caractéristiques particulières intéressantes. Il est de petite

taille, compact, léger, et possède un niveau sonore faible. Son architecture modulaire permet de sélectionner la fraction de l'air désirée pour le prélèvement (photographie n° 15). Cette notion est explicitée au paragraphe 2.3.1.1.3.2. L'aspiration est omnidirectionnelle avec un chapeau protecteur contre la pénétration, indésirable, de grosses particules ou de gouttes d'eau. Enfin, il fonctionne dans toutes les positions.

*Photographie n° 15: Le CIP 10 M et sa coupelle métallique ainsi que les différents étages de la tête alvéolaire*



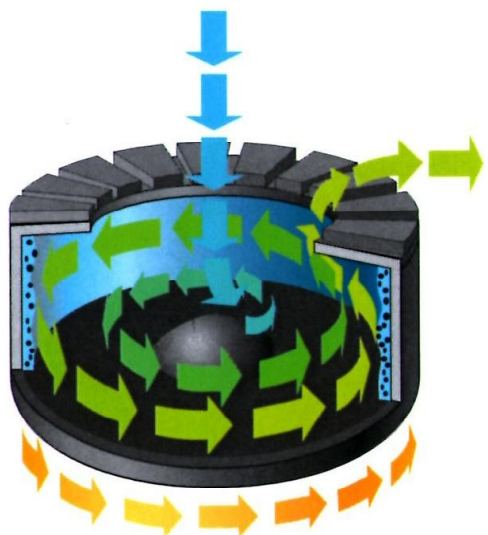
Le CIP pèse environ 300 grammes. Il possède un débit de 10 l/min de grande stabilité. Les vis spéciales de fixation des éléments ferment le CIP avec une grande sécurité. La mise en route et l'arrêt s'opèrent par effet électromagnétique. Une diode témoin du bon fonctionnement est présente sur le carter. L'autonomie annoncée dépasse les 40 heures. L'étalonnage est réalisé par le fabricant sur un banc d'étalonnage à pertes de charge compensées. Enfin le CIP 10 M, tout comme le CIP 10, offre la possibilité de travailler sur des fractions particulières des aérosols contenus dans l'air.

#### *2.3.1.1.3.2 Mode de fonctionnement*

Le CIP 10 M se présente sous la forme d'un bloc comportant dans sa partie supérieure une coupelle rotative de prélèvement des particules sélectionnées. Dans sa partie inférieure, le boîtier plat renferme les organes de fonctionnement tels que le moteur, les batteries qui actionnent le moteur, et le circuit électronique de régulation commandant la vitesse du moteur.

Le CIP 10 M est un collecteur d'aérosols par « impingement ». Cette technique consiste à provoquer un contact entre le flux d'air et un liquide de collecte. Le CIP 10 M comporte une coupelle rotative d'échantillonnage pour micro-organismes contenant le milieu liquide BHI. Cette coupelle est montée sur l'arbre du moteur tournant à grande vitesse à l'intérieur d'une enceinte comportant une entrée d'air axiale et une sortie d'air tangentielle. Le moteur actionne la rotation de la coupelle qui génère par la suite le débit d'air par effet ventilateur et assure la captation de la fraction d'air total (figure n° 2). L'air est ainsi aspiré par une fente omnidirectionnelle d'échantillonnage, formée par le corps de la buse. Il suit ensuite un circuit jusqu'à la coupelle rotative. Le flux d'air est amené vers le liquide de collecte grâce à une dépression créée par le frottement de l'air sur les faces verticales du liquide et sur ses autres faces. Un mouvement hélicoïdal est créé par le flux d'air aspiré pour déposer en douceur sur le fluide, les cellules vivantes et garantir leur viabilité.

Figure n° 2: Schéma présentant le principe de fonctionnement de la coupelle rotative du CIP 10M (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO)



Au-dessus de la coupelle rotative, il est possible de fixer des têtes d'échantillonnage différentes contenant des filtres qui permettent d'échantillonner une fraction d'air déterminée. Selon la norme ISO 7708 :1996, il existe une variabilité interindividuelle importante quant à la probabilité d'inhalation, de dépôt, de réaction au dépôt et d'élimination des particules. C'est-à-dire que placés dans les mêmes conditions, deux individus peuvent interagir différemment devant les aérosols. Néanmoins, il est possible de définir des conventions pour l'échantillonnage sélectif en taille des particules en suspension dans l'air. Ainsi, il existe une relation entre le diamètre aérodynamique et les fractions mesurées approchant les fractions pénétrant dans les régions de l'appareil respiratoire. Des modèles mathématiques modélisent le transport des aérosols dans les poumons (Moussa, 2009). Les particules totales sont toutes les particules en suspension dans un volume d'air donné. Ainsi la fraction inhalable est la fraction massique des particules totales en suspension dans l'air inhalé par le nez et par la bouche. La fraction thoracique est la fraction

massique des particules inhalées pénétrant au-delà du larynx. La fraction alvéolaire est la fraction massique des particules inhalées qui pénètrent dans les voies aériennes non ciliées (figure n° 3). La sélection des particules respirables alvéolaires est réalisée par un passage dans une mousse de polyuréthane de grade 45 (45 pores par pouce linéaire) suivie d'une filtration sélective par une autre mousse de même grade (figures n° 4 et n° 5). Les mousses sélectrices portent un nom différent (sélecteur et impacteur) du fait de leurs différences de formes. Cependant leur rôle est strictement le même.

Figure n° 3: Schéma présentant la répartition des particules de la fraction alvéolaire selon leur taille. (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8) Le pourcentage de pénétration traduit la probabilité de retrouver une particule d'un diamètre donnée au sein des alvéoles pulmonaires

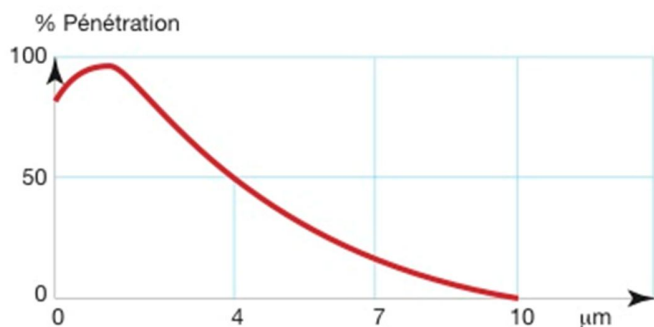


Figure n° 4: Schéma des éléments composant la tête alvéolaire d'un CIP (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8)

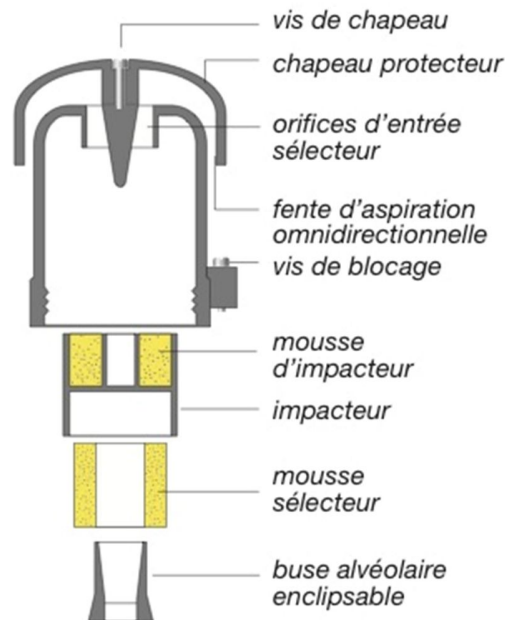
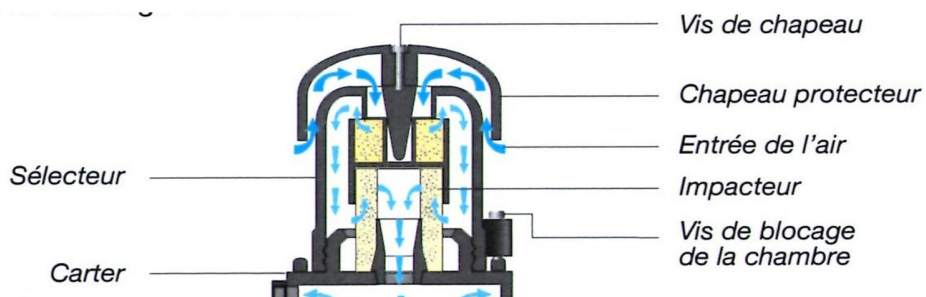


Figure n° 5: Schéma présentant trajet de l'air dans le CIP 10 R (extrait du manuel d'utilisation du CIP, édité par ARELCO, page 8)





Le CIP 10 peut également prélever la poussière totale. Pour cela, il faut d'utiliser une tête alvéolaire dont on ne conservera que le carter et la buse. Ainsi, l'ensemble des particules en suspension dans l'air, y compris les sédimentables peut pénétrer dans le CIP 10. En outre, le CIP 10 M permet d'échantillonner les fractions thoraciques et inhalables. Il convient de se fournir les têtes appropriées. Pour débiter nos expériences, il nous a paru judicieux de travailler sur la fraction alvéolaire de l'air puisque nous pensons que la bactérie *Rhodococcus equi* pourrait être véhiculée par des particules alvéolaires, du moins pour la fraction qui serait probablement pathogène, c'est à dire capable d'atteindre les voies pulmonaires inférieures et notamment les alvéoles. La courbe de la fraction alvéolaire ci-dessus montre que la grande majorité des particules de cette fraction ont une taille inférieure à 7 µm (figure n° 3). Nous avons donc choisi le modèle CIP 10 MR.

#### 2.3.1.1.3.3 Mise en culture du prélèvement et analyse

Après la phase de prélèvement, le CIP 10 M est transporté au laboratoire puis le contenu de la coupelle est déposé dans un tube stérile sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) et ce après avoir noté le volume récolté. Au début de cette phase de recherche et développement, nous avons choisi de travailler sous le poste de sécurité microbiologique pour procéder aux manipulations de la coupelle rotative du CIP. En effet nous avons voulu nous prémunir d'une éventuelle contamination. Nous avons développé le protocole suivant afin de mettre en culture le milieu BHI contenant les aérosols recueillis :

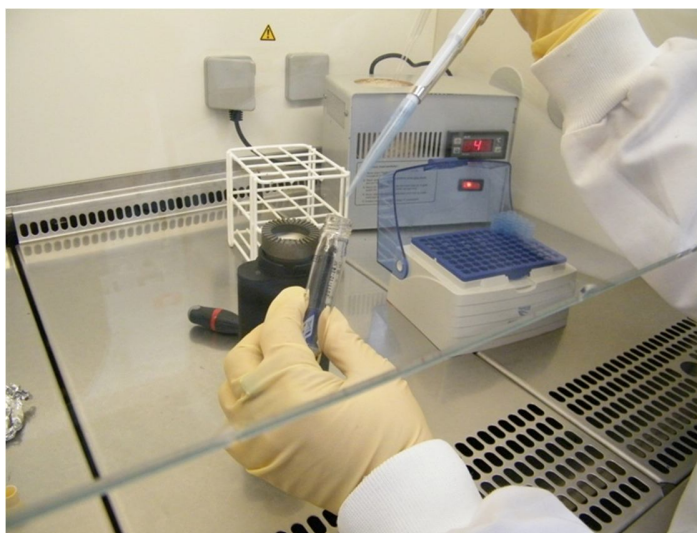
##### *Matériel :*

- Pipettes graduées, pipettes Pasteur pipette râteau et pipeteur automatique,
- Petits Tubes stériles en plastique, bouchons et portoir,
- Micropipettes de 100 – 1000 µl et de 10 – 100 µl et ses cônes,
- Milieu BHI et Gélose ANC + 5 % de sang de mouton,
- Bec Bunsen et PSM,
- Étuve,
- Gants en latex.

##### *Méthode :*

- Récupérer le liquide dans la coupelle. Mesurer le volume à l'aide d'une pipette graduée et le transférer dans un petit tube en plastique stérile à boucher (photographie n° 16),
- Réaliser une dilution à 10<sup>-1</sup> dans un petit tube en plastique stérile (le plus souvent 100 µl de liquide dans 900 µl de BHI),
- Réaliser un étalement à partir de 100 µl à l'aide d'une pipette râteau sur gélose ANC + 5 % de sang de mouton pour chaque dilution (0 et -1),
- Incuber 24 h à 48 h à + 37 °C.

*Photographie n°16: Prélèvement du BHI contenant les bioaérosols. Cette étape se réalise sous le poste de sécurité microbiologique*



### **2.3.1.2 Étude de sélection d'un appareil**

#### **2.3.1.2.1 Étude comparative du CIP 10MR et de l'Air idéal®3P**

##### **2.3.1.2.1.1 En extérieur**

Cette expérience est l'occasion de comparer les résultats obtenus par deux appareils de mesures différents dans des conditions strictement identiques d'utilisation. Elle a eu lieu le 2 septembre 2010 au centre de la parcelle contaminée en herbe. Pour prendre en considération des expositions différentes, nous avons construit une potence en bois sur laquelle il est possible de fixer le CIP 10 MR à deux hauteurs différentes : 15 cm correspondant au « port de tête bas » d'un poulain et 1,15 m correspondant au « port de tête neutre » d'un poulain de 4 mois. Nous avons également tenté cette expérience pour différents temps de prélèvements afin de pouvoir comparer les quantités de *Rhodococcus equi* recueillies. Enfin un obstacle supplémentaire vient s'ajouter puisque la coupelle rotative du CIP 10 MR est remplie d'un milieu liquide susceptible de s'évaporer ; nous avons donc veillé à quantifier le volume exact restant dans la coupelle au terme de chaque essai. Nous avons donc suivi cette évaporation du milieu BHI pour des temps de collecte différents.

Pour chaque essai, les conditions météorologiques ont été relevées (tableau n° 1). Compte tenu des débits d'aspiration différents entre les deux appareils, les mesures avec le CIP 10MR ont été réalisées avec l'appareil fixé à une potence tandis que l'Air idéal®3P a été tenu grâce aux

poignées prévues à cet effet (photographies n° 17 et n° 18). De plus, l'aspiration du CIP 10 MR est omnidirectionnelle tandis que celle de l'Air idéal®3P se fait à travers un crible verticale de manière unidirectionnelle. Nous avons donc choisi d'orienter l'Air idéal®3P face au vent. Pour éviter une contamination lors d'un changement de parcelle, les pieds de la potence ont été désinfectés avec une solution d'Argospray® dont la composition est présentée en annexe n° 4. Le débit d'aspiration du CIP 10 MR est de 10 l/min alors que celui de l'Air idéal®3P est de 100 l/min ; le temps de collecte avec le CIP est donc 10 fois plus long pour un volume d'air donné. La quantité de milieu BHI introduit dans la coupelle métallique du CIP est de 3 ml.

Tableau n° 1: Correspondance entre les volumes d'air prélevés et les temps de collecte respectifs à chaque appareil.

		Conditions climatiques relevées	Temps de collecte avec le CIP10 MR (min)	Temps de collecte avec l'Air idéal®3P (min)
Volumes d'air récoltés (l)	100	T=24,5 °C Vent Est Sud-est Ensoleillé	10	1
	300	T=23,0 °C Vent Est Nord-est Ensoleillé	30	3
	600	T=23,0 °C Vent Nord Nord-est Ensoleillé	60	6

L'utilisation simultanée de deux CIP 10 MR à deux hauteurs différentes permettait d'étudier les concentrations respectives en *Rhodococcus equi* dans l'air selon la hauteur de prélèvement (tableau n° 3). Parallèlement, cette expérience démontre que l'augmentation du temps de prélèvement diminue le volume recueilli par évaporation mais que cette diminution n'est pas préjudiciable puisque nous récupérons encore 1,7 ml de BHI en moyenne après 60 minutes, ce qui est largement assez pour réaliser l'ensemencement des milieux de culture par la suite (tableau n° 2). Ce temps de prélèvement et donc le volume d'air collectés peuvent donc encore être augmentés.

Tableau n° 2: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps

Temps de collecte avec le CIP MR (min)	Volume de solution de BHI dans la coupelle rotative (ml)	
	A 1,15 m de hauteur	A 15 cm de hauteur
10	2,1	2,2
30	2,1	2,1
60	1,6	1,8

Photographie n° 17: Les prélèvements en cours. L'Air idéal®3P collectant l'air à 15 cm du sol et les deux CIP 10 MR, l'un posé au sol et l'autre fixé sur la potence à 1,15 m de hauteur



Photographie n° 18: Fermeture du crible de l'Air idéal®3P avant le prélèvement à la hauteur de 15 cm

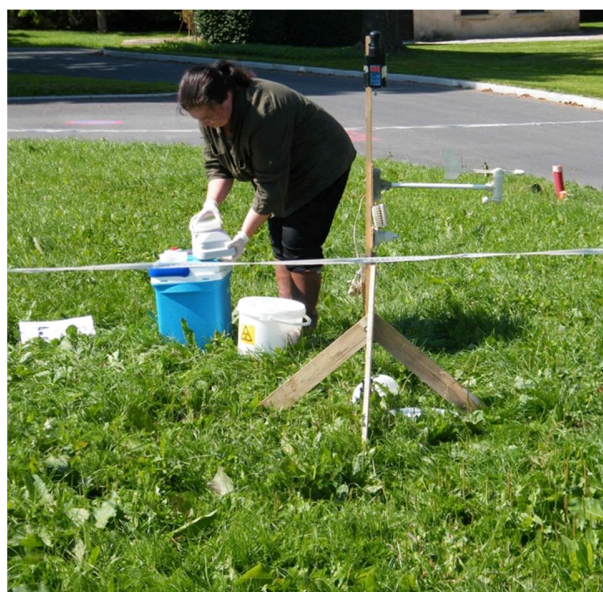


Tableau n° 3: Nombre colonies de *Rhodococcus equi* (en UFC) comptées sur chaque gélose à l'issue des lectures quotidiennes durant 72 heures en fonction du type d'appareil utilisé, du volume d'air collecté et de la hauteur de prélèvement

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10 MR				Air idéal® 3P	
Hauteur du prélèvement (cm)		15		115		15	115
Dilution		$10^0$		$10^{-1}$		<i>Pas de dilution possible</i>	
Volume d'air prélevé (l)	100	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0
	600	0	0	0	0	0	0

Les deux appareils ont le même positionnement dans l'espace. En revanche, les débits des appareils étant différents, les prélèvements ne sont pas exactement réalisés à des instants identiques. Cependant, il n'y a eu aucune variation climatique durant cette expérience ce qui vient appuyer la validité de notre essai.

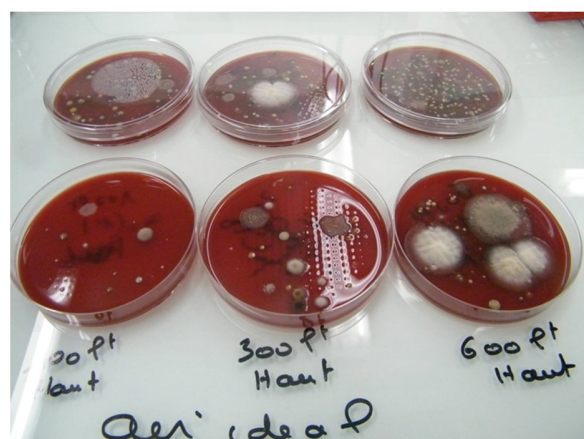
Pour le CIP 10 MR, nous avons réalisé des dilutions à  $10^{-1}$ . Ces dilutions permettaient d'obtenir une meilleure lisibilité si les géloses à  $10^0$  contenaient trop de colonies. Enfin, ces dilutions sont susceptibles de mettre en évidence un phénomène d'inhibition dans le cas où la compétition avec d'autres bactéries serait trop importante dans la gélose à  $10^0$ . C'est un des avantages du CIP 10 MR.

Les photographies n° 19 et n° 20 présentent les résultats obtenus après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés pour chaque appareil.

Photographie n° 19: Résultats obtenus avec le CIP 10 MR après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés



Photographie n° 20: Résultats obtenus avec l'Air idéal® 3P après 72 heures de culture pour les 3 volumes collectés



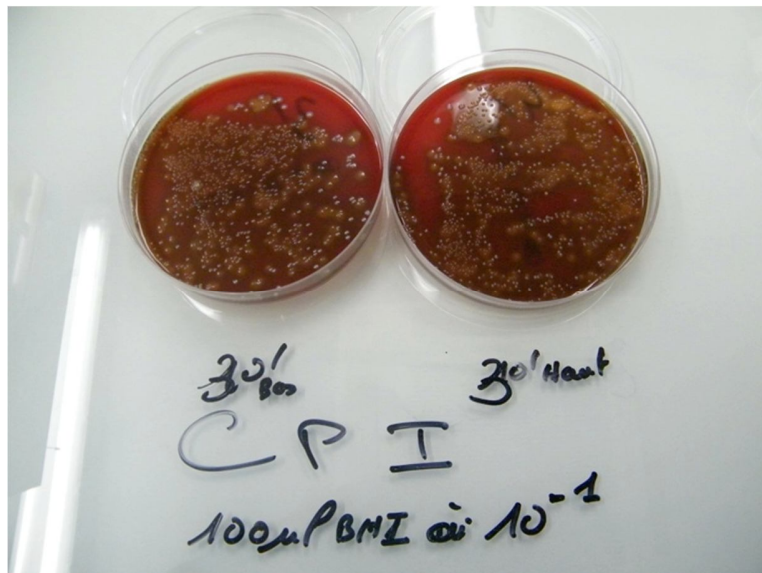
Cette première expérience n'a pas permis de mettre en évidence la présence de *Rhodococcus equi* dans les prélèvements d'air récoltés. Pourtant les conditions météorologiques y étaient plutôt favorables avec un temps sec, ensoleillé, une température à l'ombre de +25 °C. Plusieurs hypothèses permettent d'apporter des éléments d'explication: un protocole inadapté, une erreur dans le protocole, une trop faible contamination initiale, un temps de prélèvement trop court et donc un volume d'air récolté trop faible, de trop faibles quantité de poussières en suspension, une absence normale de *Rhodococcus equi* dans l'air, ou alors un milieu non confiné responsable d'une trop grande diffusion de *Rhodococcus equi*. Enfin, nous pouvons penser que la mise en suspension de la bactérie dans l'air a fait défaut du fait de l'absence de vent ou d'animaux en mouvement sur la parcelle.

Les performances d'un échantillonneur d'aérosol dépendent de sa capacité à collecter les micro-organismes présents dans l'air sans compromettre leur viabilité lors de l'impaction sur la gélose. Cette propriété ne peut être obtenue qu'au moyen d'un compromis entre une vitesse d'aspiration suffisamment élevée permettant une collecte d'air efficace et une vitesse d'impaction suffisamment faible garantissant la revivification des germes. L'inefficacité d'un collecteur d'air peut être due soit à un défaut de collecte des particules contenant les micro-organismes (pertes ou rejets), soit à une inactivation des micro-organismes lors de l'impact sur la surface cible.

La société Biomérieux assure avoir soumis l'air idéal® 3P au test de la capacité de collecte et revivification d'un mélange de *Bacillus subtilis* (indicateur de référence de la perte physique) et de *Staphylococcus epidermidis* (indicateur de référence de la perte biologique). Le ratio *S. epidermidis* / *B. subtilis* est alors calculé puis comparé au ratio obtenu avec l'échantillonneur à membrane filtrante qui constitue la référence (Manuel d'utilisation de l'air idéal® 3P, Biomérieux, REF 96307, version E 03/2008, page 2-4).

Toutefois, il s'avère que la lecture des résultats obtenus avec l'air idéal<sup>®</sup> 3P est fortement compliquée par la présence de moisissures recouvrant une grande partie des boîtes de gélose (photographie n° 20). De plus la répartition des colonies apparaît comme criblée. Cette répartition correspond au maillage du crible et fait ainsi ressortir un point faible de cet appareil. En effet, cette répartition est un biais pour la quantification de *Rhodococcus equi* puisqu'il y a une perte d'information sur le grillage. Le constructeur assure que ce défaut peut faire l'objet d'une correction statistique selon la loi de Feller (annexe n° 3) qui prend en compte la probabilité que deux colonies se superposent sur le milieu de culture solide après leur passage au travers du crible. Cependant cette correction semble valable uniquement pour plusieurs colonies d'une même bactérie. Qu'en est-il du même phénomène avec deux bactéries différentes ? Qu'en serait-il en extérieur dans un milieu fortement contaminé ? Nous sommes en droit de soulever ce problème en avançant la possibilité d'une inhibition systématique de la croissance de *Rhodococcus equi* lors d'une superposition avec une autre bactérie. De plus les bactéries qui viennent percuter la surface du crible sans s'impacter sur la gélose constitue une perte indéniable d'information. Ce sont des inconvénients inhérents au mode de prélèvement par impaction.

Photographie n° 21: Mise en culture de la solution BHI après la phase de prélèvement. Cette image montre l'intérêt des dilutions successives puisque même à la dilution  $10^{-1}$ , la gélose contient encore de très nombreuses colonies.



En revanche, les cultures réalisées avec le CIP 10MR sont parfaitement lisibles. Il n'y a pas de moisissures (photographie n° 21). L'aspect de la mise en culture traduit une répartition homogène grâce à une mise en solution puis un étalement avec la pipette râteau. Un autre avantage du CIP réside dans la possibilité de faire des dilutions successives afin d'améliorer la lisibilité.

Pour augmenter la probabilité d'isoler *Rhodococcus equi*, il faut prélever un volume d'air plus important en augmentant la durée du prélèvement ce qui est possible compte tenu du volume restant dans la coupelle du CIP 10 M après 60 minutes.

### 2.3.1.2.1.2 En intérieur, en box confiné

Cette étude comparative entre le CIP10 MR et l'air idéal<sup>®</sup>3P s'est poursuivie dans une deuxième expérience en milieu confiné et contaminé : le box de paille fermé. Une fois de plus, les deux appareils ont été utilisés dans les mêmes conditions, au même endroit en faisant varier le temps de prélèvement et donc le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement (photographie n° 22). La quantité de particules en suspension dans le box a été une autre variable introduite. Cette mise en suspension de particules a été provoquée par l'agitation de la paille.

#### 2.3.1.2.1.2.1 Sans agitation de la paille

Cette expérience a eu lieu le 16 septembre 2010 après avoir contaminé le box le 13 septembre 2010. Les paramètres d'ambiance sont restés constants au cours de l'après-midi avec une température de +22,3 °C et une hygrométrie de 52 %. Le box a été paillé avant sa contamination par les crottins. La potence permettant la fixation des sondes météorologiques et des CIP 10 MR est placée au centre du box. La porte du box est correctement fermée pour reproduire les conditions expérimentales d'un milieu confiné. Dans un premier temps, cette expérience a été réalisée sans agitation de la paille. Les seuls mouvements de personnes dans le box ont été liés à la mise en route et à l'arrêt des appareils.

*Photographie n° 22: La potence est installée au centre du box fermé avec les sondes avant le début des prélèvements*



*Tableau n° 4: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps lors de leur utilisation dans le box sans agitation de la paille*

Temps de collecte avec le CIP (min)	Volume de solution restant dans la coupelle rotative (ml)	
	A 1,15m de hauteur	A 15 cm de hauteur
10	2,8	2,8
30	2,6	2,6
60	2,5	2,5

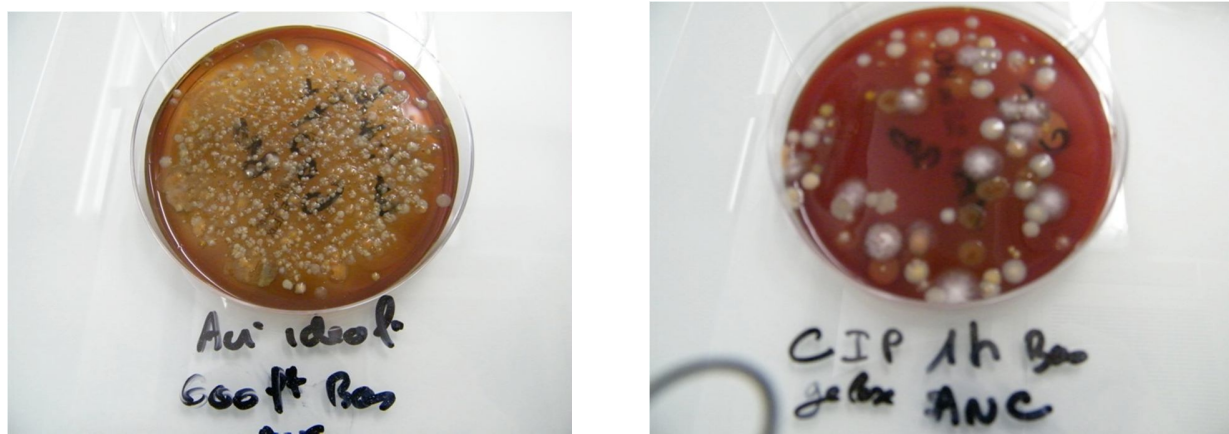


Pour ce qui est du CIP, les volumes recueillis sont très satisfaisants. Pour un temps de prélèvement donné, ils sont supérieurs à ceux obtenus en extérieur ce qui laisse supposer que le phénomène d'évaporation est moins important à l'intérieur (tableau n° 4). Ce phénomène d'évaporation est lié à l'hygrométrie ambiante. Nous n'avons pas encore pu réaliser le relevé de l'hygrométrie pour l'essai en extérieur mais celle-ci était très probablement inférieure à celle mesurée dans le box. Une trop faible hygrométrie peut être préjudiciable au fonctionnement du CIP 10 MR en diminuant le volume résiduel dans la coupelle à la fin du prélèvement. C'est un inconvénient du mode de prélèvement par « impigement » par rapport aux prélèvements par impaction. Nous rappelons que ce volume résiduel collecté à la fin du prélèvement a une importance capitale en ce qui concerne la qualité de l'analyse microbiologique puisqu'un volume trop faible ne permettrait pas de réaliser le nombre de copies souhaitées (duplicata, triplicata...) ou bien les dilutions successives. Il est donc déterminant de trouver un compromis entre un temps de prélèvement suffisamment long pour collecter un volume d'air représentatif et un temps de prélèvement suffisamment court pour pouvoir exploiter un volume intéressant. Dans cette optique, nous pouvons considérer qu'il ne faut absolument pas que ce volume soit inférieur à 0,6 ml dans l'hypothèse où nous souhaitions réaliser des triplicatas ainsi que des dilutions jusqu'à  $10^{-1}$ .

Tableau n° 5: Nombre colonies de *Rhodococcus equi* (en UFC) comptées sur chaque gélose selon le type d'appareil, le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement.

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10MR		Air idéal®3P	
Hauteur de prélèvement (cm)		15	115	15	115
Volume d'air collecté (l)	100	0	0	0	0
	300	0	0	1	0
	600	0	0	0	0

Photographie n° 23: Comparaison des résultats obtenus avec l'air idéal®3P et le CIP 10 MR pour un prélèvement de 600 litres à 15 centimètres du sol après 72 heures d'incubation. La gélose correspondant au CIP 10 MR est à la dilution 10<sup>0</sup>



Dans cette expérience, seule une colonie de *Rhodococcus equi* a été mise en évidence par l'air idéal®3P (tableau n° 5). Il est étonnant de dénombrer une colonie de *Rhodococcus equi* pour un échantillon de 300 l mais pas dans le volume supérieur de 600 l. Nous retrouvons l'aspect criblé sur les géloses pour tous les prélèvements réalisés avec cet appareil. Pour le CIP, seules de rares colonies d'entérocoques ont été observées (photographie n° 23). Cette présence d'entérocoques indique que le processus d'aspiration a bien fonctionné puisqu'on les retrouve normalement dans l'air. Pour cette expérience, nous n'avons pas effectué les dilutions successives pour le CIP 10 MR. Les géloses pour la dilution 10<sup>0</sup> étaient tout à fait lisibles.

Nous avons donc voulu comparer cette situation à une situation où la paille serait agitée dans le box. Il y aurait alors davantage de particules mises en suspension et donc potentiellement des aérosols plus nombreux.

#### 2.3.1.2.1.2.2 Avec agitation de la paille

La même expérience a été reproduite le 30 septembre 2010 mais avec agitation de la paille cette fois-ci. La température était de +16,8 °C et l'hygrométrie de 62 %. Nous avons provoqué une mise en suspension des particules en agitant la paille autour de la potence. Une personne a donc marché autour de la potence pendant toute la durée de chaque prélèvement afin de mettre la paille en agitation tel qu'un cheval pourrait le faire dans son box paillé.

Tableau n° 6: Volumes de BHI recueillis pour chaque CIP MR en fonction du temps lors de leur utilisation dans le box avec agitation de la paille

Temps de collecte avec le CIP (min)	Volume de solution restant dans la coupelle rotative (ml)	
	A 1,15 m de hauteur	A 15 cm de hauteur
10	2,8	2,8
30	2,7	2,7
60	2,6	2,6

De nouveau nous avons relevé les volumes obtenus dans la coupelle rotative après prélèvement (tableau n° 6). Ils sont voisins de ceux notés lors de l'expérience précédente en milieu confiné sans agitation (tableau n° 4). Ils sont quelque peu supérieurs ce qui peut s'expliquer par une hygrométrie plus élevée dans cette dernière expérience, 62 % contre 52 % auparavant.

Tableau n° 7: Nombre colonies de *Rhodococcus equi* (en UFC) comptées sur chaque gélose selon le type d'appareil, le volume d'air collecté et la hauteur de prélèvement.

Nombre de colonies (UFC)		CIP 10 MR		Air idéal® 3P	
Hauteur de prélèvement (cm)		15	115	15	115
Volume d'air collecté (l)	100	0	0	2	1
	300	0	0	2	1
	600	3	0	2	1

Tout d'abord, ces résultats sont globalement cohérents puisque l'on retrouve, à un volume d'air collecté égal, davantage de colonies de *Rhodococcus equi* dans les essais avec agitation (tableau n° 7). Cela suggère le rôle primordial des poussières dans l'aérosolisation de *Rhodococcus equi*. En ce qui concerne la hauteur, nous retrouvons systématiquement davantage de colonies de *Rhodococcus equi* pour les prélèvements effectués à proximité du sol que pour ceux réalisés en hauteur. La proximité de la source de contamination semble donc jouer un rôle. Il serait intéressant de connaître la répartition théorique des particules selon la hauteur.

Pour le CIP 10 MR, nous avons obtenu pour la première fois du *Rhodococcus equi*. Nous avons ainsi compté 3 UFC pour le prélèvement le plus proche du sol pour le plus gros volume d'air collecté. La concentration en *Rhodococcus equi* mesurée avec le CIP est donc de 5 UFC/m<sup>3</sup> de poussières alvéolaires de l'air. Le mode de calcul est disponible en annexe n° 5 et un exemple est présenté au paragraphe 2.3.1.4.1. Bien que les valeurs mesurées pour les autres prélèvements soient nulles, il apparaît cohérent de dénombrer davantage dans ce dernier cas où finalement l'exposition du CIP MR est maximale.

En revanche, pour l'air idéal<sup>®</sup>3P, quel que soit le volume d'air collecté, nous obtenons toujours le même nombre de colonies de *Rhodococcus equi*. Cela signifie que nous dénombrons autant de colonies pour un volume d'air collecté 6 fois plus important. Cette incohérence pourrait entre autres s'expliquer par un phénomène de superposition des bactéries dû au mode de prélèvement par impaction. De plus la qualité de mise en culture n'est pas en faveur de l'utilisation de l'air idéal<sup>®</sup>3P puisque que nous sommes confrontés, de manière inconstante mais récurrente, à l'apparition de moisissures qui compromettent la lecture des géloses. En effet, la taille des trous du crible de l'air idéal<sup>®</sup>3P est de 6 mm de diamètre, ce qui peut autoriser le passage de moisissure comme *Candida* de 500 µm de diamètre.

Enfin, nous avons constaté que l'air idéal<sup>®</sup>3P a permis de collecter en tout dans cette expérience 3 fois plus de colonies de *Rhodococcus equi* que le CIP 10 MR. Ayant fait ce constat, il ne faut pas oublier que l'air idéal<sup>®</sup>3P collecte les bactéries contenues dans la totalité de l'air alors que le CIP 10 MR ne dénombre lui uniquement les bactéries contenue dans la fraction alvéolaire de l'air, c'est à dire les particules de taille inférieure à 7 µm. Il serait intéressant par la suite de dénombrer les colonies de *Rhodococcus equi* contenues dans la fraction alvéolaire et celles dénombrées dans l'air total en utilisant simultanément un CIP 10 MR et un CIP 10M.

### 2.3.1.2.2 Essais complémentaires avec la pompe DELUXE

#### 2.3.1.2.2.1 En extérieur

Nous allons maintenant évaluer les performances de la pompe Deluxe. Elle possède un débit d'aspiration modulable compris entre 0,5 l/min et 4 l/min. Elle a été étalonnée sur le débit d'aspiration de 2 l/min à l'ANSES Ploufragan dans l'unité dans laquelle travaille Monsieur Didier Huonnic. Cette valeur apparaît comme un compromis entre un débit d'aspiration trop faible qui allongerait le temps de collecte et une valeur trop élevée qui pourrait être tenu responsable d'un impact trop violent sur la membrane filtre en polyuréthane et donc d'une mise en culture infructueuse.

Afin de nous placer dans les conditions les plus favorables à la récolte de *Rhodococcus equi*, nous avons placé l'appareil dans les conditions où nous supposons que la concentration en *Rhodococcus equi* serait la plus importante. Ainsi si les parcelles en terre et en herbe sont contaminées de manière similaire, la parcelle en terre nous paraissait être un milieu plus propice pour la mise en suspension des aérosols au vu de la poussière qui peut plus facilement s'en dégager à la faveur de conditions météorologiques particulières, c'est-à-dire la présence de vent et une hygrométrie faible. Pour cette raison, nous ne pouvons parler d'une comparaison rigoureuse puisque les performances du CIP 10 MR et de l'Air idéal<sup>®</sup>3P ont été évaluées sur la parcelle en herbe auparavant. Toutefois nous pouvons accorder un certain crédit aux résultats de cette expérience avec la pompe Deluxe car les conditions environnementales ne peuvent être favorables ou bien sans effet sur la présence d'aérosols dans l'air au-dessus de cette parcelle.

Cet essai a donc eu lieu le 11 octobre 2010 sur la parcelle contaminée, en terre et avec la pompe Deluxe posée au sol. Nous avons pu réaliser l'analyse des prélèvements en laboratoire conformément au protocole décrit par le document NF ISO 16000-17 (page 5 à 7). Pour le premier essai, la pompe Deluxe a été positionnée en position basse au centre de la parcelle avec l'entrée de la cassette d'aspiration située à 15 cm du sol. Les boîtes filtres utilisées étaient des cassettes transparentes de 37 mm de diamètre contenant un filtre MCE 0,8 µm Nano Neat CR<sup>™</sup>. Étant donné le débit d'aspiration et donc le temps de prélèvement important, nous avons réalisé un seul prélèvement d'une durée de deux heures correspondant à un volume de 240 l. Nous avons choisi ce volume car il nous paraissait être un juste intermédiaire entre les volumes d'air collectés précédemment avec les deux autres appareils étudiés. Lors de ce prélèvement, la température était de +20,7 °C, l'hygrométrie de 47 % et la vitesse du vent de 3 m/s. Le protocole d'analyse microbiologique du filtre permettant une mise en solution des éléments contenus sur le filtre, nous avons réalisé des dilutions successives afin d'assurer une meilleure lisibilité des boîtes dans le cas où celle à la dilution 10<sup>0</sup> serait trop chargée. Pour accroître la représentativité, nous avons réalisé des duplicatas pour chaque dilution (tableau n° 8).

Tableau n° 8: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata

Dilutions prélèvement	Duplicata 1	Duplicata 2
10 <sup>0</sup>	0	0
10 <sup>-1</sup>	0	0
10 <sup>-2</sup>	0	0
10 <sup>-3</sup>	0	0

Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de *Rhodococcus equi* dans ces conditions expérimentales. Toutefois nous avons souhaité poursuivre l'évaluation des performances de cet appareil. Ainsi pour augmenter la probabilité d'isoler *Rhodococcus equi* dans l'air avec cet appareil, nous avons la possibilité d'augmenter le volume d'air collecté ou bien de travailler dans un milieu confiné. Nous avons donc répété un essai avec la pompe Deluxe mais cette fois-ci dans le box paillé fermé.

#### 2.3.1.2.2.2 En intérieur, en box confiné

##### 2.3.1.2.2.2.1 Sans agitation de la paille

Ce deuxième essai s'est déroulé le 15 octobre 2010 dans le box paillé contaminé. La pompe Deluxe était disposée au sol avec son entrée de la cassette d'aspiration située à 15 cm du sol. Il n'y avait pas d'agitation de la paille. Le volume d'air prélevé était de 240 l. Lors de ce prélèvement, la température était de +17,8 °C, l'hygrométrie de 70 % et la vitesse du vent de 0 m/s. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de *Rhodococcus equi* dans ces conditions expérimentales (tableau n° 9 et photographie n° 24).

Tableau n° 9: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata

Dilutions du prélèvement	Duplicata 1	Duplicata 2
10 <sup>0</sup>	0	0
10 <sup>-1</sup>	0	0
10 <sup>-2</sup>	0	0
10 <sup>-3</sup>	0	0

Photographie n° 24: Quelques colonies de staphylocoques obtenues après 72 h de culture. La photographie montre le duplicata n° 1 à la dilution  $10^0$



#### 2.3.1.2.2.2 Avec agitation de la paille

Pour encore majorer la probabilité d'impaction d'aérosols, et potentiellement de *Rhodococcus equi*, sur le filtre de la pompe Deluxe, nous avons répété cet essai dans le box paillé contaminé fermé mais cette fois-ci en agitant la paille autour de la pompe Deluxe pendant toute la durée du prélèvement. Tout comme précédemment réalisé pour le CIP 10 MR et l'Air idéal®3P, ce mode opératoire avait pour but de provoquer une mise en suspension des aérosols dans l'air environnant la pompe Deluxe.

Tableau n° 10: Nombre de colonies de *Rhodococcus equi* (UFC) comptées sur les géloses après 72 heures culture selon les dilutions et par numéro de duplicata

Dilutions du prélèvement	Duplicata 1	Duplicata 2
$10^0$	0	0
$10^{-1}$	0	0
$10^{-2}$	0	0
$10^{-3}$	0	0

Photographie n° 25: Colonies obtenues après 72 heures de culture sur boîte de gélose ANC. Boîte à la dilution  $10^0$



Photographie n° 26: Colonies obtenues après 72 heures de culture sur boîte de gélose ANC. Boîte à la dilution  $10^{-1}$



Même dans ces conditions, nous n'avons pas mis en évidence de colonie de *Rhodococcus equi* (tableau n° 10). Seules des colonies de Staphylocoques et d'entérocoques ont été observées (photographies n° 25 et n° 26). La comparaison entre l'essai sans agitation et avec agitation de la paille est possible car nous avons travaillé dans les mêmes conditions. Le rapprochement des photographies montre que le nombre de bactéries collectées est bien supérieur lors de l'essai avec agitation de la paille ce qui signifie que le phénomène de mise en suspension des aérosols a bien été efficace. Enfin la comparaison des photographies montre l'amélioration de la lisibilité et donc l'efficacité des dilutions successives réalisées.

Devant les difficultés à détecter *Rhodococcus equi* avec cet appareil alors que nous travaillons avec un volume prélevé important en terrain contaminé, à proximité du sol et dans un environnement contenant des particules en suspension, nous écarterons très probablement l'utilisation de cet appareil. De plus les cassettes filtres sont des consommables extrêmement coûteux et le protocole d'analyse bactériologique fastidieux à mettre en œuvre. En effet, la membrane se déchire facilement lors de la manipulation, tout particulièrement lors de son essorage.