

**RAPPORT D'ETUDE :**

**Synthèse bibliographique sur les méthodes  
de mesure des aérosols de Légionelles**

**A la demande de :**

**INERIS**

**Représenté par Eric TARNAUD**

**CSTB**

**Responsable : Melle Thi Lan HA**

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	5
1. PREAMBULE	6
2. ECHANTILLONNAGE DES AEROSOLS BACTERIENS	7
2.1. Notions théoriques sur la physique des bioaérosols	7
2.1.1. Taille et forme des aérosols bactériens	7
2.1.2. Mouvement brownien et sédimentation	9
2.1.3. Diffusion turbulente et forces d'inerties	9
2.1.4. Forces électriques	10
2.1.5. Thermophorèse, photophorèse	10
2.2. Principes de collecte	10
2.2.1. L'impaction en milieu solide	10
2.2.2. L'impaction en milieu liquide ou impingement	11
2.2.3. La filtration	11
2.3. Dispositifs d'échantillonnage	12
2.3.1. Les systèmes inertiels	13
2.3.2. Les systèmes par filtration	17
2.4. Performances et choix du biocollecteur	19
2.4.1. Efficacité de collecte	19
2.4.2. Volume et temps d'échantillonnage	22
2.4.3. Analyses de l'échantillon	23
2.4.4. Application au mesurage des aérosols de Légionelles	24
3. METHODES D'ANALYSE DES LEGIONELLES	26
3.1. Culture	26
3.2. Marquages immunologiques	27
3.3. Biologie moléculaire	28
3.3.1. La technique FISH	28

3.3.2. La technique PCR	29
4. CONCLUSION	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	31

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples de formes sphériques (Marchal, 1976).	7
Figure 2 : Exemples de formes bacillaires (Marchal, 1976).	8
Figure 3 : Schéma du principe de l'impaction en milieu solide. D'après Renoux et Boulaud, 1998.	10
Figure 4 : Schéma du principe de l'impaction en milieu liquide. D'après Buttner <i>et al.</i> , 1997.	11
Figure 5 : Représentation schématique de l'efficacité d'un filtre en fonction de la dimension des particules et des différents régimes de diffusion (Renoux et Boulaud, 1998).	12
Figure 6 : Schéma du dépôt des particules dans un impacteur multi-étages.	14
Figure 7 : Exemples d'impacteurs en milieu solide : l'Andersen à 1 et 6 étage(s), le MAS-100, le SAS.	14
Figure 8 : Schéma du Biosampler (Willeke <i>et al.</i> , 1998).	15
Figure 9 : Exemples d'impacteurs en milieu liquide : l'AGI 30, l'impinger multi-étage MLI, le BioSampler. D'après Cox et Wathes, 1995.	16
Figure 10 : Schéma du flux d'air dans le cyclone.	17
Figure 11 : Exemples d'impacteurs centrifuges : le cyclone et le RCS. D'après Cox et Wathes, 1995.	17
Figure 12 : Exemples de systèmes de filtration : cassette filtrante pour membrane et MD8 Sartorius. D'après Cox et Wathes, 1995.	18
Figure 13 : Exemples de courbes d'efficacité de collecte de certains préleveurs en fonction du diamètre aérodynamique de la particule : impacteur Andersen à 8 étages ; BioSampler, AGI 30.	19

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Définition de quelques diamètres équivalents.....	8
Tableau 2 : Quelques caractéristiques physiques de plusieurs biocollecteurs. D'après Griffiths et DeCosemo, 1994 ; Jensen <i>et al.</i> , 1994 ; Crook, 1995 ; Buttner <i>et al.</i> , 1997. ....	20
Tableau 3 : Biocollecteurs utilisés pour le prélèvement d'aérosols de <i>Legionella</i> . * Tour aéroréfrigérante.....	25

## 1. PREAMBULE

La présence d'agents biologiques aéroportés dans nos environnements constitue une préoccupation majeure en terme de santé publique, mais demeure difficile à évaluer. Les études relatives à l'exposition des populations sont parcellaires et aucune relation causale entre la contamination biologique aéroportée et la survenue de maladies n'est, à ce jour, clairement établie.

C'est le cas de la légionellose où la transmission humaine se fait exclusivement *via* la formation d'un aérosol de *Legionella pneumophila*, à partir de milieux hydriques colonisés (panache de tour aérorefrigérante, pulvérisation de gouttelettes à partir de pommes de douche,...). La méconnaissance de la contamination en Légionelles aérosolisées et les lacunes pour appréhender ce volet sont parmi les raisons qui rendent la gestion de ce risque biologique difficile, et ce, malgré une prévalence hydrique de la bactérie largement documentée.

Ce rapport d'étude a pour objet une description de **l'ensemble des principes et moyens disponibles pour estimer l'aérobiocontamination**, appliqués ou applicables à **la mesure des aérosols de Légionelles**.

Il s'articule autour de deux thèmes, consacrés d'une part à l'échantillonnage des aérosols biologiques, et d'autre part à l'analyse spécifique des Légionelles.

La première partie aborde l'approche échantillonnage en dressant un rappel succinct des propriétés physiques relatives aux aérosols biologiques. Elle présente ensuite les principales méthodes employées pour collecter ces bioaérosols, ainsi que les dispositifs disponibles.

Les techniques d'analyse microbiologique explicitées dans la seconde partie se limitent à celles utilisées pour la détection des Légionelles. Elles concernent la culture et des méthodes alternatives basées sur les approches immunologiques et moléculaires.

## 2. ECHANTILLONNAGE DES AEROSOLS BACTERIENS

### 2.1. NOTIONS THEORIQUES SUR LA PHYSIQUE DES BIOAEROSOLS

L'aérosol désigne une suspension dans un milieu gazeux, de particules solides ou liquides, ou les deux, présentant une vitesse de chute négligeable ( $v \leq 25 \text{ cm.s}^{-1}$ ) (Renoux et Boulaud, 1998). Le terme d'aérosol biologique est plus restrictif car il tient compte de la nature biologique de l'aérosol et notamment de ses différentes propriétés : viabilité, caractère infectieux, allergénique...

La composition d'un aérosol microbiologique est variable : il peut s'agir de cellules microbiennes individualisées, agrégées entre elles et / ou avec d'autres entités biologiques ou inertes. Le diamètre aérodynamique de telles particules varie généralement entre 0.01 et 100  $\mu\text{m}$ .

En suspension dans l'air, ces particules biologiques sont soumises aux mêmes lois physiques que les aérosols inertes qui reposent sur leur taille, forme et densité. Ainsi, leur déplacement dans l'air obéit, entre autres, à la gravité (sédimentation), aux mouvements du fluide porteur (diffusion, inertie), aux forces électriques, ou encore aux gradients de température (thermophorèse, photophorèse).

#### 2.1.1. Taille et forme des aérosols bactériens

Les bactéries sont initialement réparties en deux groupes majoritaires : les coques, cellules sphériques ou ovoïdes et les bacilles, en forme de bâtonnets. Au sein de cette classification sont observées des formes intermédiaires qui conduisent à une grande variabilité morphologique des cellules bactériennes (Figure 1 et Figure 2).

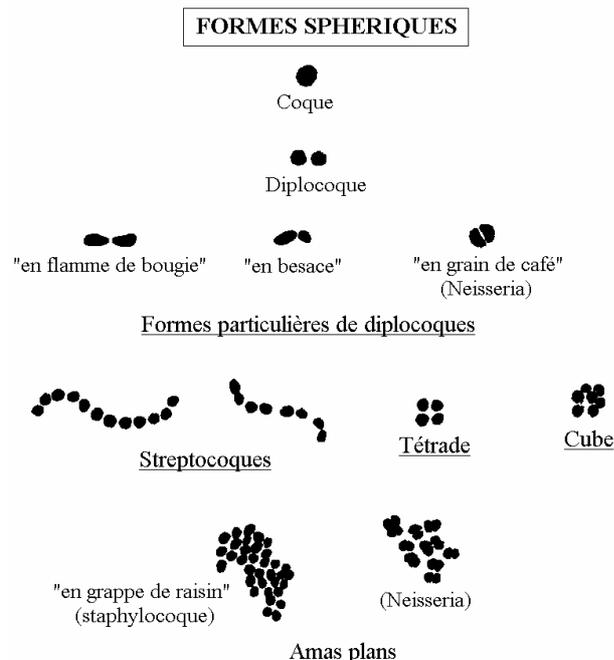


Figure 1 : Exemples de formes sphériques (Marchal, 1976).

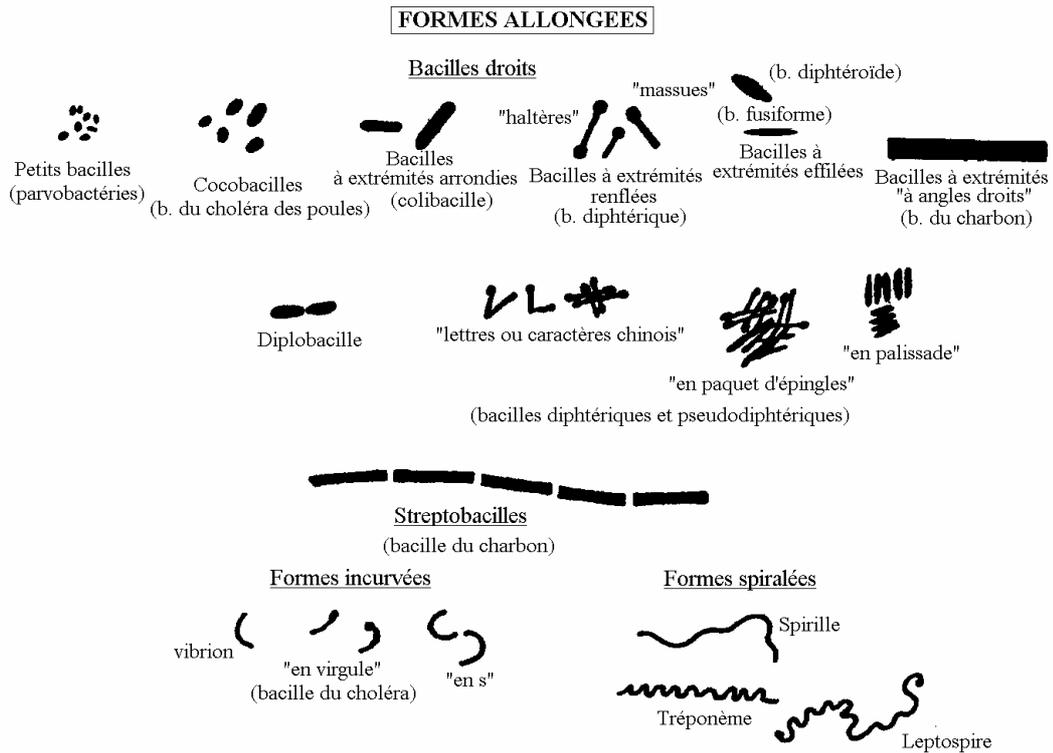


Figure 2 : Exemples de formes bacillaires (Marchal, 1976).

En physique des aérosols, les théories sont établies, le plus souvent, pour des particules sphériques. Le terme de diamètre équivalent est alors utilisé pour définir la taille des particules en suspension dans l'air. Ce diamètre correspond à celui d'une sphère possédant une même propriété physique que la particule de forme irrégulière mesurée.

Le diamètre équivalent répond à différentes nomenclatures selon les techniques mises en œuvre pour le mesurer. Quelques exemples de diamètre équivalent sont présentés dans le Tableau 1. Parmi ceux-ci, le diamètre aérodynamique permet de décrire la déposition des particules au niveau de l'appareil respiratoire. Il détermine également l'efficacité de certains biocollecteurs, tels que les impacteurs (Baron et Willeke, 1993).

Symboles	Diamètre équivalent	Définition
$d_{ac}$	Aérodynamique	Diamètre d'une sphère de densité unitaire qui a la même vitesse terminale de chute que la particule considérée.
$d_{me}$	Masse équivalente	Diamètre de la sphère possédant la même masse que la particule et la masse volumique du matériau composant la particule.
$d_{opt}$	Optique	Diamètre d'une sphère qui diffuse la lumière avec la même intensité (selon indice de réfraction).

Tableau 1 : Définition de quelques diamètres équivalents.

### 2.1.2. Mouvement brownien et sédimentation

Les bioaérosols sont constamment soumis au bombardement aléatoire des molécules du milieu. Le résultat de ces chocs est un mouvement aléatoire appelé mouvement brownien. Son intensité augmente avec la température et sur les plus fines particules. Pour les particules supérieures à 1 µm, le phénomène de diffusion lié au mouvement brownien reste négligeable par rapport aux forces de sédimentation.

La vitesse de chute d'une particule en suspension dans l'air est liée à sa masse, dimension et forme. Elle résulte d'un équilibre entre deux forces, l'action de la pesanteur terrestre sur la particule (phénomène de sédimentation), et la résistance du milieu caractérisée par les forces de viscosité. En l'absence de turbulence, la vitesse limite de chute des particules sphériques est déduite de la loi de Stokes-Cunningham. Elle est donnée par l'équation :

$$V = \frac{\rho_p \cdot d_{ae}^2 \cdot g \cdot Cu}{18 \cdot \eta}$$

où  $\rho_p$  est la masse volumique de la particule ( $\text{kg/m}^3$ ),  $d_{ae}$ , le diamètre aérodynamique des particules (m),  $g$ , l'accélération de la pesanteur ( $9.81 \text{ m/s}^2$ ),  $\eta$ , la viscosité dynamique de l'air en  $\text{kg/m}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $Cu$ , le facteur correctif de Cunningham dont il existe plusieurs expressions.

### 2.1.3. Diffusion turbulente et forces d'inerties

Le déplacement rapide d'une masse d'air, par opposition à un écoulement régulier ou laminaire, est dit turbulent ou instable. La transition entre ces deux régimes est quantifiée par le nombre de Reynolds. En pratique, les turbulences entraînent un mouvement aléatoire s'ajoutant à l'écoulement de l'air. Le comportement aérodynamique et les propriétés de transport des particules sont modifiés selon le régime dans lequel elles sont placées.

A proximité d'un aérosol, on considère le nombre de Reynolds de la particule ( $Re_p$ ) qui se traduit par le rapport entre les forces d'inertie et les forces dues à la viscosité du milieu. Il est défini par la relation :

$$Re_p = \frac{\rho_g \cdot V \cdot d_{ae}}{\eta}$$

où  $\rho_g$  est la masse spécifique du gaz porteur de viscosité dynamique  $\eta$  et  $d_{ae}$ , le diamètre aérodynamique de la particule de vitesse  $V$ .

Un  $Re_p$  proche de 1 traduit le caractère turbulent du flux d'air autour de la particule se déplaçant dans le gaz. Lorsque ce flux d'air, vecteur des particules, change de direction, les bioaérosols sont, par ailleurs, soumis à leur inertie. Si les particules ont une inertie trop importante, elles pourront s'impacter sur les obstacles rencontrés. Cette propriété est utilisée dans de nombreux dispositifs pour collecter les microorganismes de l'air.

#### 2.1.4. Forces électriques

Les particules aérosolisées possèdent des charges électriques. Ces charges entraînent une déposition rapide sur les surfaces et agissent sur la coagulation. Lors des expérimentations, elles peuvent être neutralisées par une source radioactive (par exemple  $^{85}\text{Kr}$ ) afin de donner une charge globale proche de zéro (distribution de Boltzmann). Néanmoins, cette neutralisation est susceptible d'entraîner une lyse cellulaire.

#### 2.1.5. Thermophorèse, photophorèse

Les phénomènes de thermophorèse et photophorèse impliquent un gradient de température responsable d'un mouvement des particules. Le premier est celui suivant lequel les aérosols sont repoussés par les corps chauds, c'est-à-dire qu'ils vont se déplacer dans la direction des températures décroissantes. La photophorèse implique un rayon lumineux qui appliqué sur des particules d'aérosol peut suivant les cas, attirer ou repousser la particule. Ainsi, lorsqu'une particule possède une face plus chaude que l'autre, il en résulte une force de déplacement. Les particules translucides se dirigent vers les sources chaudes car elles se comportent comme des lentilles qui focalisent l'énergie sur leur partie distale. Les particules opaques (fortement absorbantes) suivent habituellement le gradient thermique en s'échappant des zones chaudes vers les plus froides.

### 2.2. PRINCIPES DE COLLECTE

Les méthodes d'échantillonnage destinées au mesurage des aérosols bactériens sont semblables à celles employées pour les particules inertes. Elles reposent sur la séparation des particules du fluide porteur en utilisant les mécanismes physiques évoqués dans la section précédente. Les trois principes de collecte les plus courants sont basés sur l'inertie des particules (impaction en milieu solide et liquide) et la filtration.

#### 2.2.1. L'impaction en milieu solide

L'impaction permet de séparer la particule du flux du gaz porteur, suivant les propriétés d'inertie de celle-ci. L'air est aspiré à travers une série d'orifices (grille) et les particules ayant une inertie suffisante viennent s'impacter sur une surface cible (support de collecte) placée sur le trajet du flux d'air. Les particules de plus faible inertie sont réentraînées dans le flux d'air sortant (Figure 3).

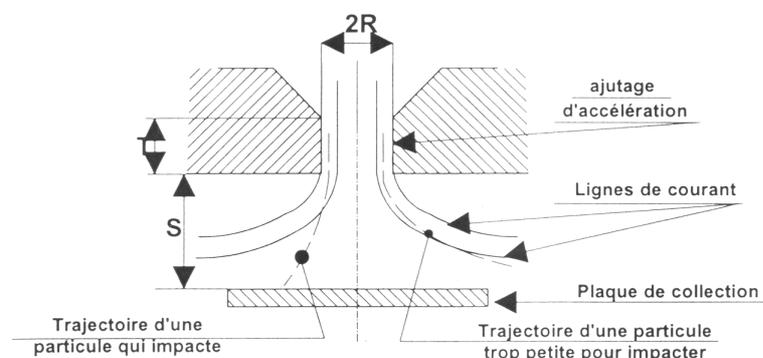


Figure 3 : Schéma du principe de l'impaction en milieu solide. D'après Renoux et Boulaud, 1998.

L'impaction dépend des propriétés d'inertie de la particule (taille, densité, vitesse) et des caractéristiques physiques de l'impacteur (géométrie, nombre et dimensions des orifices, débit d'échantillonnage, trajectoire et vitesse du flux d'air) (Nevalainen *et al.*, 1993).

Le support de collecte consiste généralement en un milieu nutritif gélosé adapté pour l'isolement du germe visé. Un matériau (lame, surface adhésive, filtre) peut lui être substitué permettant une analyse microscopique ultérieure.

### 2.2.2. L'impaction en milieu liquide ou impingement

Lors de l'impaction en milieu liquide, l'air est aspiré au travers d'un tube capillaire, puis propulsé dans ou à la surface d'une suspension liquide.

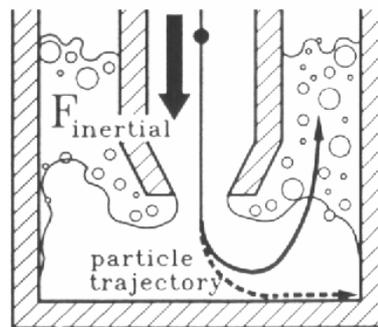


Figure 4 : Schéma du principe de l'impaction en milieu liquide. D'après Buttner *et al.*, 1997.

L'efficacité de captage est fonction de la vitesse d'aspiration et du diamètre de l'orifice d'aspiration.

Le liquide de collecte est généralement de l'eau ou une solution physiologique à laquelle peuvent être ajoutés des agents de protection contre les chocs osmotiques ou la dessiccation, des tensioactifs... Après l'échantillonnage, le liquide de collecte peut être dilué ou concentré et est compatible avec un grand nombre de méthodes d'analyses (culture, tests biochimiques ou immunologiques, analyse moléculaire).

### 2.2.3. La filtration

La méthode par filtration consiste à séparer les aérosols du fluide vecteur en les faisant passer au travers d'un média filtrant. La collecte des particules repose sur l'action simultanée de différents mécanismes (impaction inertielle, interception, diffusion) dont l'importance relative dépend de la dimension des particules et de la vitesse de l'écoulement. Dans le cas d'une particule de 1  $\mu\text{m}$ , les deux mécanismes intervenants sont l'interception et l'impaction (Figure 5).

La collecte des particules peut se faire soit à la surface du média filtrant, soit à l'intérieur du réseau poreux. L'efficacité de collecte est fonction de la porosité et de l'épaisseur du filtre, du diamètre des particules et de la vitesse du flux d'air (Lee et Ramamurthi, 1993).

Le support filtrant peut être de nature fibreuse (fibres de verre), ou des membranes (ester de cellulose, polycarbonate).

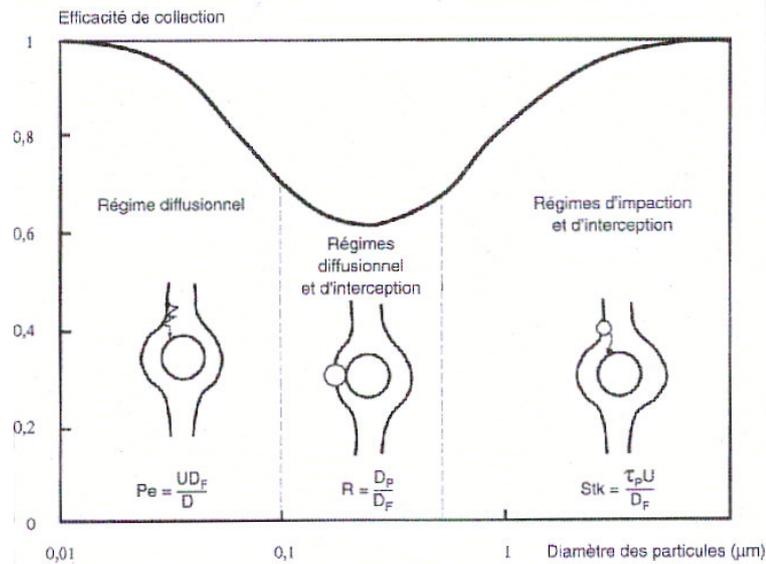


Figure 5 : Représentation schématique de l'efficacité d'un filtre en fonction de la dimension des particules et des différents régimes de diffusion (Renoux et Boulaud, 1998).

D'autres méthodologies sont appliquées au prélèvement des particules biologiques.

La sédimentation est l'une d'entre elles. Il s'agit d'une technique passive, fondée sur le dépôt des particules aéroportées sous l'action de la gravité. Pratiquement, elle consiste à exposer un milieu nutritif contenu dans une boîte de Pétri à l'air ambiant, pendant une durée déterminée arbitrairement. Seules les particules sédimentables, ayant une vitesse de chute suffisante, sont recueillies. La méthode est dite non volumétrique, car elle ne permet pas de rapporter le nombre de particules collectées à un volume d'air échantillonné. Par ailleurs, elle est tributaire des caractéristiques de l'écoulement et des perturbations aérauliques (Griffiths et DeCosemo, 1994).

La précipitation électrostatique consiste à ioniser les aérosols échantillonnés avant de les collecter sur des surfaces métalliques de charges opposées. Des applications récentes à la mesure des aérosols biologiques sont décrites entre autres par Mainelis *et al.* (2002).

La précipitation thermique repose sur le recueil des particules aéroportées en utilisant la propriété de mouvement lié au gradient thermique. Les particules repoussées par les surfaces chaudes viennent se déposer sur les zones froides. Ce mode de collecte n'est efficace que pour les fines particules, de 5 à inférieures à 0.01 μm (Watson, 1958).

### 2.3. DISPOSITIFS D'ÉCHANTILLONNAGE

Un inventaire des dispositifs les plus courants pour l'échantillonnage des aérosols bactériens est proposé dans cette section. Il est établi selon les deux catégories suivantes : les systèmes inertiels et les systèmes par filtration.

### 2.3.1. Les systèmes inertiels

Les systèmes inertiels présentés regroupent les impacteurs en milieu solide et liquide et les échantillonneurs centrifuges.

#### - *Les impacteurs*

Une grande variété d'échantillonneurs basés sur le principe de l'impaction sur milieu solide ou semi-solide est commercialisée. Ils diffèrent par le nombre et la forme des orifices, ainsi que le nombre d'étages. La dénomination de *slit sampler* se réfère à un impacteur mono étage comportant une seule fente généralement rectangulaire, le *sieve sampler* définit les impacteurs à crible avec orifices circulaires, existants dans des versions mono- ou multi-étage(s). Dans ce second cas, on parle aussi d'impacteur en cascade.

Le premier *slit sampler* a été développé par Bourdillon *et al.* en 1941. Les modèles Casella MK-II, Mattson-Garvin ou New Brunswick recueillent les particules biologiques sur des géloses, dans une gamme de tailles comprise entre 0.5 et 1  $\mu\text{m}$  (Kang et Frank, 1989). Certains, comme le Casella MK-II, disposent d'une surface de collecte rotative, permettant une analyse séquentielle de la flore aéroportée. Le système cassette Air-O-Cell et le modèle Burkard *spore trap*, sont privilégiés pour l'échantillonnage des spores et des allergènes. Le support de collecte consiste en des lames recouvertes d'une substance adhésive permettant une observation microscopique des bioaérosols collectés (Buttner *et al.*, 1997 ; Aizenberg *et al.*, 2000).

L'échantillonneur SAS (*Surface Air System*) est un impacteur à orifices mono étage portable et autonome (fonctionnement avec une batterie). Il recueille les particules sur des milieux nutritifs contenus dans des boîtes contact ou de Pétri. Suivant la version (220 ou 260 orifices), son débit d'échantillonnage varie de 90 à 180  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Lach (1985) montre une efficacité proche de 100% pour des particules de 4 à 20  $\mu\text{m}$ , et réduite à 50% pour celles de 2  $\mu\text{m}$ . Nevalainen *et al.* (1992) estiment un diamètre de coupure à 1.45  $\mu\text{m}$  pour la version à débit élevé. Le MAS-100, qui dispose des mêmes caractéristiques de portabilité et d'autonomie, est constitué par un crible de 400 orifices, de 0.7 mm de diamètre. La vitesse d'impaction est estimée à 11  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  et favorise l'échantillonnage des particules supérieures à 1  $\mu\text{m}$  (Meier et Zingre, 2000).

Les impacteurs en cascade donnent une information supplémentaire par rapport aux dispositifs mono étage, information relative à la distribution granulométrique de l'aérosol collecté. L'impacteur Andersen (Andersen, 1958), version la plus utilisée de ce type de biocollecteur, consiste en une série de six cribles superposés de 400 trous de diamètres décroissants à chaque étage de collecte. La vitesse des particules augmente à chaque passage de crible et l'on réalise ainsi un échantillonnage sélectif suivant la taille des particules, les plus grosses étant recueillies sur les premiers niveaux (Figure 6). Il existe également des modèles comportant 1 ou 2 étage(s) et un modèle à 8 étages (Henningson et Ahlberg, 1994). Pour la version unitaire, le crible est semblable à celui de l'étage n°6 de l'impacteur à 6 étages, avec un diamètre d'orifice de 0.25 mm. La déclinaison à 2 étages comporte sur chaque crible 200 orifices et sépare l'aérosol suivant les fractions respirable et non respirable.

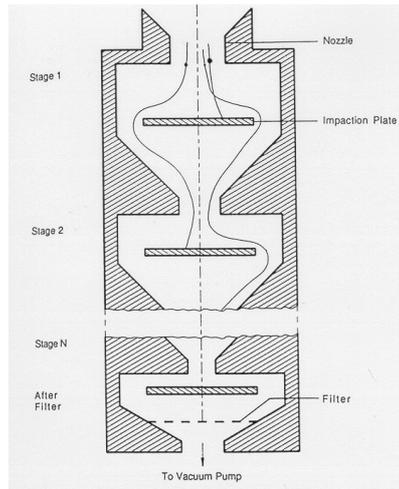


Figure 6 : Schéma du dépôt des particules dans un impacteur multi-étages.

La plupart des impacteurs à crible consistent en l'impaction directe des particules sur une surface gélosée, disposée sous la grille perforée. Pour des prélèvements réalisés dans des ambiances contaminées, la probabilité de passage de plusieurs particules au travers d'un même orifice est importante. Ce risque peut entraîner une sous-estimation quantitative de l'aérosol collecté, une seule unité formant colonie étant comptée pour deux ou plusieurs particules impactées au même site. Pour limiter cette incertitude, il existe des tables de correction qui déterminent le nombre de particules aéroportées à partir du nombre de colonies dénombrées (Andersen, 1958 ; Leopold, 1988 ; Macher, 1989).



Figure 7 : Exemples d'impacteurs en milieu solide : l'Andersen à 1 et 6 étage(s), le MAS-100, le SAS.

### - *Les impinger*

Le terme d'impinger désigne les impacteurs utilisant comme milieu de collecte un liquide.

Le premier modèle d'impinger est le Greenberg-Smith développé initialement pour le prélèvement des poussières, puis adapté ensuite à la collecte des aérosols bactériens (Crook, 1995).

L'utilisation de la version AGI 30 des échantillonneurs *All Glass Impinger*, est reportée par de nombreux travaux. Une grande partie d'entre eux est reprise dans la synthèse de Henningson et Ahlberg (1994) portant sur l'évaluation des biocollecteurs.

L'air est aspiré horizontalement au travers d'un capillaire courbé qui se termine par un orifice positionné perpendiculairement par rapport au fond du réservoir. La courbure de la section de captage simule le passage des particules dans le système nasal, adaptant ce préleveur à l'étude des microorganismes responsables d'infections respiratoires (Grinshpun *et al.*, 1994 ; Jensen *et al.*, 1994). Les particules déposées inertiuellement sur les parois de cette section peuvent être réentraînées par un rinçage avec le liquide de collecte. Ce dispositif est une version améliorée du premier AGI, l'AGI 4, plus connu sous le nom d'impinger Porton. La différence entre ces deux systèmes repose sur la distance qui sépare la section terminale du capillaire et le fond du réservoir de collecte (4 mm, pour l'AGI 4, 30 mm, pour l'AGI 30), distance rallongée pour améliorer les performances biologiques du dispositif (Buttner *et al.*, 1997). Le débit de prélèvement, de 12.5 L.min<sup>-1</sup>, résulte de la vitesse sonique de la particule au travers d'un orifice de taille critique (Ø 1 mm). L'aérosol est recueilli dans un volume de 20 mL d'eau ou d'un liquide de viscosité similaire. A l'instar de l'impacteur Andersen à 6 étages, l'AGI 30 est référencé par de nombreux travaux (Brachman *et al.*, 1964 ; Jensen *et al.*, 1992 ; Henningson et Ahlberg, 1994). Ceux de Jensen *et al.* (1992) sur 8 échantillonneurs (Andersen 1, 2 et 6 étage(s), Mattson-Garvin, SAS, RCS Biotest, AGI 30 et système de filtration avec membrane de 47 mm de diamètre) indiquent des efficacités de collecte comparables pour les deux systèmes vis-à-vis d'un aérosol de *Bacillus subtilis* et d'*Escherichia coli*. Grinshpun *et al.* (1994) estiment une efficacité de captage proche de 100% pour les particules supérieures à 1 µm, mais réduite significativement pour celles de 5 µm et plus.

Plus récemment, un échantillonneur appelé BioSampler<sup>®</sup> a été développé (Willeke *et al.*, 1998 ; Lin *et al.*, 1999 ; 2000). Il est composé de trois parties : une section de captage de l'aérosol similaire à celle de l'AGI 30, un orifice d'aspiration et un réservoir. Ce dispositif couple l'impaction liquide à un effet centrifuge. Les particules sont impactées tangentiellement à la surface du liquide de collecte, à un débit de 12.5 L.min<sup>-1</sup> (Figure 8). Cette déviation du flux d'aérosols permet de réduire le bullage et de limiter l'évaporation du liquide de collecte (Lin *et al.*, 1999).

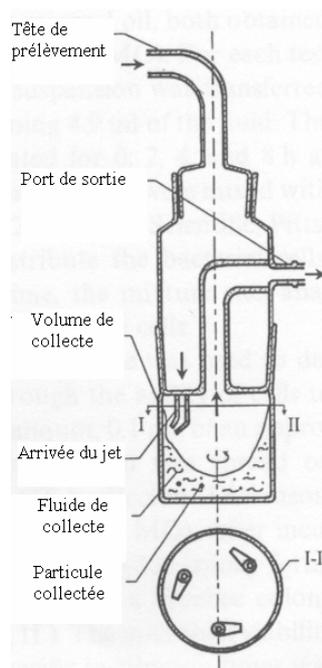


Figure 8 : Schéma du Biosampler (Lin *et al.*, 1999).

Une autre application du principe de collecte en milieu liquide est l'impinger multi-étages (*Multistage Liquid Impinger* ou MLI) développé par May (1966). L'appareil est composé de trois niveaux de fractionnement de l'aérosol, correspondant aux principaux sites de dépôt particulaire dans le système respiratoire (voies supérieures, bronches, alvéoles pulmonaires). La vitesse d'impaction y est réduite par rapport à celle observée dans l'AGI 30, ce qui permet de réduire le stress lié à la phase de collecte (Griffiths et DeCosemo, 1994). Pour essayer de standardiser la fabrication du préleveur à l'origine en verre, des prototypes usinés en acier inoxydable sont développés par la suite (Bradley *et al.*, 1992), dont un modèle commercialisé par Burkard.

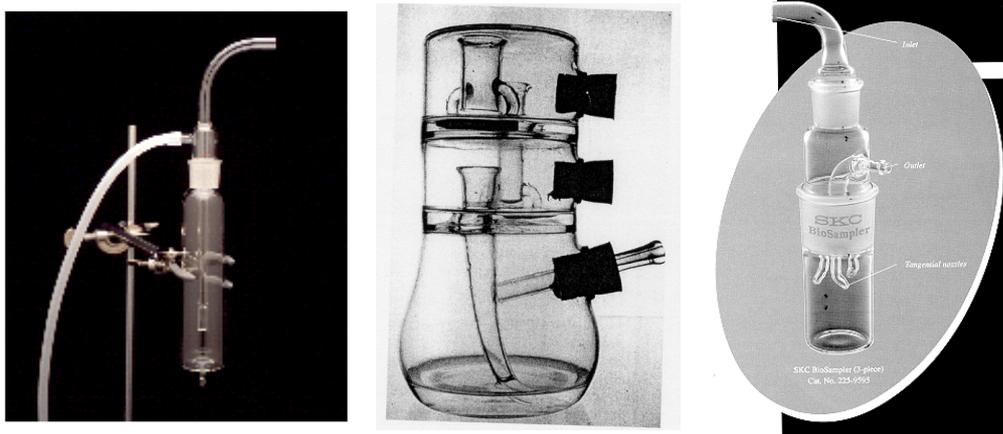


Figure 9 : Exemples d'impacteurs en milieu liquide : l'AGI 30, l'impinger multi-étage MLI, le BioSampler. D'après Cox et Wathes, 1995.

#### - *Les impacteurs centrifuges*

Les impacteurs centrifuges impliquent la création d'un vortex dans lequel les particules ayant une inertie suffisante vont quitter le flux d'air et s'impacter soit sur une surface de collecte, soit directement sur les parois de l'appareil. On retrouve parmi ces systèmes le cyclone et l'échantillonneur RCS de Biotest.

Concernant le cyclone, les aérosols sont introduits tangentielle à la paroi du préleveur au sommet d'un volume conique. Les particules entraînées dans un mouvement tournant se déposent par inertie sur la paroi, conduisant à leur séparation du fluide porteur. Celui-ci s'écoule à l'intérieur du système successivement par un mouvement hélicoïdal descendant le long de la paroi du cyclone, un mouvement en spirale centripète sous le tube de sortie, et un mouvement hélicoïdal ascendant aboutissant dans le tube de sortie (Figure 10). A partir de 1969, les modèles développés intègrent durant l'échantillonnage une circulation de liquide le long de la paroi (Errington et Powell, 1969). Leurs débits de fonctionnement peuvent varier de 75 à 1000 L.min<sup>-1</sup>, les rendant particulièrement adaptés pour des prélèvements en ambiances diluées (Henningson et Ahlberg, 1994 ; Crook, 1995).

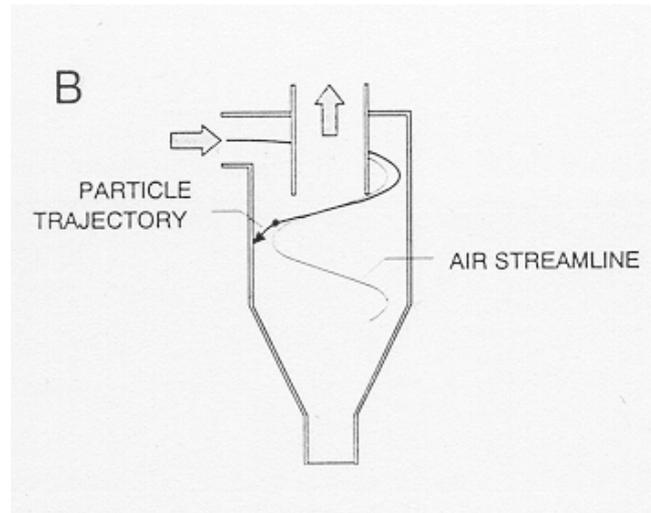


Figure 10 : Schéma du flux d'air dans le cyclone.

L'exemple le plus connu des biocollecteurs centrifuges est le Biotest RCS ou *Reuter Centrifugal Sampler*. Il s'agit d'un échantillonneur portable, dont l'alimentation est relayée par une batterie. L'air est aspiré à l'intérieur d'une enceinte rotative ouverte, puis accéléré par effet centrifuge en direction de la paroi interne. Cette paroi est recouverte d'une bande gélosée sur laquelle vont s'impacter les particules. La bande est récupérée puis mise à incuber pour isoler les microorganismes collectés. Clark *et al.* (1981) estiment que l'appareil n'est pas efficace pour le prélèvement de particules inférieures à 5  $\mu\text{m}$ . Les données expérimentales de Macher et First (1983) évaluent un diamètre de coupure à 3  $\mu\text{m}$  et un échantillonnage efficace des aérosols supérieurs à 4  $\mu\text{m}$ . Ces décalages sont en partie liés à une mésestimation du débit d'échantillonnage, du fait du passage des flux d'air entrant et sortant au niveau de la même section d'ouverture. La version RCS plus, développée par la suite, permet de distinguer ces deux flux d'air, améliorant ainsi les performances du préleveur sur la fraction particulaire micronique (Benbough *et al.*, 1993).

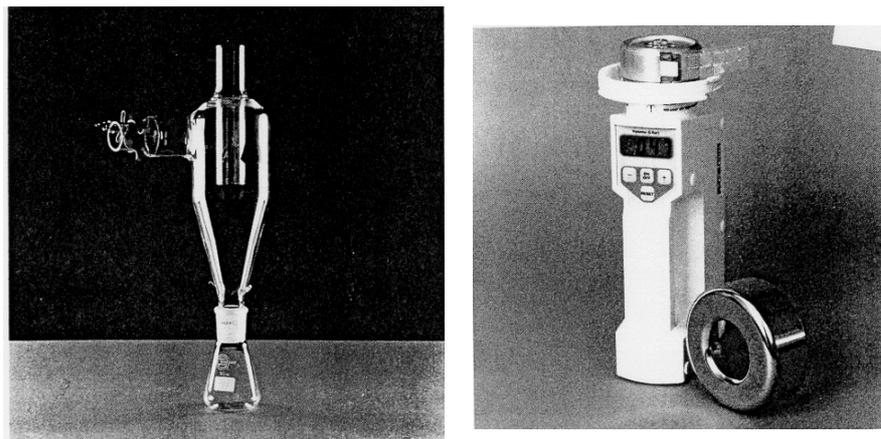


Figure 11 : Exemples d'impacteurs centrifuges : le cyclone et le RCS. D'après Cox et Wathes, 1995.

### 2.3.2. Les systèmes par filtration

Les systèmes de filtration actuels consistent en un média filtrant monté sur portoir ou dans des cassettes, le tout raccordé à une pompe.

Il existe trois catégories de média filtrant : les filtres en fibre, les membranes en ester de cellulose ou autre polymère synthétique, et les filtres en polycarbonate. Les filtres en fibres (ex. fibres de verre), constituent une matrice poreuse, enchevêtrée dans laquelle sont interceptées les particules. Ce type de filtre est réservé essentiellement à des analyses gravimétriques de poussières et d'allergènes. Les filtres membranes sont eux formés à partir d'ester de cellulose, de PVC, PTFE ou gel de gélatine. Ceux en gélatine, décrits comme favorables à la collecte des microorganismes aéroportés (Koller et Rotter, 1974), permettent de les recueillir, soit à la surface, soit à l'intérieur de la membrane. Celle-ci peut être ensuite déposée directement sur un milieu de culture pour incubation. Pour les filtres en polycarbonate (Nuclepore<sup>®</sup>), dont les pores sont obtenus par bombardement de neutrons à leur surface, le dépôt de l'aérosol s'effectue uniquement à la surface. Appliqués à la mesure des aérosols biologiques, ils offrent la possibilité d'une détection directe des microorganismes à l'aide de marqueurs fluorochromiques et de la microscopie à épifluorescence (Lundholm, 1982 ; Palmgren *et al.*, 1986).

La porosité des filtres varie de 0.01 à 10  $\mu\text{m}$  (Jensen *et al.*, 1994). L'efficacité de collecte du filtre dépend de la nature du média. Dans le cas des membranes en fibres de verre, elle est fonction de l'épaisseur du média, de la concentration collectée et de la vitesse du flux d'air. Pour les particules submicroniques, elle diminue lorsque la vitesse augmente et est supérieure à 99.9% sur la fraction supermicronique. Sur les filtres membranes, l'efficacité est maximale (100%) lorsque les particules sont supérieures au diamètre des pores (Lippmann, 1989).

Les filtres membranes (ester de cellulose ou polycarbonate) sont supportés par des systèmes de cassettes plastiques, disponibles pour les diamètres de 25 et 37 mm. Ces cassettes peuvent être utilisées ouvertes ou fermées. La première option permet une répartition uniforme des particules sur le média, ce qui est intéressant lorsqu'une analyse microscopique est réalisée ensuite. Dans le second cas (cassette fermée), la section de captage est réduite à une ouverture de 4 mm de diamètre. Ce mode opératoire permet alors un échantillonnage sélectif de l'aérosol en limitant la fraction collectée à celle inhalable. Pour ce type de système, plutôt destiné à l'échantillonnage individuel, des pertes significatives sur la fraction supermicronique sont observées du fait des dépôts causés par des effets électrostatiques (Hinds, 1982). L'usinage des cassettes en polypropylène carboné noir limiterait ses phénomènes (Crook, 1995).

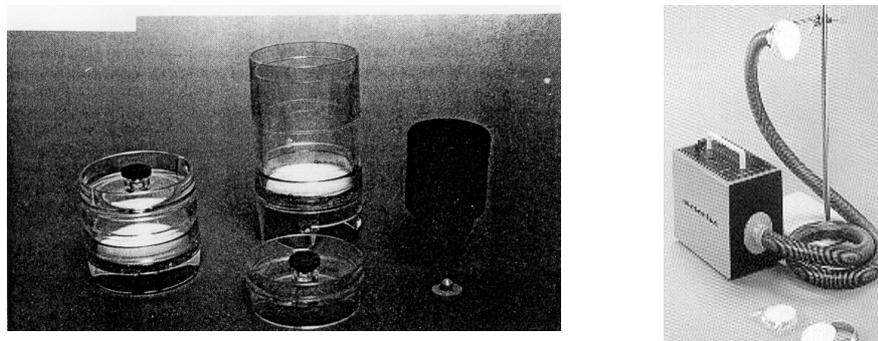


Figure 12 : Exemples de systèmes de filtration : cassette filtrante pour membrane et MD8 Sartorius.

L'échantillonneur MD8 Sartorius collecte les particules sur des filtres gélatine de 47 mm de diamètre. Ce média permet de réduire l'inactivation des cellules microbiennes

observée avec les autres filtres (Parks *et al.*, 1996). Du fait de son caractère hydrosoluble, ce type de filtre n'est pas recommandé pour des mesures en environnements humides (Macher et First, 1984). Il est également particulièrement fragilisé par la dessiccation induite par des prélèvements de longue durée ou en atmosphère sèche.

## 2.4. PERFORMANCES ET CHOIX DU BIOCOLLECTEUR

Il n'existe pas à ce jour de protocoles d'échantillonnage standardisés, ni de dispositifs universels pour la mesure de l'aérobiocontamination. La norme NF EN 13098 définit des recommandations pour le mesurage des microorganismes dans l'air, mais ces données guides ne concernent que les ambiances des lieux de travail (AFNOR, 2000).

Les systèmes de collecte disponibles ne sont pas adaptés pour toutes les configurations. L'utilisation préférentielle d'un biocollecteur doit découler d'une réflexion amont sur la stratégie d'échantillonnage, ses objectifs, les paramètres à considérer, lesquels vont déterminer les caractéristiques performancielles pré-requises.

### 2.4.1. Efficacité de collecte

Idéalement, un biocollecteur doit permettre de collecter une fraction représentative de l'aérosol biologique avec un minimum de stress pour les microorganismes (Griffiths et DeCosemo, 1994). Ainsi, Henningson et Ahlberg (1994), définissent l'efficacité totale d'un biocollecteur comme le produit de son efficacité physique de collecte par son efficacité biologique.

L'efficacité de collecte est classiquement déterminée par des mesures physiques. Elle prend en compte l'aérosol pénétrant dans l'appareil (efficacité de captage), celui déposé sur les parois (dépôts), celui effectivement déposé sur le support de collecte et considère ces données par rapport aux caractéristiques de l'aérosol généré en terme de taille, de concentration. Elle est généralement figurée par une courbe représentant le pourcentage d'efficacité selon le diamètre aérodynamique de la particule (Figure 13), le diamètre aérodynamique correspondant au diamètre d'une sphère de densité unitaire et de même vitesse de chute que la particule considérée.

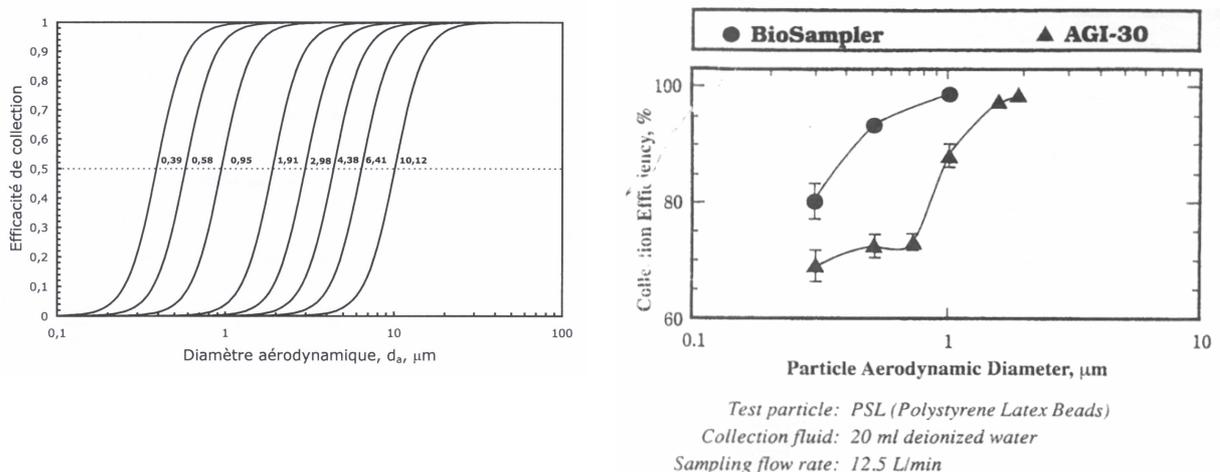


Figure 13 : Exemples de courbes d'efficacité de collecte de certains préleveurs en fonction du diamètre aérodynamique de la particule : impacteur Andersen à 8 étages ; BioSampler, AGI 30.

Echantillonneur	Débit (L.min <sup>-1</sup> )	Vitesse (m.s <sup>-1</sup> )	Diamètre de coupure (µm)	
			Théorique	Reporté
<b><u>Impaction</u></b>				
<b>Air-O-Cell</b>	12-30		2.3	
<b>Impacteur Andersen 6 étages</b>				
étage 1	28.3	1.08	6.24	7
étage 2	28.3	1.80	4.21	4.7
étage 3	28.3	2.97	2.86	3.3
étage 4	28.3	5.28	1.84	2.1
étage 5	28.3	12.8	0.94	1.1
étage 6	28.3	23.3	0.58	0.65
<b>Impacteur Andersen 2 étages</b>				
étage 0	28.3	1.33	6.28	8.0
étage 1	28.3	18.8	0.83	0.95
<b>Impacteur Andersen 1 étage</b>				
étage N6	28.3	23.3	0.58	0.65
<b>Biotest</b>				
RCS standard	280		7.5	3.8
RCS plus	100			0.82
<b>Burkard, spore</b>				
Orifice standard	10	5.95	3.70	
Orifice haute efficacité	10	16.7	2.17	
<b>Burkard, portable</b>				
	10-20	1.94	4.18	
<b>Casella MK-II</b>				
	30		0.67	
<b>Mattson-Garvin</b>				
	28.3	75.7	0.53	
<b>MAS-100</b>				
	100	10.8	1.62 et 1.72	
<b>SAS</b>				
Compact	90		1.97	2.0
Flux élevé	180		1.52 et 1.45	2.0
<b><u>Impingement</u></b>				
<b>AGI 30</b>				
	12.5	265	0.30	
<b>BioSampler</b>				
	12.5			<0.3
<b>MLI</b>				
étage 1	55			6
étage 2	55			3.3
étage 3	55			0.5
<b>Cyclone</b>				
	jusqu'à 1000			≤ 1 µm
<b><u>Filtration</u></b>				
<b>Cassette (25, 37 et 45 mm)</b>				
	1-50			
<b>Sartorius MD8</b>				
	42-133			

Tableau 2 : Quelques caractéristiques physiques de plusieurs biocollecteurs. D'après Griffiths et DeCosemo, 1994 ; Jensen *et al.*, 1994 ; Crook, 1995 ; Buttner *et al.*, 1997.

Pour les impacteurs, l'efficacité de collecte est caractérisée par un nombre sans dimension, appelé le nombre de Stokes. Ce nombre détermine le diamètre de coupure ( $d_{50}$ ) du préleveur, qui littéralement se réfère au diamètre aérodynamique de la particule pour lequel 50% des particules sont collectées. Hinds (1982) considère le diamètre de coupure comme celui au-dessus duquel toutes les particules de taille supérieure sont en théorie collectées. Il convient donc pour un prélèvement efficace de choisir un impacteur dont le  $d_{50}$  est inférieur à la taille moyenne des microorganismes visés (Tableau 2).

L'efficacité de captage dépend non seulement de la section d'entrée du biocollecteur (Wedding *et al.*, 1977 ; Grinshpun *et al.*, 1994), mais aussi de l'écoulement et du caractère isocinétique du prélèvement. Dans les conditions idéales de prélèvement (isocinétisme), la vitesse du flux d'air entrant est égale à celle dans l'orifice de captage de l'échantillonneur. En revanche, lorsque le flux est perturbé par un rétrécissement (superisocinétisme) ou un élargissement (subisocinétisme) de la section de captage, l'échantillonnage peut suivant le cas, surestimer ou sous-estimer la fraction des particules ayant une inertie élevée. Par exemple, Willeke *et al.* (1992) estiment, pour l'impacteur, que sur un prélèvement réalisé dans le vent à une vitesse de  $5 \text{ m.s}^{-1}$ , le nombre de particules supérieures à  $10 \mu\text{m}$  peut être surestimé de 50%. En revanche, lorsque celui-ci est effectué en positionnant l'Andersen perpendiculairement à la trajectoire du vent, moins de 5% des particules de  $10 \mu\text{m}$  sont collectées. Dans les mêmes conditions de vitesse de vent, ils évaluent, pour l'AGI 30, une efficacité maximale sur les particules microniques, de 20 à 30% pour celles supérieures à  $10 \mu\text{m}$ . Pour les systèmes de filtration à « face ouverte », un sur-échantillonnage est observé lorsqu'ils sont positionnés dans le sens de l'écoulement (Mitchell, 1995).

D'autres facteurs sont également à prendre en considération. En effet, l'efficacité de collecte des systèmes inertiels (ex. impacteur Andersen) peut être diminuée par des phénomènes de dépôts pariétaux et rebonds (Marple et Willeke, 1976). Sur les modèles AGI, les performances sont assujetties à la réaérosolisation des particules, liée à l'agitation permanente du liquide de collecte. Ce phénomène, limitant sur des échantillonnages longs, conduit à la remise en suspension des particules collectées dans le flux d'air sortant avec pour conséquence une réduction de l'efficacité de prélèvement (Grinshpun *et al.*, 1997 ; Lin *et al.*, 1997). Dans la version BioSampler, ce réentraînement est limité par une impaction tangentielle du flux d'aérosols à la surface du liquide de collecte, réduisant significativement le bullage et la dispersion des particules dans les gouttelettes.

Nevalainen *et al.* (1992) définissent l'efficacité biologique comme la capacité du biocollecteur à préserver la viabilité microbienne durant le prélèvement. Elle est plus difficile à déterminer, en raison des effets cumulatifs liés à l'étape d'aérosolisation, aux stress de l'environnement (températures extrêmes, déshydratation, réactions d'oxydation avec les polluants de l'air, présence de rayonnements) et à l'échantillonnage. Dans la plupart des travaux, la caractérisation de cette efficacité biologique est réalisée de manière relative, soit par des évaluations *in situ* de dispositifs, soit par des expérimentations à l'aide d'aérosols microbiens tests contrôlés (Henningson et Ahlberg, 1994). L'intercomparaison des mesures d'efficacité est cependant délicate compte tenu de la nature du bioaérosol et de la variabilité des conditions opératoires d'une étude à l'autre.

L'impaction est un mécanisme de collecte par lequel les microorganismes aéroportés sont généralement altérés relativement à leur faculté de développement sur des milieux nutritifs (Stewart *et al.*, 1995). Ce stress est particulièrement important pour les impinger

type AGI, où la vitesse interne des particules atteint celle du son (Tyler et Shipe, 1959). Les forces de cisaillement induites par l'accélération du flux d'air, ajoutées à l'agitation du liquide de collecte, entraînent des pertes de viabilité conséquentes sur la fraction microbienne recueillie. Concernant les systèmes par filtration, le passage du flux d'air au travers du média est relaté comme la première cause de létalité des cellules végétatives (Jensen *et al.*, 1994 ; Lundholm, 1982). La nature du matériau filtrant peut également être à l'origine des effets délétères observés (Lundholm, 1982 ; Lee et Ramamurthi, 1993). C'est pourquoi, les techniques de filtration sont classiquement privilégiées pour la collecte de formes résistantes à la dessiccation, comme les spores fongiques ou les endospores bactériennes. Jensen *et al.* (1992) révèlent ainsi un taux de recouvrement comparable à ceux des dispositifs Andersen à 1, 6 étage(s) et l'AGI 30 lorsque des spores aéroportées de *Bacillus subtilis* sont ciblées. Sur des cellules d'*E. Coli* sous forme végétative, le système de filtration témoigne en revanche du rendement le plus faible.

#### 2.4.2. Volume et temps d'échantillonnage

Ces paramètres déterminent le caractère représentatif de l'échantillon. Ils dépendent principalement de la charge microbienne présumée dans l'air et des niveaux de sensibilité requis par le type d'analyse souhaité.

Pour la plupart des dispositifs basés sur l'impaction en milieu solide (Andersen, MAS-100, SAS, Biotest RCS, *slit sampler*), le recueil des particules biologiques s'effectue sur des géloses afin d'évaluer la flore cultivable. Cette combinaison présente des limitations majeures : la déshydratation du milieu de collecte sous l'effet du flux d'air aspiré, la saturation des géloses par des germes interférents et dans les ambiances contaminées, le stress bactérien induit par l'échantillonnage (Stewart *et al.*, 1995). Le choix d'un prélèvement de courte durée permet de réduire ces phénomènes, mais peut affecter la représentativité de l'échantillonnage, surtout avec des systèmes à débit faible ou modéré. Le caractère représentatif de l'échantillon doit refléter la biocontamination ambiante tout en intégrant la limite de quantification imposée par le dispositif de collecte. Relativement aux impacteurs, cette limite de quantification est définie par la surface de collecte. Lorsqu'il s'agit d'une gélose contenue dans une boîte de Pétri standard, le temps de prélèvement mis en œuvre doit borner le nombre de colonies isolées à une plage de 30 à 300 unités formant colonies (Jensen *et al.*, 1994). Si aucune donnée ne permet de présumer du niveau de contamination ambiant, la multiplication de volumes d'échantillonnage différents est recommandée pour appréhender cette contrainte.

Le prélèvement en milieu liquide permet de s'affranchir de la déshydratation des cellules microbiennes collectées. La possibilité de manipuler l'échantillon préalablement à l'analyse culturale, soit par des dilutions, soit par concentration, dispense des considérations relatives à la charge aéroportée présente. Néanmoins, les ambiances polluées, notamment en poussières ou autres agrégats particulaires restent problématiques pour les observations microscopiques sur filtre. En terme de durée d'échantillonnage, les préleveurs, type AGI ou cyclones, sont sujets par ailleurs à des contraintes inhérentes à l'évaporation du liquide de collecte lors d'une utilisation prolongée (White *et al.*, 1975). Traditionnellement, les prélèvements avec l'AGI 30 n'excèdent pas 30 minutes, limite en deçà de laquelle l'efficacité de collecte reste intégrale (Grinshpun *et al.*, 1997 ; Lin *et al.*, 1997). Le BioSampler peut pallier à ce problème par l'emploi de liquides non volatils et plus visqueux dans la récupération des microorganismes aérosolisés. L'évaporation faible,

voire quasi-nulle, de ces derniers permet alors de maintenir l'efficacité de collecte du système pendant plusieurs heures (Lin *et al.*, 1999 ; 2000).

Dans des environnements peu contaminés ou dilués, l'emploi de dispositifs à fort débit est préférable pour avoir un échantillonnage représentatif, sans recourir à des temps de prélèvement trop longs. Les systèmes portables Biotest RCS, MAS-100, SAS, (~100-200 L.min<sup>-1</sup>) ou encore les cyclones pouvant fonctionner jusqu'à 1000 L.min<sup>-1</sup> (Griffiths et DeCosemo, 1994) peuvent répondre à ce besoin. L'intérêt supplémentaire du cyclone vient de la recirculation du liquide de collecte, qui permet d'intégrer simultanément à l'échantillonnage, une concentration du prélèvement. De plus, le format liquide de l'échantillon offre tous les avantages liés au choix et à la multiplication des analyses.

Concernant les échantillonneurs à filtres, le temps de collecte va être conditionné par le colmatage du média et la concentration particulaire présente dans l'environnement. La dessiccation des microorganismes collectés est également à considérer dans la détermination du paramètre temps. Par exemple, lorsqu'il s'agit d'évaluer une fraction cultivable, l'application de la filtration n'est conseillée que pour des ambiances chargées et des durées de prélèvement courtes (Palmgren *et al.*, 1986). Dans des ambiances faiblement contaminées, il peut être intéressant d'agir sur la surface filtrante si ce mode de collecte est retenu. En effet, l'utilisation d'une section surfacique réduite permet de concentrer le prélèvement sur une zone déterminée. Au cas où le prélèvement s'avérerait trop dense, il est toujours possible d'éluer, de diluer, puis de filtrer à nouveau l'échantillon, avant de procéder à l'analyse. Néanmoins, cette opération n'est pas recommandée, les dilutions successives risquant de favoriser la détection des populations prédominantes au détriment des espèces minoritaires.

#### 2.4.3. Analyses de l'échantillon

Le mode de collecte va conditionner les techniques d'analyse mises en œuvre *a posteriori*.

Le principal avantage des impacteurs sur gélose est la collecte des microorganismes sur des milieux de culture qui sont ensuite directement placés dans des conditions d'incubation favorables au développement des germes cibles. L'analyse par méthode culturale, comme il est détaillé par la suite, limite la détection à la flore cultivable, c'est-à-dire à celle capable de se multiplier sur des substrats nutritifs. Or, la plupart des bactéries stressées de l'environnement et particulièrement la flore aéroportée présentent de réelles difficultés à se développer dans de telles conditions. Par ailleurs, ce couplage métrologique ne permet pas de cibler simultanément plusieurs microorganismes. Pour cela, il serait nécessaire de multiplier le nombre de prélèvements, avec l'incertitude associée à la variation spatiale et / ou temporelle de l'aérosol environnemental.

La nature liquide des échantillons obtenus par impingement permet d'appliquer un panel de techniques analytiques plus large : ensemencement sur milieux de culture, tests biochimiques ou immunologiques, analyse moléculaire. L'impaction en milieu liquide est particulièrement adaptée à des ambiances contaminées puisque l'échantillon peut subir des dilutions préliminaires à l'analyse (Lin *et al.*, 2000), ce qui n'est pas le cas avec les impactions sur gélose. L'une des difficultés concerne la conservation de l'échantillon, de manière à préserver la viabilité des cellules microbiennes d'intérêt et ne pas favoriser le développement d'une flore parasite. Cet aspect peut être abordé par le choix d'un milieu

spécifique ou l'addition de certains agents protecteurs dans le liquide de recueil (Anderson et Cox, 1967). Néanmoins, l'analyse doit se faire le plus rapidement possible pour limiter le temps de séjour des microorganismes. S'il s'agit de détecter des microorganismes cultivables, il est recommandé de procéder dans un délai de 24 heures. La même contrainte existe avec le prélèvement sur filtre où un contact prolongé entre les cellules bactériennes et le média est susceptible d'altérer leur viabilité (Parks *et al.*, 1996).

Les particules collectées sur filtre peuvent être analysées *in situ* par microscopie ou après remise en suspension du média dans une solution tamponnée, permettant dans ces conditions l'ensemble des analyses applicables aux échantillons liquides. En cas de remise en suspension, le rendement associé à cette étape varie suivant la nature des matrices filtrantes, faible pour les membranes en ester de cellulose, de par le piégeage des particules à l'intérieur des pores, plus élevé avec les filtres polycarbonate de surface lisse. Les filtres en gélatine peuvent être visualisés en microscopie, mais il est également possible d'évaluer la flore cultivable par un dépôt direct sur gélose.

#### 2.4.4. Application au mesurage des aérosols de Légionelles

À ce jour, peu d'études relatives à la mesure des Légionelles dans les aérosols environnementaux sont relatées dans la littérature. Celles listées dans le Tableau 3 présentent parmi les sources investiguées, principalement des douches et des tours aэрoréfrigérantes, contaminées par la bactérie.

Les dispositifs d'échantillonnage les plus utilisés sont basés sur l'inertie des particules, la filtration n'ayant pour l'heure pas été reportée pour cette application spécifique. On retrouve en particulier l'Andersen à 6 étages, pour les impacteurs sur gélose, et l'impinger AGI, pour les impacteurs en milieu liquide (Bollin *et al.*, 1985 ; Breiman *et al.*, 1990 ; Ishimatsu *et al.*, 2001 ; Bordenave *et al.*, 2002). Lorsque les deux principes de collecte sont employés simultanément, l'impaction en milieu liquide semble donner de meilleurs résultats en terme de recouvrement.

En terme d'analyse, les prélèvements d'aérosols ne sont évalués dans ces études que par culture. Mais sur les échantillons contaminés en Légionelles, le nombre de colonies isolées est faible, de 1 à 5 colonies au maximum, ce qui sous-entend une incertitude importante compte tenu de la variation de la méthode par culture estimée à une unité log. En outre, en ne ciblant que la flore cultivable en Légionelles, la concentration réellement présente dans l'air est sous-estimée. C'est ce que révèle l'étude de Pascual *et al.* (2001) lesquels, en introduisant une détection par technique PCR, ont pu mettre en évidence la présence de *L. pneumophila* dans certains échantillons alors que les mesures réalisées par culture s'avéraient négatives.

Références	Sources	Biocollecteurs testés	Volume, temps d'échantillonnage	Milieu de collecte	C <sub>eau</sub> (UFC/L)	C <sub>air</sub> (UFC/L)
Dennis <i>et al.</i> , 1984	Douches	Cyclone	7500 L, 15 min	Tampon Page's saline (10 mL)	10 <sup>3</sup>	~ 3.10 <sup>-4</sup>
Bollin <i>et al.</i> , 1985	Douches	Andersen 6 ét.	430 L, 15 min	Gélose BCYE	> 2.10 <sup>5</sup>	7.10 <sup>-3</sup> à 12.10 <sup>-3</sup>
		Andersen 2 ét.	280 L, 10 min	Gélose BCYE		0
	Robinets	Andersen 6 ét.	430 L, 15min	Gélose BCYE	0 à > 2.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>-3</sup>
		Andersen 2 ét.	141 à 430 L, 5-15 min	Gélose BCYE		2.10 <sup>-3</sup> à 11.10 <sup>-3</sup>
Breiman <i>et al.</i> , 1990	Aérocondenseur	Andersen 6 ét.	810 L, 30 min	Gélose BCYEα	> 9.10 <sup>6</sup>	ND
		AGI	240 L, 30 min	Bouillon (20 mL)		2,3
	Douches	Andersen 6 ét.	270 L, 10 min	Gélose BCYEα	1 à 120.10 <sup>3</sup>	0
		AGI	80 L, 10 min	Bouillon (20 mL)		0
Ishimatsu <i>et al.</i> , 2001	TAR*	Andersen 6 ét.	849 L, 30 min	Gélose WYOα	1,2 ± 0,3.10 <sup>6</sup>	0
		Impinger modifié	600 L, 120 min	Bouillon BYE (110 mL)		9.10 <sup>-2</sup> (a)
Pascual <i>et al.</i> , 2001	TAR*	MAS 100	250 à 1000 L, 2,5 à 10 min	Gélose BCYEα	10 <sup>2</sup>	0 <sup>(b)</sup>
		Andersen 6 ét.	280 à 840 L, 10 à 30 min	Gélose GVPC		2.10 <sup>-3</sup> à 4.10 <sup>-3</sup>
Bordenave <i>et al.</i> , 2002	TAR*	ATΩ	100 à 1000 L, 1 à 10 min	Gélose GVPC	<10 <sup>2</sup> à 7.10 <sup>5</sup>	0 à 2.10 <sup>-3</sup>
		AGI 30	360 L, 30 min	Tampon PBS (20 mL)		0 à 3.10 <sup>-3</sup>

 Tableau 3 : Biocollecteurs utilisés pour le prélèvement d'aérosols de *Legionella*.

 \* Tour aéroréfrigérante ; ND : Non Déterminé (a) : isolement après stockage pendant 16 jours à 4°C ; (b) *L. pneumophila* (+) par PCR

### 3. METHODES D'ANALYSE DES LEGIONELLES

Au cours des investigations environnementales, les Légionelles sont principalement détectées dans les échantillons d'eau. Le volet analytique couvre trois approches : macroscopique (isolement de colonie sur milieu gélosé), microscopique (observation à l'échelle de la cellule) ou génomique (caractérisation du contenu en acides nucléiques).

#### 3.1. CULTURE

A l'heure actuelle, la recherche et le dénombrement des *Legionella* dans l'environnement reposent sur des techniques culturales. La procédure relative à la mesure de la bactérie dans l'eau est réglementée en France par la norme AFNOR NF T90-431 (AFNOR, 1993) actualisée en 2003. Elle est également établie au niveau international au sein de la norme ISO 11 731 de 1998.

La mise en culture des *Legionella* est longue et requiert des conditions très spécifiques. Plusieurs milieux de culture sont disponibles, mais ont été particulièrement adaptés pour l'isolement de l'espèce *Legionella pneumophila* (Lee *et al.*, 1993). Le plus utilisé est le milieu BCYE ou « Buffered Charcoal Yeast Extract », dont la composition consiste en une base de charbon activé et d'extrait de levures (Edelstein, 1981). Il est supplémenté en acides aminés et certains agents antimicrobiens peuvent lui être ajoutés pour inhiber la flore satellite, susceptible d'affecter la croissance des Légionelles (Paszko-Kolva *et al.*, 1993). C'est le cas du milieu sélectif GVPC qui n'est autre que le milieu de base BCYE, additionné de glycine et des antibiotiques vancomycine, polymyxine et cycloheximide.

Le recours à des traitements préliminaires et sélectifs permet d'optimiser l'isolement du germe à partir des échantillons d'origine environnementale. Ils consistent en une concentration du prélèvement et des traitements du concentré (dilution, chauffage et mise en contact avec une solution acide), qui utilisent les critères de résistance de la bactérie aux températures élevées et aux pH faibles.

Les géloses ensemencées sont incubées à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 10 jours, avec des observations intermédiaires réalisées tous les 2 à 3 jours. Les colonies suspectées sont examinées sur la base de leur dépendance à la L-cystéine, en les ensemencant sur un milieu dépourvu de l'acide aminé et une gélose au sang. La limite de quantification basse associée à cette technique est de 5 unités formant colonie (UFC) dénombrées sur la gélose. La limite de détection est estimée à 50 Légionelles cultivables par litre d'eau, avec une incertitude sur les mesures définies à un logarithme décimal.

L'identification des souches au niveau du genre, de l'espèce et du sérotype se fait ensuite, soit par une approche immunologique à l'aide d'anticorps conjugués à des marqueurs fluorescents (immunofluorescence directe), soit par des tests d'agglutination avec des particules de latex. Le sous-typage des espèces permet de donner des informations relatives à la source et à l'épidémiologie des cas d'infections. Il est réalisé par différentes techniques de séquençage moléculaire : électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), amplification aléatoire d'acide désoxyribonucléique polymorphique (AP-PCR ou RAPD), amplification sélective de fragments de restriction (AFLP).

La limitation majeure de la méthode culturale concerne l'existence de Légionelles viables mais non cultivables (Hussong *et al.*, 1987 ; Steinert *et al.*, 1997). Dans des environnements hostiles, les bactéries alors stressées présentent des difficultés à se multiplier, même dans des conditions optimales. Néanmoins, il a été démontré que les Légionelles à l'état viable non cultivable pouvaient recouvrer leur faculté de réplication cellulaire après inoculation à des membranes vitellines embryonnées (Hussong *et al.*, 1987) ou par une co-culture en présence de modèles amibiens (Rowbotham, 1983 ; Steinert *et al.*, 1997). Par conséquent, en bornant l'information à la flore cultivable, la culture sous-estime la proportion de bactéries viables, potentiellement infectantes (Hussong *et al.*, 1987). L'autre inconvénient est lié au phénomène de compétition des microorganismes et le développement de colonies confluentes qui rendent la lecture des boîtes de Pétri délicate, voire impossible. Les traitements préliminaires et sélectifs de l'échantillon limitent en partie ces difficultés.

### 3.2. MARQUAGES IMMUNOLOGIQUES

L'approche immunologique repose sur une association spécifique d'un antigène avec un anticorps. Il s'agit de méthodes simples de mise en œuvre qui se déclinent sous différentes formes liées à la nature de l'anticorps et au moyen de mesure de la liaison antigène - anticorps.

La méthode immunoenzymatique (ELISA ou *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) consiste à détecter un antigène en le liant à un anticorps spécifique, lui-même fixé sur un support. Un deuxième anticorps lié à une enzyme est utilisé pour la détection. L'ensemble anticorps - enzyme vient se fixer sur l'antigène. Mise en présence de son substrat, l'enzyme fixée catalyse une réaction dont le suivi permet de connaître la quantité antigénique présente dans l'échantillon initial.

Les anticorps peuvent être également marqués par des marqueurs radiologiques (RIA pour *Radio Immuno Assay*) ou fluorescents (DFA pour *Direct Fluorescent Antibody* et IFA pour *Indirect Fluorescent Antibody*). Le marquage à l'aide de fluorochromes permet la détection directe des bactéries, soit par microscopie à épifluorescence, soit par cytométrie en flux ou en phase solide.

Suivant le niveau de spécificité recherché, il est possible d'utiliser un pool d'anticorps polyclonaux, ciblant plusieurs sérogroupes de l'espèce *L. pneumophila*, ou monoclonaux, spécifiques d'un séroroupe.

Outre l'application dans le diagnostic clinique, l'isolement des Légionelles par immunofluorescence a été décrite sur des échantillons issus d'environnements aquatiques naturels et domestiques (Fliermans *et al.*, 1981, Hussong *et al.*, 1987 ; Alary et Joly, 1992).

L'approche immunologique est une méthode rapide qui permet d'accéder à la flore non cultivable. Elle est freinée par des limites liées à la spécificité des anticorps relativement à l'agent cible et aux liaisons non spécifiques avec les éléments présents dans l'échantillon. L'étude d'Aurell *et al.* (2004) montre que certains anticorps disponibles peuvent réagir avec des souches non-*Legionella*. Il s'agit notamment d'anticorps polyclonaux moins spécifiques que les anticorps monoclonaux testés, ces derniers n'entraînant quant à eux aucune réaction croisée avec d'autres souches que *Legionella*.

La spécificité de la réaction antigène - anticorps peut être prévue, entre autres, par l'élément cible contre lequel est dirigé l'anticorps. Parmi les cibles d'intérêt, sont cités les épitopes de surface de la protéine « *macrophage infectivity potentiator* » (mip) ou de l'élément lipopolysaccharide (LPS) particulier aux bactéries à Gram négatif. Dans l'étude mentionnée précédemment, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les épitopes de surface du LPS caractéristique de *L. pneumophila* (sérogroupes 1, 2-6, 8-10, 12-15) a permis le dénombrement de la bactérie dans des échantillons d'eau de réseau, en moins de 3 heures, avec une sensibilité comprise entre 10 et 100 bactéries par litre (Aurell *et al.*, 2004).

### 3.3. BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les méthodes de biologie moléculaire sont basées sur la reconnaissance d'une séquence d'acides nucléiques spécifique du genre ou de l'espèce (ADN ou ARN). Il s'agit ici de la technique par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et de la détection par amplification génique (PCR).

#### 3.3.1. La technique FISH

La technique d'hybridation *in situ* repose sur l'une des propriétés physico-chimiques des acides nucléiques : la complémentarité des bases constitutives de l'ADN (A T G C) et de l'ARN (A U G C). L'hybridation se définit comme étant l'appariement de deux séquences homologues grâce à la formation de liaisons hydrogène entre les bases puriques et pyrimidiques : 2 liaisons entre A et T (ou U) et 3 liaisons entre G et C. Elle a pour but de localiser une séquence particulière de l'acide nucléique (cible) au sein de la cellule (*in situ*) par association avec une sonde oligonucléotidique de séquence complémentaire. La sonde est marquée par un fluorochrome permettant sa détection au microscope à épifluorescence.

Généralement les ARN ribosomiaux (ARNr), notamment l'ARNr 16S, sont choisis comme cible. L'ARNr est composé de séquences constantes et de séquences variables qui permettent l'identification de taxons à différents niveaux : groupes, genres, espèces. Par ailleurs, les bactéries contiennent des quantités importantes de ribosomes, de  $10^4$  à  $10^5$  ribosomes pour une cellule à croissance rapide (DeLong *et al.*, 1989), lesquels sont autant de sites de fixation pour les sondes.

Pour la détection spécifique des Légionelles, les sondes disponibles permettent d'identifier, soit le genre *Legionella* (Manz *et al.*, 1995), soit l'espèce *L. pneumophila* (Grimm *et al.*, 1998).

La méthodologie FISH a été appliquée avec succès à la détection et au dénombrement des bactéries *Legionella* en milieu liquide (Manz *et al.*, 1995 ; Steinert *et al.*, 1997 ; Grimm *et al.*, 1998 ; Buchbinder *et al.*, 2002 ; Declerck *et al.*, 2002). Buchbinder *et al.* (2002) soulignent sa spécificité, particulièrement appréciée sur des prélèvements pluri microbiens : sur 100 échantillons d'eau contaminée en Légionelles, la FISH a révélé une sensibilité de 67% et une spécificité de 72%. L'analyse parallèle par PCR s'est avérée sensible à 96%, avec une spécificité plus faible de 47%. En outre, l'approche par hybridation *in situ* permet de visualiser les Légionelles directement au sein des amibes (Manz *et al.*, 1995 ; Grimm *et al.*, 1998).

L'application de la technique FISH, relativement à la mesure des Légionelles dans les aérosols, n'est pas encore reportée par la littérature. Il s'agit d'une approche expérimentale

dont la pertinence a toutefois été validée par un travail de recherche réalisé par l'équipe INSERM [EP] 2R en collaboration avec le CSTB (Mathieu *et al.*, 2004). Ce dosage a également été expérimenté lors de l'investigation menée suite à l'épidémie de Lens. Elle a permis de mettre en évidence la présence de Légionelles aéroportées, non détectées par culture, dans des prélèvements aériens de tours aérorefrigérantes et d'une station d'épuration (Robine et Mathieu, 2004).

La FISH est une méthode rapide (résultat obtenu en une demie journée), qui permet en outre d'apprécier la viabilité des cellules. En effet, l'intensité de la réponse est fonction du pool d'ARN ribosomal contenu dans la bactérie, qui lui-même est associé à l'état métabolique cellulaire. Le signal sera d'autant plus intense que la cellule sera active. Cette relation constitue également le principal facteur limitant, la détection pouvant être biaisée par la présence de bactéries stressées, quiescentes, contenant peu de ribosomes (Manz *et al.*, 1993).

### 3.3.2. La technique PCR

La technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est actuellement en cours d'étude pour une application réglementaire à la détection des *Legionella*. Le principe consiste à amplifier *in vitro* un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) pour en faciliter la détection. Cette amplification est réalisée en introduisant des séquences primaires complémentaires et spécifiques de la chaîne d'ADN à amplifier, appelées amorces. L'ADN cible peut être ainsi multiplié de  $10^6$  à  $10^{10}$ .

Les systèmes d'amorces disponibles visent l'ADN des *Legionella*, l'ARN ribosomal 5S (MacDonell et Colwell, 1987), l'ARN ribosomal 16S (Lisby et Dessau, 1994 ; Jonas *et al.*, 1995), ou encore le gène *mip* spécifique de *Legionella pneumophila* (Mahbubani *et al.*, 1990).

La technique PCR permet de détecter la flore bactérienne totale, active et morte, à des concentrations plus faibles qu'avec les méthodologies par culture ou utilisant le marquage par anticorps fluorescents (Yamamoto *et al.*, 1996). Elle possède un fort pouvoir discriminant grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques (Miller *et al.*, 1993 ; Palmer *et al.*, 1995). Son application à la mesure de Légionelles contenues dans un aérosol est décrite par Pascual *et al.* (2001) et révèle une détection plus sensible par rapport à la culture. Sa mise en oeuvre est également plus rapide, de 5 à 6 heures contre 3 à 10 jours pour la méthode de référence. Les limites des tests d'amplification génique sont liées à la présence d'inhibiteurs des enzymes de réplication (faux négatifs) et à la contamination des acides nucléiques lors de l'extraction de l'ADN à amplifier (faux positifs). La méthode semi-nested PCR réduirait les problèmes d'inhibition rapportés pour les échantillons environnementaux, sans altérer la sensibilité de la détection (Miyamoto *et al.*, 1997). L'information donnée par la PCR classique est qualitative : elle permet l'identification des souches et l'intercomparaison de celles issues de prélèvements différents.

Le développement de la PCR quantitative introduit l'appréciation en temps réel de l'efficacité de l'amplification et la quantification du matériel amplifié (Ballard *et al.*, 2000 ; Wellinghausen *et al.*, 2001). Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ADN ou unités génomiques par litre d'eau ou d'air. En terme de sensibilité, les résultats sont comparables à ceux obtenus avec une PCR classique (Ballard *et al.*, 2000).

## 4. CONCLUSION

Diverses méthodologies de collecte et d'analyses sont actuellement disponibles pour appréhender le mesurage des aérosols biologiques. Néanmoins, aucune métrologie recensée ne dispose d'une application universelle et il n'existe pour l'heure aucune procédure standardisée pour évaluer la contamination biologique aéroportée.

Le choix d'un biocollecteur doit dépendre des objectifs de la mesure (microorganisme cible, détermination de la flore totale, viable ou cultivable) et des contraintes inhérentes à l'environnement investigué (niveau de contamination, paramètres aérauliques, variables météorologiques, accessibilité).

En termes de performances, un biocollecteur doit permettre de collecter une fraction représentative de l'aérosol biologique avec un minimum de stress pour les microorganismes. Les études relatives à l'évaluation des biocollecteurs permettent de dégager une efficacité physique de collecte caractéristique pour la plupart des systèmes disponibles. L'efficacité biologique, quant à elle, est bien moins connue, l'impact du préleveur sur la viabilité des microorganismes collectés, n'étant, dans les travaux décrits, généralement pas dissocié des phénomènes induits par la phase d'aérosolisation et l'état d'aérosol.

La mesure des Légionelles dans les aérosols est un champ d'investigation encore peu développé. Les travaux référencés sur ce sujet mentionnent l'utilisation de préleveurs inertiels, impacteur Andersen, impinger AGI ou cyclone, efficaces sur la fraction particulaire micronique. Aucune relation claire entre les concentrations mesurées dans l'eau et dans l'air ne ressort de ces études. La variabilité des conditions opératoires rend complexe l'intercomparaison des mesures d'aérobiocontamination d'une étude à l'autre. Néanmoins, en terme de recouvrement de bactéries cultivables, les prélèvements réalisés en milieu liquide semblent donner de meilleurs résultats. Ils offrent en outre l'avantage de pouvoir procéder à des traitements préalables de l'échantillon et d'appliquer plusieurs techniques analytiques suivant l'information recherchée. Parmi ces préleveurs en milieu liquide, le cyclone favorise, par ses caractéristiques de fonctionnement, la représentativité de l'échantillonnage.

En matière de détection de Légionelles, la méthode normative repose sur un dénombrement des bactéries planctoniques présentes dans l'eau, mais affiche des limites sur la représentativité de la contamination mesurée et le délai d'obtention des résultats. Le développement de méthodes alternatives par biologie moléculaire (techniques FISH et PCR) permet de disposer d'outils de détection plus performants, en termes de sensibilité et de spécificité et améliore considérablement le temps de réponse. Dans cette approche moléculaire, la technique par hybridation *in situ* s'avère particulièrement intéressante par son appréciation quantitative de la contamination en Légionelles.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Agence Française de Normalisation, (1993).**

Norme AFNOR T90-431. Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*. Révision en 2003.

in *Normalisation française*, Ed. by AFNOR (Paris).

**Agence Française de Normalisation, (2000).**

Norme AFNOR EN 13098. Atmosphère des lieux de travail – Règles pour le mesurage de microorganismes et d'endotoxine en suspension dans l'air.

in *Normalisation française*, Ed. by AFNOR (Paris).

**Aizenberg V., Reponen T., Grinshpun S.A. and Willeke K., (2000).**

Performance of air-O-Cell, Burkard and Button samplers for total enumeration of airborne spores.

*Am. Ind. Hyg. Assoc.*, **61**, pp. 855-864.

**Alary M. and Joly J.R., (1992).**

Comparison of culture methods and a immunofluorescence assay for the detection of *Legionella pneumophila* in domestic hot water devices.

*Curr. Microbiol.*, **25**, pp. 19-23.

**Andersen A., (1958).**

New Sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles.

*J. Bacteriol.*, **76**, pp. 481-484.

**Anderson J.D. and Cox C.S., (1967).**

Microbial survival.

*Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **17**, pp. 203-226.

**Aurell H., Catala P., Farge P., Wallet F., Le Brun M., Helbig J.H., Jarraud S. and Lebaron P., (2004).**

Rapid detection and enumeration of *Legionella pneumophila* in hot water systems by solid-phase cytometry.

*Appl. Envir. Microbiol.*, **70**(3), pp. 1651-1657.

**Baleux B. and Got P., (1996).**

Apport de l'observation microscopique couplée à l'analyse d'images dans l'évaluation de la qualité bactériologique des eaux: approche cellulaire globale.

*TSM*, **6**, pp. 430-436.

**Ballard A.L., Fry N.K., Chan L., Surman S.B., Lee J.V., Harrison T.G. and Towner K.J., (2000).**

Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay.

*J. Clin. Microbiol.*, **38**(11), pp. 4215-4218.

**Balty I. and Bayeux-Dunglas M.C., (2004).**

Légionelles et milieu de travail.

*D.M.T.*, Ed. by INRS, n°98, pp. 173-199.

**Baron P.A. and Willeke K., (1993).**

Aerosol measurement, principles techniques and applications. Ed. by Willeke K. and Baron P.A.

**Benbough J.E., Bennett A.M. and Parks S.R. (1993).**

Determination of the collection efficiency of a microbial air sampler.  
*J. Appl. Bacteriol.*, **74**(2), pp. 170-173.

**Bollin G.E., Plouffe J.F., Para M.F. and Hackmann B., (1985).**

Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets.

*Appl. Envir. Microbiol.*, **50**(5), pp. 1128-1131.

**Bordenave L., Dubrou S., Mouilleseaux A., Bex V., Carlier D. and Squinazi F., (2002).**

Detection of *Legionella pneumophila* in environmental aerosols of cooling towers by impact sampling methods.

In *Proceedings of Indoor air 2002*, pp. 411-416.

**Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J. and Desjardins R., (1999).**

LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water.

*J. Microbiol. Methods*, **37**, pp. 77-86.

**Bourdillon R.B., Lidwell O.M. and Thomas J.C., (1941).**

A slit sampler for collecting and counting airborne bacteria.

*J. Hyg.*, **14**, pp. 197-224.

**Brachman P.S., Ehrlich R., Eichenwald H.F, Gabelli V.J., Kethley T.W., Madin S.H., Maltman M.F., Middlebrook G., Morton J.D., Silver I.H., and Wolfe E.K., (1964).**

Standard sampler for assay of airborne microorganisms.

*Science*, **144**, pp.1295.

**Bradley D., Burdett G.J., Griffiths W.D. and Lyons C.P., (1992).**

Design and performance of size selective microbiological samplers

*J. Aerosol. Sci.*, **23**, suppl. 1, pp. 659-662.

**Breiman R.F., Cozen W., Fields B.S., Mastro T.D., Carr S.J., Spika J.S. and Mascola L., (1990).**

Role of air sampling in investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser.

*J. Infect. Dis.*, **161**(6), pp. 1257-1261.

**Brindle R.J., Bryant T.N. and Draper P.W., (1989).**

Taxonomic investigation of *Legionella pneumophila* using monoclonal antibodies.

*J. Clin. Microbiol.*, **27**(3), pp. 536-539.

**Buchbinder S., Trebesius K. and Heesemann J., (2002).**

Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence *in situ* hybridization, PCR amplification and bacterial culture.

*Int. J. Med. Microbiol.*, **292**(3-4), pp. 241-245.

**Buttner M.P., Willeke K. and Grinshpun S.A., (1997).**

Sampling and analysis of airborne microorganisms.

In *Manual of Environmental Microbiology*. Ed. by Hurst C.J., Knudsen G.R. McInerney M.J., Stetzenbach L. D. and Walter M.V., American Society for Microbiology Press, Washington, D.C, pp. 137-140.

**Clark S., Lach V. and Lidwell O.M., (1981).**

The performance of the Biotest RCS centrifugal air sampler.

*Hosp. Infect.*, **2**(2), pp.181-186.

**Cox C.S. and Wathes C.M., (1995).**

*Bioaerosol handbooks*. Ed. by Cox C.S. and Wathes C.M., 621 p.

**Crook B., (1995).**

Inertial samplers : biological perspectives.

Chapter 9 in *Bioaerosol handbooks*. Ed. by Cox C.S. and Wathes C.M., pp. 247-268.

**Crook B., (1995).**

Non-inertial samplers : biological perspectives.

Chapter 10 in *Bioaerosol handbooks*. Ed. by Cox C.S. and Wathes C.M., pp. 269-283.

**Declerck P., Verelst L., Duvivier L., Van Damme A. and Ollevier F., (2003).**

A detection method for *Legionella* spp. in (cooling) water : fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) on whole bacteria.

*Water Sci. Technol.*, **47**, pp. 143-146.

**Delong E.F., Wickham G.S. and Pace N.R., (1989).**

Phylogenetic stains: ribosomal RNA based probes for the identification of single cells.

*Science*, **243**, pp. 1360-1363.

**Dennis P.J., Wright A.E., Rutter D.A., Death J.E. and Jones B.P.C., (1984).**

*Legionella pneumophila* in aerosol from shower baths.

*J. Hyg. (Camb)*, **93**(2), pp. 349-353.

**Edelstein P.H., (1981).**

Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens.

*J. Clin. Microbiol.*, **14**(3), pp. 298-303.

**Errington F.P. and Powell E.O., (1969).**

A cyclone separator for aerosol sampling in the field.

*J. Hyg. (Lond)*, **67**(3), pp. 387-399.

**Feeley J.C., Gorman G.W., Weaver R.E., Mackel D.C. and Smith H.W., (1978).**

Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium.

*J. Clin. Microbiol.*, **8**(3), pp. 320-325.

**Feeley J.C., Gibson R.J., Gorman G.W., Langford N.C., Rasheed J.K., Mackel D.C. and Baine W.B., (1979).**

Charcoal-yeast extract agar : primary isolation medium for *Legionella pneumophila*.

*J. Clin. Microbiol.*, **10**(4), pp. 437-441.

**Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L. and Pope D.H., (1981).**

Ecological distribution of *Legionella pneumophila*.

*Appl. Envir. Microbiol.*, **41**(1), pp. 9-16.

**Griffiths W.D. and Decosemo G.A.L., (1994).**

The assessment of bioaerosols : a critical review.

*J. Aerosol. Sci.*, **25**(8), pp. 1425-1458.

**Griffiths W.D., Stewart I.W., Reading A.R. and Futter S.J., (1996).**

Effect of aerosolization, growth phase and residence time in spray and collection fluids on the culturability of cells and spores.

*Aerosol Sci. Technol.*, **27**(5), pp.803-820.

**Griffiths W.D., Stewart I.W., Futter S.J., Upton S.L. and Mark D., (1997).**

The development of sampling methods for the assessment of indoor bioaerosols.

*J. Aerosol. Sci.*, **28**(3), pp. 437-457.

**Grimm D., Merkert H., Ludwig W., Schleifer K.H., Hacker J. and Brand B.C., (1998).**

Specific detection of *Legionella pneumophila* : construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe.

*Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(7), pp. 2686-2690.

**Grinshpun S.A., Chang C.-W., Nevalainen A. and Willeke K., (1994).**

Inlet characteristics of bioaerosol samplers.

*J. Aerosol. Sci.*, **25**(8), pp. 1503-1522.

**Grinshpun S.A., Willeke K., Ulevicius V., Juozaitis A., Terzieva S. Donnelly J., Stelma G.N. and Brenner K. (1997).**

Effect of impaction, bounce and reaerosolization on collection efficiency of impingers.

*Aerosol Sci. Technol.*, **26**(4), pp. 326-342.

**Helbig J.H., Kurtz J.B., Pastoris M.C., Pelaz C. and Lück P.C., (1997).**

Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups.

*J. Clin. Microbiol.*, **35**(11), pp. 2841-2845.

**Henningson E.W. and Ahlberg M.S., (1994).**

Evaluation of microbiological aerosol samplers: a review.

*J. Aerosol. Sci.*, **25**(8), pp. 1459-1492.

**Hinds W.C., (1982).**

Aerosol Technology. Ed. by John Wiley and sons, New York.

**Hussong D., Colwell R.R., O'Brien M.O., Weiss E., Pearson A.D., Weiner R.M. and Burge W.D., (1987).**

Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media.  
*BioTechnology*, **5**, pp. 947-950.

**Ishimatsu S., Miyamoto H., Hori H., Tanaka I and Yoshida S.-I., (2001).**

Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower.

*Ann. Occup. Hyg.*, **45**(6), pp. 421-427.

**Jaulhac B., Nowicki M., Bornstein N., Meunier O., Prevost G., Piemont Y., Fleurette J. and Monteil H., (1992).**

Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification.  
*J. Clin. Microbiol.*, **30**(4), pp. 920-924.

**Jensen P.A., Todd W.F., Davis G.N. and Scarpino P.Y., (1992).**

Evaluation of eight bioaerosols samplers challenged with aerosols of free bacteria.  
*Am. Ind. Hyg. Assoc.*, **53**(10), pp. 660-667.

**Jensen P.A., Lighthart B. Mohr A.J. and Shaffer B.T., (1994).**

Microbial bioaerosol instrumentation.

Chapter 8 in *Atmospheric microbial aerosols. Theory and applications*. Ed. by Lighthart B. and Mohr A.J., Chapman and Hall, New York, pp. 226-284.

**Jonas D., Rosenbaum A., Weyrich S. and Bhakdi S., (1995).**

Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *Legionellae* in bronchoalveolar fluid.

*J. Clin. Microbiol.*, **33**(5), pp. 1247-1252.

**Juozaitis A., Willeke K., Grinshpun S.A. and Donnelly J., (1994).**

Impaction onto a glass or agar versus impingement into a liquid for the collection and recovery of airborne microorganisms.

*Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(3), pp. 861-870.

**Kang Y.J. and Frank J.F., (1989).**

Biological aerosols: a review of airborne contamination and its measurements in dairy processing plants.

*J. Food Prot.*, **52**, pp. 512-524.

**Kang Y.J. and Frank J.F., (1990).**

Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants.

*J. Dairy Sci.*, **73**, pp. 621-626.

**Koller W. and Rotter M., (1974).**

Further investigations on the suitability of gelatine filters for the collection of airborne bacteria.

*Zentralbl. Bakteriol.*, **159**, pp. 546-559.

**Lach V., (1985).**

Performance of the surface air system air samplers.  
*J. Hosp. Infect.*, **6**(1), pp. 102-107.

**Lee K.W. and Ramamurthi M., (1993).**

Filter collection.

In *Aerosol measurement, principles techniques and applications*. Ed. by Willeke K. and Baron P.A, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 179-205.

**Lee T.C., Vickers R.M., Yu V.L. and Wagener M.M., (1993).**

Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study.  
*J. Clin. Microbiol.*, **31**, pp. 2764-2768.

**Leopold S.S., (1988).**

“Positive hole” statistical adjustment for a two-stage, 200-hole-per-stage Andersen air sampler.

*Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **49**(2), pp. A88-A90.

**Li C.-S., Hao M.L., Lin W.H., Chang C.W. and Wang C.S., (1999).**

Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms.  
*Aerosol Sci. Technol.*, **30**, pp.100-108.

**Lin X., Willeke K., Ulevicius V. and Grinshpun S.A., (1997)**

Effect of sampling time on the collection efficiency of all-glass impingers  
*Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **58**(7), pp. 480-488.

**Lin X., Reponen T.A., Willeke K., Grinshpun S.A., Foarde K.K. and Ensor D.S., (1999).**

Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid.  
*Atmos. Environ.*, **33**(26), pp. 4291-4298.

**Lin X., Reponen T.A., Willeke K., Wang Z., Grinshpun S.A. and Trunov M., (2000).**

Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection.  
*Aerosol Sci. Technol.*, **32**(3), pp. 184-196.

**Lippmann M., (1989).**

Sampling aerosols by filtration.

In *Air sampling instruments for evaluation of atmospheric contaminants*. Ed. by ACGIH, Cincinnati, pp. 305-336.

**Lisby G. and Dessau R., (1994).**

Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples.

*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **13**(3), pp. 225-231.

**Lundholm I.M., (1982).**

Comparison of methods for quantitative determinations of airborne bacteria and evaluation of total viable counts.

*Appl. Environ. Microbiol.*, **44**(1), pp. 179-183.

**McDonnell M.T. and Colwell R.R., (1987).**

The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*.

*Nucleic Acids Res.*, **15**(3), pp. 1335

**Macher J.M., (1989).**

Positive-hole correction of multiple-jet impactors for collecting viable microorganisms.

*Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **50**(11), pp. 561-568.

**Macher J.M., (1997).**

Evaluation of bioaerosol sampler performance.

*Appl. Occup. Environ. Hyg.*, **12**, pp. 730-736.

**Macher J.M. and First M.W., (1983).**

Reuter centrifugal air sampler : measurement of effective airflow rate and collection efficiency.

*Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(6), pp. 196-1962.

**Macher J.M. and First M.W., (1984).**

Personal air samplers for measuring occupational exposure to biological hazards.

*Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **45**, pp. 76-83.

**Mahbubani M.H., Bej A.K., Miller R., Haff L., DiCesare J. and Atlas R.M., (1990).**

Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods.

*Mol. Cell. Probes*, **4**(3), pp. 175-187.

**Mainelis G., Adikhari A. Willeke K., Lee S.-A., Reponen T. And Grinshpun S.A., (2002).**

Collection of airborne microorganism by a new electrostatic precipitator.

*J. Aerosol. Sci.*, **33** (8), pp. 1417-1433.

**Manz W., Szewzyk U., Ericsson P., Amann R., Schleifer K.H. and Stenström T.A., (1993).**

In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes.

*Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(7), pp. 2293-2298.

**Manz W., Amann R., Szewzyk R., Szewzyk U., Stenström T.A., Hutzler P. and Schleifer K.H., (1995).**

*In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy.

*Microbiology*, **141**(Pt 1), pp. 29-39.

**Marchal N., (1976).**

La morphologie des bactéries.

Chapter 6 in *Initiation à la microbiologie*. Ed. by Technique et vulgarisation, pp. 91-92.

**Mathieu L., Deloge M., Landelle C., Ha T.L. and Robine E., (2004).**

Caractérisation de l'exposition aux aérosols de Légionelles : approches métrologique et épidémiologique.

Rapport *Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail*, Programme Santé – Environnement 2002, 104 p.

**May K.R., (1966).**

Multistage liquid impinger.

*Bact. Rev.*, **30**, pp. 559-570.

**Meier R. and Zingre H., (2000).**

Qualification of air sampler systems : the MAS-100.

*Swiss Pharma*, **22**, pp. 15-21.

**Miyamoto H., Yamamoto H., Arima K., Fujii J., Maruta K., Izu K., Shiomori T. and Yoshida S., (1997).**

Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in-hospital cooling-tower water.

*Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(7), pp. 2489-2494.

**Mitchell J.P., (1995).**

Particle size analyzers: practical procedures and laboratory techniques.

Chapter 8 in *Bioaerosol handbooks*. Ed. by Cox C.S. and Wathes C.M., pp. 177-246.

**Miller L.A., Beebe J.L., Butler J.C., Martin W., Benson R., Hoffman R.E. and Fields B.S., (1993).**

Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever.

*J. Infect. Dis.*, **168**(3), pp. 769-772.

**Moter A. and Göbel U.B., (2000).**

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms.

*J. Clin. Microbiol.*, **41**, pp. 85-112.

**Murdoch D.R., Walford E.J., Jennings L.C., Light G.J., Schousboe M.I., Cheresky A.Y., Chambers S.T. and Town G.I., (1996).**

Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia.

*Clin. Infect. Dis.*, **23**(3), pp. 475-480.

**Nevalainen A., Pastuszka J., Liebhaber F. and Willeke K., (1992).**

Performance of bioaerosol samplers : collection characteristics and sampler design considerations.

*Atmos. Environ.*, **26**(4), pp. 531-540.

**Nevalainen A., Willeke K., Liebhaber F., Pastuszka J., Burge H. and Henningson E., (1993).**

In *Bioaerosol sampling : aerosol measurement principles, techniques and applications*.

Ed. by Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 471-492.

**Palmer C.J., Bonilla G.F., Roll B., (1995).**

Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the Enviroamp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(2), pp. 407-412.

**Palmgren U., Ström G., Malmberg P. and Blomquist G., (1986).**

The Nucleopore method : a technique for enumeration of viable and non viable airborne microorganisms.  
*Am. J. Ind. Med.*, **10**, pp. 325-327.

**Parks S.R., Bennett A.M. and Benbough J.E., (1996).**

An assessment of the Sartorius MD8 microbiological air sampler.  
*J. Appl. Bacteriol.*, **80**(5), pp. 529-534.

**Pascual L., Perez-Luz S., Amo A., Moreno C., Apraiz D. and Catalan V., (2001).**

Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction.  
*Can. J. Microbiol.*, **47**, pp. 341-347.

**Paszko-Kolva C., Hacker P.A., Stewart M.H. and Wolfe R.L., (1993).**

Inhibitory effect of heterotrophic bacteria on the cultivation of *Legionella dumofii*.  
In *Legionella : current status and emerging perspectives*. Ed. by Barbaree J.M., Breiman R.F. and Dufour A.P., American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 203-205.

**Renoux A. and Boulaud D., (1998).**

Les aérosols, physique et métrologie.  
Ed.by Lavoisier, 301 p.

**Robine E. and Mathieu L., (2004).**

Mesure des aérosols de légionelles potentiellement disséminés par le lagunage de la société NOROXO.  
Rapport *Centre Scientifique et Technique du Bâtiment*, 15 p.

**Rowbotham T.J., (1983).**

Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae.  
*J. Clin. Pathol.*, **36**(9), pp. 978-986.

**Steinert M., Emody L., Amann R. and Hacker J., (1997).**

Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(5), pp. 2047-2053.

**Stewart S.L., Grinshpun S.A., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V. and Donnelly J., (1995).**

Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface.  
*Appl. Envir. Microbiol.*, **61**(4), pp. 1232-1239.

**Richardson J.F. and Wooding, E.R., (1955).**

The use of sedimentation cell in the sampling of aerosols.

*Chem. Engin. Sc.*, **4**, pp. 26-28.

**Tyler M.E. and Shipe E.L., (1959).**

Bacterial aerosol samplers I. Development and evaluation of the all-glass impinger.  
*Appl. Microbiol.*, **7**, pp. 337-349.

**Watson H.H., (1958).**

The sampling efficiency of the thermal precipitator.  
*Br. J. Appl. Phys.*, **9**, pp.78-79.

**Wellinghausen N., Frost C. and Marre R., (2001).**

Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR.  
*Appl. Envir. Microbiol.*, **67**(9), pp. 3985-3993.

**White L.A., Hadley D.J., Davids D.E. and Naylor R., (1975).**

Improved large volume sampler for the collection of bacterial cells from aerosol.  
*Appl. Microbiol.*, **29**(3), pp. 335-339.

**Willeke K., Lin X. and Grinsphun S.A., (1998).**

Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion.  
*Aerosol Sci. Technol.*, **28**, pp. 439-456.

**Wolf H.W., Skaliy P., Hall L.B. and Harris M.M., (1964).**

Sampling microbiological aerosols.  
*Public Health Monographs*, **60**(686), 52 p.

**Yamamoto H., Hashimoto Y. and Ezaki T., (1996).**

Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation.  
*FEMS Microbiol. Ecol.*, **20**, pp. 149-154.