

Michel THIBAUDON – RNSA

Solène POILANE – AIRTEST

Atmos'fair

25 & 26 septembre 2013

Détection des moisissures de l'air
: passé, présent, avenir

Plan de l'étude



1

État des lieux —

2

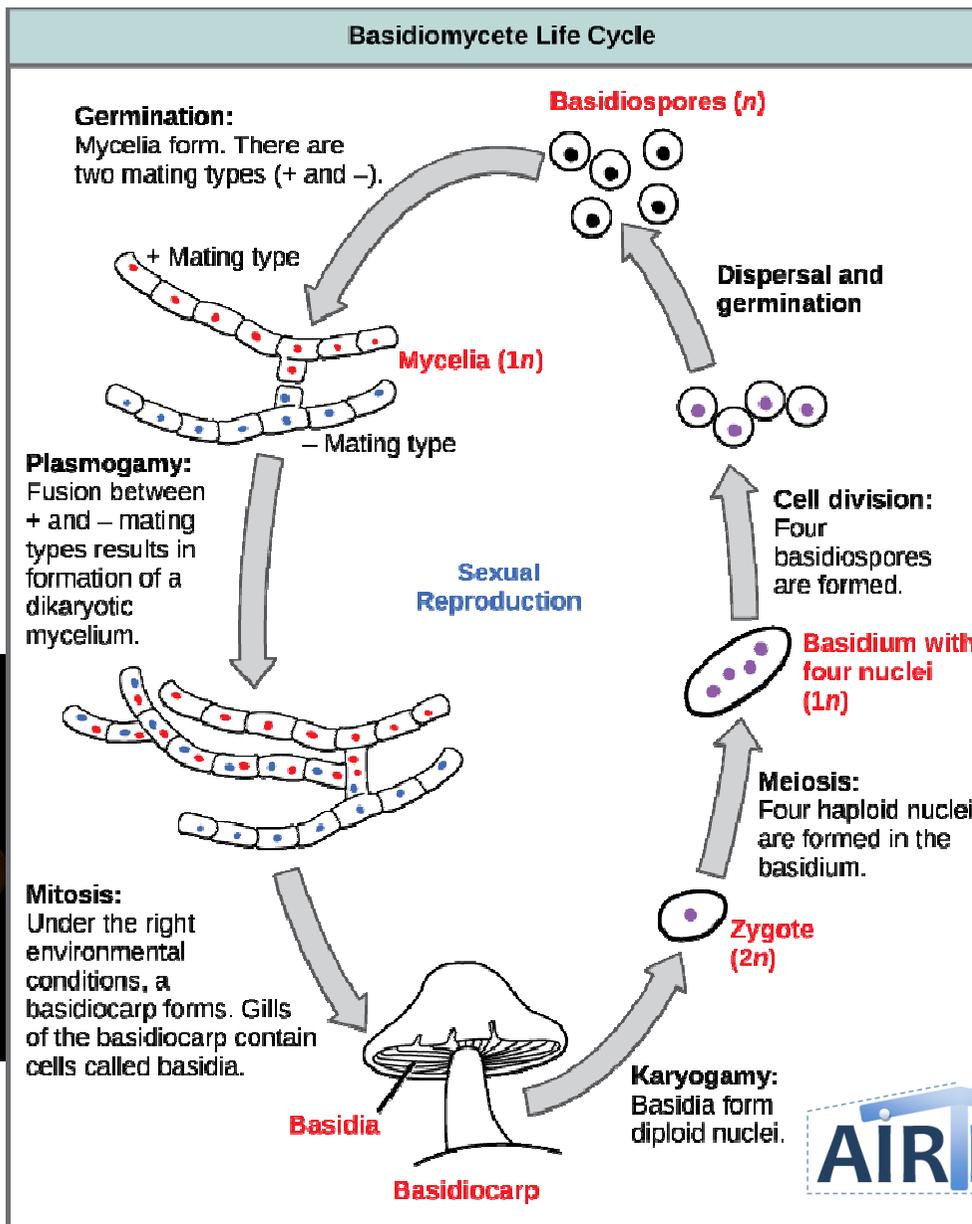
Matériel et méthodes —

3

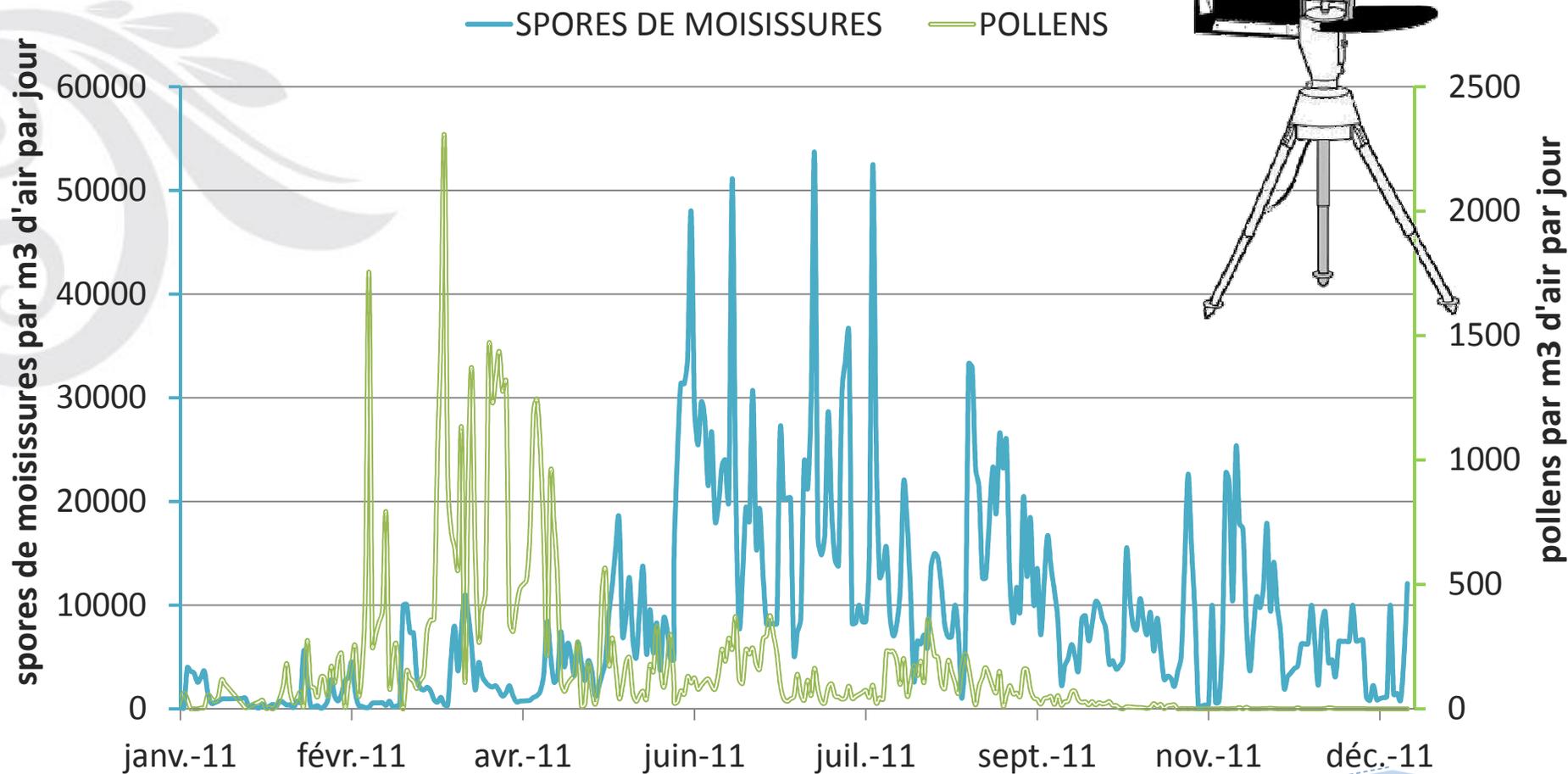
Résultats —



Introduction



Contamination extérieure en pollens et spores de moisissures sur le secteur de LYON (Lanzoni)



LYONWEST du 20/08/13 au 26/08/13

FOCUS : 25

	20/08/13	21/08/13	22/08/13	23/08/13	24/08/13	25/08/13	26/08/13	Total/m3	E
Ascospores	1275	1475	1450	3000	10075	7825	4375	29475	+
Cladosporium	3800	4350	3650	2900	3025	700	7200	25625	-
Ganoderma	200	575	400	675	325	50	325	2550	-
Ustilago	-	150	100	125	250	-	100	725	-
Alternaria	100	50	200	125	75	125	25	700	-
Polythrincium	125	25	75	-	125	-	50	400	+
Epicoccum	75	-	-	75	75	25	100	350	-
Aspergillaceae	-	50	-	-	175	-	25	250	-
Helicomyces	25	-	25	25	25	100	50	250	+
Sporobolomyces	-	-	-	-	25	25	175	225	+
Autre	125	-	-	-	-	-	75	200	-
Basidiospores	-	25	25	25	25	-	75	175	-
Cercospora	-	25	25	-	50	25	-	125	+
Erysiphe	25	-	-	-	50	-	50	125	-
Myxomycetes	-	50	-	50	25	-	-	125	+
Tilletiopsis	-	-	-	-	50	50	25	125	=
Uredospores	25	-	-	-	100	-	-	125	-
Pithomyces	75	-	-	25	-	-	-	100	-
Torula	50	25	-	25	-	-	-	100	-
Helminthosporium	-	-	-	25	50	-	-	75	=
Chaetomium	-	-	-	25	-	-	-	25	+
	5900	6800	5950	7100	14525	8925	12650	61850	



1



Etat des lieux

1

Etat des lieux

Impact sanitaire

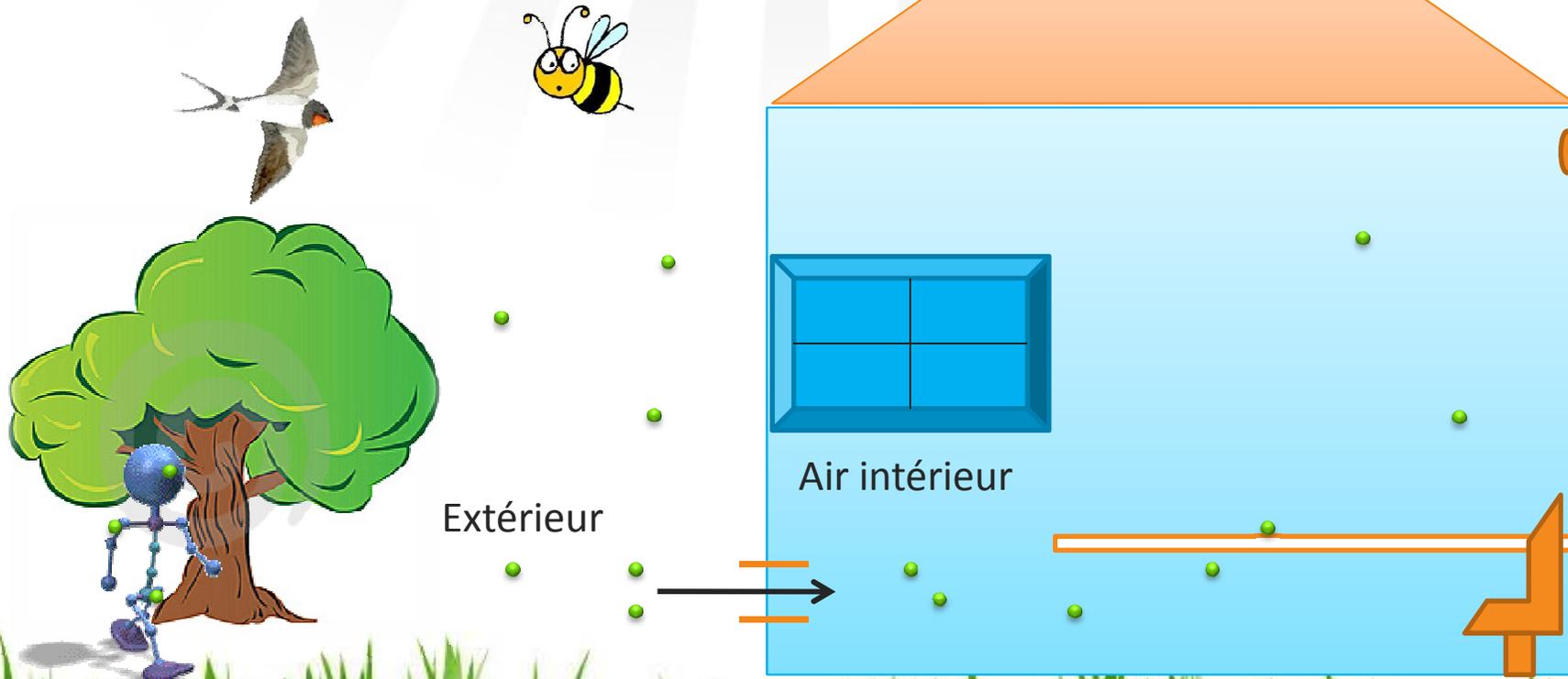
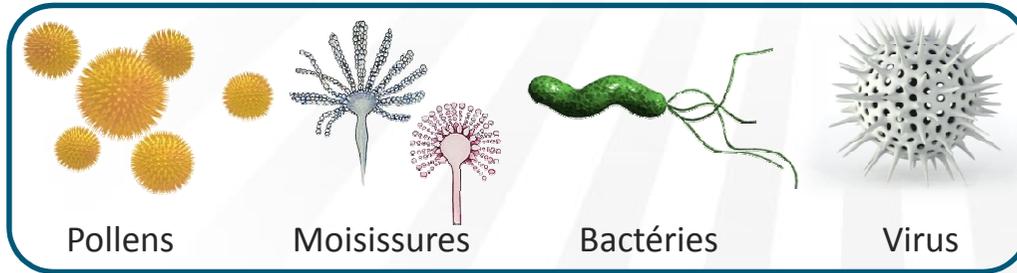


Impact économique



1

Etat des lieux - type de biocontaminants



1

Etat des lieux – Le personnel

Bâtiment

- Consommables
- Emballages
- Matières premières
- Personnels



Laboratoire / industrie

- Cloisons
- Personnel
- Machines
- Equipements
- Produits



Courant d'air
Entrée d'individus
Entrée de consommables

Facteurs influençant la concentration

Hygrométrie

T.I.C.

Présence de carton

Tenue de travail

Nombre de personnes présentes et niveau de formation

1

État des lieux – Le personnel

Zone non classée

- Consommables
- Emballages
- Matières premières
- Personnels



CTA



Salle propre

- Cloisons
- Personnel
- Machines
- Equipements
- Process
- Produits



Circuit d'eau



Entrée d'individus
Entrée de consommables



Facteurs influençant la concentration

Hygrométrie

T.I.C.

Présence de carton

Tenue de travail

Nombre de personnes présentes et niveau de formation



2



Matériel et méthodes

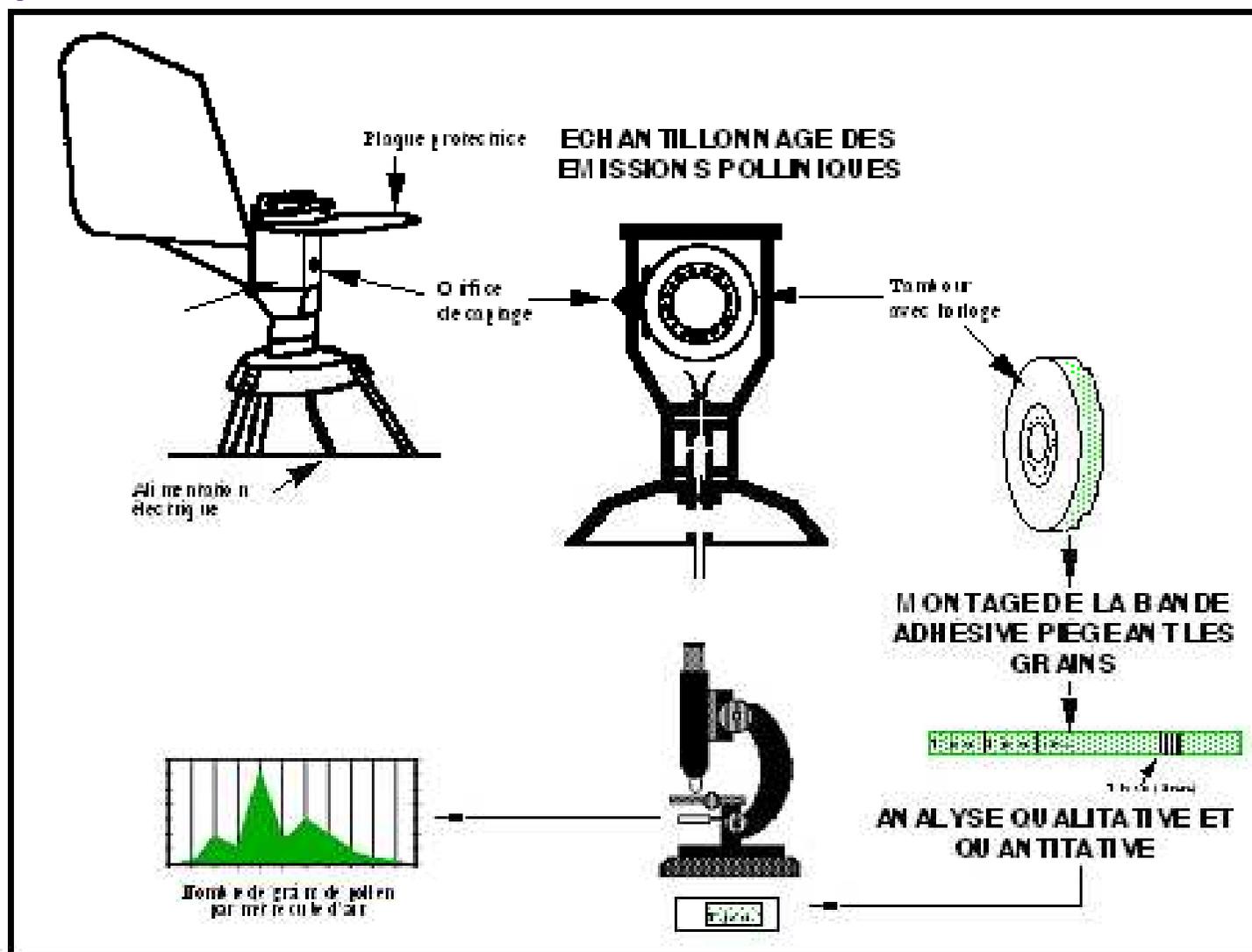
Les différentes méthodes de recueil
et d'analyse des particules biologiques
d'origine fongique dans l'air



2

Matériel et méthodes

Impaction méthode hirst



2

Matériel et méthodes

Impaction sur milieu de culture



Mise en culture



Mise en culture



Mise en culture



2

Matériel et méthodes

Méthode par filtration



Filtration de l'air sur membrane gélatine épaisse

Transfert de la membrane gélatine sur boîte de pétri



Incubation



2

Matériel et méthodes

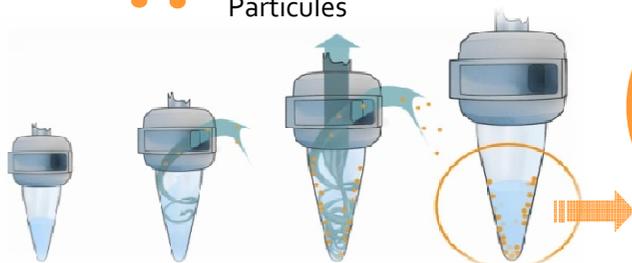
Méthode cyclonique



Coriolis

- Air
- Liquide
- Particules

300 l/min
3 m³ en 10 min



Echantillon
liquide pour
analyses
rapides

Transfert des particules
biologiques de l'air dans
un milieu de collecte
LIQUIDE à HAUT DEBIT

Particules inerte spécifiques ou non

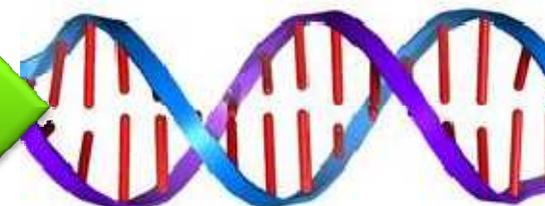


microscopie
optique



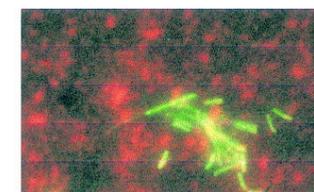
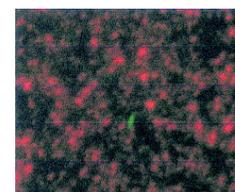
Méthode simple et rapide

PCR



Méthode permettant une
identification précise

Chemscan



Méthode à forte sensibilité

2

Matériel et méthodes

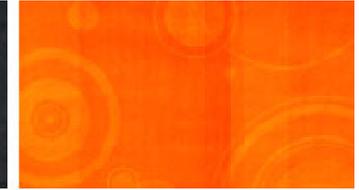
Équipements utilisés pour cette étude :

- Impaction en continu : capteur de pollens et moisissures LANZONI VPPS 2000
- Impaction sur milieu de culture : MAS 100
- Filtration sur membrane gélatine : AIRScan
- Préleveur cyclonique : Coriolis® μ



2

Matériel et méthodes



Méthodes d'analyses utilisées :

Méthodes **CULTURALES** :

Milieux de culture :

- Trypto caséine soja,
- Sabouraud
- MEA

Températures d'incubation ont été 20°C - 25°C.

Identifications :

- Macroscopique
- Microscopique par transferts sur supports transparents, coloration et mise sur lames de microscope.

Numérations réalisées quand cela était possible

(envahissements limitant la qualité des numérations sur certains échantillons)

2

Matériel et méthodes

Méthodes par **DETECTION** par microscopie optique :
(pour échantillons liquides issus du préleveur cyclonique, et membranes gélatines entières ou fractionnées)

PAS de milieux de culture

PAS d'incubation

Identification :

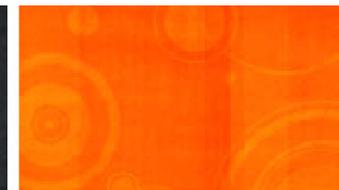
- Microscopique par filtration de l'échantillon, coloration et mise sur lames de microscope.

Analyses au microscope optique, grossissement x400

Numérations : comptage du nombre de spore de moisissure

2

Matériel et méthodes



Avantages / Inconvénients	Méthode CULTURALE	Méthode par DETECTION
Nécessité d'un milieu de culture	OUI	NON
Durée d'incubation	OUI	NON
Indentification macroscopique	OUI	NON
Indentification microscopique	OUI	OUI
Détection de la flore cultivable	OUI	OUI (SANS DIFFERENCIATION possible avec le non cultivable)
Détection de la flore non cultivable	NON	OUI
Résultats quantitatifs	OUI (si pas d'envahissement de la culture et UNIQUEMENT sur la flore CULTIVABLE)	OUI

2

Matériel et méthodes

Période de l'étude :

Prélèvements de 2010 à 2012 dans des environnements très différents :

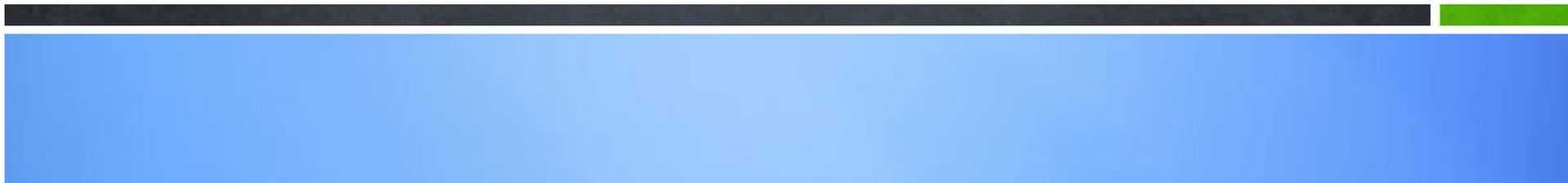
- ⊙ Air extérieur
- ⊙ Bureaux
- ⊙ Ateliers
- ⊙ Laboratoires
- ⊙ Salles propres



3



Résultats



3

Résultats – aspect qualitatif

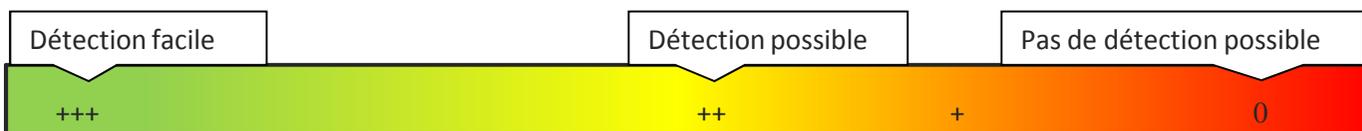
Moisissures	Capteur hirst OBSERVATION MICROSCOPIQUE	Impaction / filtration sur membrane gélatine épaisse CULTURE SUR :			Capteur cyclonique / filtration sur membrane gélatine épaisse OBSERVATION MICROSCOPIQUE
		TSA	Sabouraud	MEA	
<i>Absidia</i>	0	+	++	+++	0
<i>Acremonium</i>	0	+	++	+++	0
<i>Alternaria</i>	+++	+	++	+++	+++
Ascospores	+++	0	0	0	+++
<i>Aspergillacea</i>	+++	+	++	+++	+++
<i>Aspergillus</i>	0	+	++	+++	0
<i>Penicillium</i>	0	+	++	+++	0
<i>Aureobasidium</i>	0	0	+	++	0
Basidiospores	+++	0	0	0	+++
<i>Botrytis</i>	+++	+	++	+++	+++
<i>Cercospora</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Chaetomium</i>	+++	+	++	+++	+++
<i>Cladosporium</i>	+++	+	++	+++	+++
<i>Didymella</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Entomophthora</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Epicoccum</i>	+++	0	+	++	+++
<i>Erysiphe</i>	+++	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	+	+	++	+++	+
<i>Fusicladium</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Helicomycetes</i>	+++	0	0	0	0
<i>Helminthosporium</i>	+++	0	0	0	+++
Mucorales	0	+	++	+++	0
<i>Myxomycetes</i>	+++	0	0	0	+++

Détection facile	Détection possible	Pas de détection possible
+++	++	+
0		

3

Résultats – aspect qualitatif

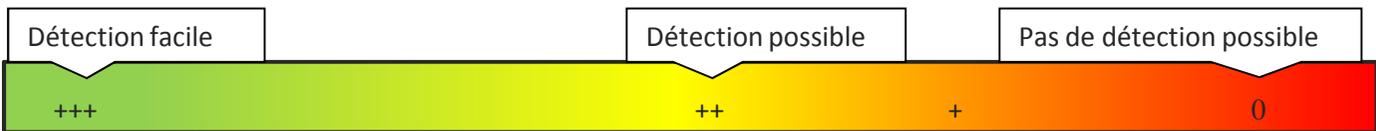
Moisissures	Capteur hirst OBSERVATION MICROSCOPIQUE	Impaction / filtration sur membrane gélatine épaisse CULTURE SUR :			Capteur cyclonique / filtration sur membrane gélatine épaisse OBSERVATION MICROSCOPIQUE
		TSA	Sabouraud	MEA	
<i>Peronospora</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Pithomyces</i>	+++	0	+	++	+++
<i>Pleospora</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Polythrincium</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Sporidesmium</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Sporobolomyces</i>	+++	0	+	++	+++
<i>Stemphylium</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Stachybotrys</i>	+++	0	0	+	+++
<i>Taeniolella</i>	+++	0	0	0	+++
<i>Tilletiopsis</i>	+++	0	0	0	0
<i>Torula</i>	+++	0	+	++	+++
<i>Trichoderma</i>	0	0	+	++	0
<i>Trichothecium</i>	+++	0	+	++	+++
<i>Uredospores</i>	+++	0	0	0	0
<i>Ustilago</i>	+++	0	0		+++



3

Résultats – aspect quantitatif

Contamination de l'air	Culture	Détection microscopie optique	
Spores faible quantité	++	+++	Détection
	+	+++	Dénombrement
	+++	++	Identification
Spores grande quantité	++	+++	Détection
	++ (problème d'envahissement)	+++	Dénombrement
	++ (problème d'envahissement)	++	Identification
Mycélium faible quantité	++	+++	Détection
	+	+++	Dénombrement
	+++	0	Identification
Mycélium grande quantité	++	+++	Détection
	++ (problème d'envahissement)	+++	Dénombrement
	++ (problème d'envahissement)	0	Identification



Conclusion

- Toutes les techniques de prélèvements et d'analyses basées sur la détection culturale des moisissures viables et cultivables, laissent à l'écart un nombre considérable de moisissures non cultivables.
- Il est indispensable d'associer aux analyses traditionnelles culturales, les méthodes d'analyses par détection directe (microscopie optique) et/ou qualitatives (PCR ...).
- Les futures évolutions des normes, dont la norme ISO 14698, doivent tenir compte de ces problématiques concernant la maîtrise de la contamination fongique dans les salles propres



Michel THIBAUDON – RNSA

Solène POILANE – AIRTEST

Merci de votre attention

rnsa@rnsa.fr

www.pollens.fr

airtest@airtest.fr

www.airtest.fr