

Université de Montréal

Évaluation de la biomasse fongique dans les systèmes de ventilation

par
Marie Jeanne BIYEME BI MVE

Département de santé environnementale et santé au travail
École de Santé Publique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maitrise ès Sciences (M.Sc.) en santé
environnementale et santé au travail
option recherche

Décembre 2015

© Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve

RÉSUMÉ

Le nettoyage des systèmes de Chauffage, Ventilation et Climatisation de l'Air est important pour assurer une bonne qualité d'air intérieur. Le déclenchement de leur nettoyage est basé sur une inspection visuelle qui ne tient pas compte du contenu en moisissures, lesquelles ont des effets sur le système respiratoire. Cette recherche vise à proposer une méthode d'évaluation du contenu en moisissures afin d'aider les gestionnaires d'immeuble. Cinq générations de poussières ont été effectuées pour simuler un conduit de ventilation. Une cassette modifiée 37 mm et un filtre CPV pré-pesés ont utilisés pour collecter les poussières déposées avec une pompe calibrée à 15L/min. Les pourcentages de collecte des cassettes et des filtres ont été calculés pour 54 échantillons. Dix générations supplémentaires de poussières ont été effectuées concomitamment avec la génération de spores. Soixante échantillons ont été analysés selon quatre méthodes : culture, comptage direct des spores par microscopie (CDSM), dosage de β -N-acétylhexosaminidase (NAHA), 18S-q-PCR. La limite de détection (LD), la réplicabilité, la répétabilité, le nombre de spores et le coefficient de corrélation (r) ont été déterminés. Les récupérations de poussières étaient supérieures à 84%. Selon la méthode analytique, les concentrations médianes de spores/100 cm² allaient de 10 000 à 815 000. Les LD variaient dépendamment de la méthode de 120 à 218 000 spores/100 cm² et r de -0.08 à 0.83. La réplicabilité et la répétabilité étaient de 1% et 1% pour PCR; 5% et 10% pour CDSM; 6% et 15% pour NAHA; 12% et 11% pour culture. La méthode de collecte a démontré une excellente efficacité de récupération. La PCR est la méthode analytique recommandée pour l'évaluation fongique des systèmes de ventilation. Une validation terrain est en cours.

Mots clés : systèmes de ventilation, poussières de surface, cassette d'aspiration, moisissures, culture, PCR, microscopie, dosage β -N-acétylhexosaminidase.

ABSTRACT

Cleaning systems for Heating Ventilation and Air Conditioning is important to ensure good indoor air quality. The outbreak of their cleaning is based on a visual inspection does not take into account the content molds, which have effects on the respiratory system. This research aims at providing a mold content of the assessment methodology to help building managers. Five dust generations were made in an exposition chamber mimicking a HVAC duct system. A modified 37-mm cassette with a pre-weighed PVC filter was used to collect the settled dust at a flow rate of 15L/min. Particles recovery percentages collected by the cassettes and those deposited on the filters were calculated for 54 samples. Ten other generations were performed with dust using different levels of mold spores. Sixty samples were analyzed with four methods : culture on Malt Extract Agar, direct microscopic spores count (DMSC), Beta-N-Acetylhexosaminidase assay (NAHA) and 18S-q-PCR assay. The detection limit (DL), replicability, repeatability, the number of spores and correlation coefficient (r) were determined. The recovery percentages were greater than 84%. According methods, the median concentration of spores/100 cm² ranged from 10,000 to 815,000. The DL varies depending on the method from 120 to 218,000 spores/100 cm² and from -0.08 to 0.83. Replicability and repeatability were 1% and 1% for PCR, 5% and 10% for DMSC, 6% and 11% for NAHA, 12% and 11% for culture. The sampling method showed excellent dust collection efficiency. The PCR method is recommended for fungal evaluation of ventilation systems. A field validation is underway.

Keywords : Ventilation systems, surface dust, vacuum cassette, molds, culture, PCR, microscopy, β -N-acétylhexosaminidase assay.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	ix
DÉDICACES	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1. Les moisissures	1
1.1.1. Généralités sur les moisissures.....	1
1.1.2. Écologie des moisissures.....	2
1.1.3. Les moisissures dans les environnements intérieurs.....	3
1.1.4. Effets des moisissures sur la santé	4
1.1.5. Recommandations sur les expositions des moisissures.....	9
1.2. Les systèmes de chauffage, ventilation et conditionnement de l'air (CVCA).....	10
1.2.1. Composants des systèmes CVCA	10
1.2.2. Types de CVCA	11
1.2.3. Traitements de l'air	11
1.2.4. Nettoyage des CVCA	12
1.3. Problématique et objectifs du projet.....	14
II. MÉTHODOLOGIE.....	16
2.1. Poussières.....	16
2.2. Chambre de génération.....	16
2.3. Validation de la méthode de prélèvement des poussières.....	17
2.3.1. Méthode de prélèvement par aspiration	17
2.3.2. Méthode de prélèvement par essuyage (frottis).....	18
2.4. Validation et comparaison des méthodes analytiques des moisissures	18

2.4.1. Souches fongiques	19
2.4.2. Validation des méthodes analytiques des moisissures.....	19
2.4.3. Comparaison des méthodes analytiques des moisissures.....	20
2.5. Évaluation de coûts et des bénéfices de chaque méthode.....	26
III. ARTICLE 1 : UNE MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE OPTIMISÉE POUR LA COLLECTE DES DÉPÔTS DE POUSSIÈRES DE SURFACE DANS LES SYSTÈMES DE CHAUFFAGE, VENTILATION ET CONDITIONNEMENT DE L'AIR (CVCA).....	27
3.1. Contribution des auteurs	27
3.2. Abstract.....	29
3.3. Introduction	30
3.4. Materials and methods	31
3.4.1. Dust preparation	31
3.4.2. Dust generation system.....	31
3.4.3. Sampling method	32
3.4.4. Data analysis.....	33
3.5. Results.....	33
3.6. Discussion and conclusion	34
3.7. Acknowledgments.....	37
3.8. Declaration of interest.....	37
3.9. References.....	38
3.10. Figures	40
IV. ARTICLE 2 : COMPARAISON DES MÉTHODES POUR ÉVALUER LA BIOMASSE MYCOLOGIQUE DANS LES POUSSIÈRES DES SYSTÈMES DE CHAUFFAGE, VENTILATION ET CONDITIONNEMENT DE L'AIR (CVCA).....	42
4.1. Contribution des auteurs	42
4.2. Abstract.....	44
4.3. Introduction	45
4.4. Materials and methods.....	46
4.4.1. Mold strains and fungal cultures.....	46
4.4.2. Analytic method validation	46
4.4.3. Comparison of analytic methods	47
4.4.4. Data analysis.....	49
4.5. Results.....	50
4.5.1 Analytical methods validation	50

4.5.2 Comparison methods	50
4.6. Discussion and conclusion	50
4.7. Acknowledgments.....	54
4.8. Declaration of interests.....	54
4.9. References.....	55
4.10. Tables and figures	58
V. ÉVALUATION DES COÛTS ET DES BÉNÉFICES DE CHAQUE MÉTHODE.....	61
VI. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	62
6.1. Méthode de prélèvement des poussières.....	62
6.2. Comparaison des méthodes analytiques des moisissures.....	63
VII. CONCLUSION.....	66
BIBLIOGRAPHIE	67
APPENDICES	i

LISTE DES TABLEAUX

Partie I

Tableau I. Critères de déclenchement de nettoyage des systèmes de ventilation.....	14
--	----

Partie II

Tableau I. Séquences des amorces et sondes testées	25
--	----

Partie IV

Tableau I. Universal system (primers and probe) used for amplifying the mold by the PCR method.....	58
---	----

Tableau II. Analytical parameters to evaluate the sensitivity and accuracy of each method for mold analysis in dust.....	58
--	----

Partie V

Tableau I. Comparaison des méthodes d'analyse de la flore mycologique dans la poussière des systèmes CVCA en fonction du temps de réalisation, des délais d'analyse et des coûts	61
--	----

LISTE DES FIGURES

Partie II

Figure 1. Photographie de la cassette de prélèvement	17
Figure 2. Photographie du frottis	18
Figure 3. Photographie du prélèvement de spores à l'aide d'un écouvillon	19
Figure 4. Photographie d'un échantillon de culture après 7 jours d'incubation à 25°C	22
Figure 5. Photographie des spores au microscope (1600X)	23
Figure 6. Principe du dosage de la Béta-N-Acétylexosaminidase	24
Figure 7. Schéma des sous-unités de l'ARNr des eucaryotes et la position des amorces testées ..	25

Partie III

Figure 1. Generation Chamber.....	40
Figure 2. Dust losses (%) between the plate and the cassette (Plate-Cassette) and between the cassette and the filter (Cassette-Filter).....	40
Figure 3. Dust losses (%) between the plate and the cassette at different dustiness levels	41
Figure 4. Dust losses (%) between the cassette and the filter at different dustiness levels	41

Partie IV

Figure 1. Average of masses of dust ($\text{mg}/100 \text{ cm}^2$) (A) and the CFU/ 100 cm^2 (B) obtained for each of the ten concurrent generations of dust and mold spores	59
Figure 2. Average spores (or CFU) reported for each method for sixty samples of dust analyzed	59
Figure 3. Linear associations and Pearson correlation coefficient obtained between the different analytical methods.....	60

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

18S :	Petite sous unité ribosomique 18 des eucaryotes
28S :	Grande sous unité ribosomique 28 des eucaryotes
5.8S :	Petite sous unité ribosomique 5.8 des eucaryotes
ACGIH :	American Conference of Governmental Industrial Hygienist
ADN :	Acide Désoxiribonucléique
ANOVA :	Analyse de variance
ARNr :	Acide Ribonucléique ribosomique
ASPEC :	Association Française pour la Prévention et l'Étude de la Contamination
AV :	Analysis Value
A _w :	Water Activity
BV :	Blank Value
CIRC :	Centre International de Recherche sur le Cancer
COV :	Composé Organique Volatil
CPV (PVC) :	Chlorure de Polyvinyle (Polyvinyl Chlorid)
CDSM (DMSC) :	Comptage Direct des Spores par Microscopie (Direct Microscopic Spores Count)
C _t :	Cycle threshold
CV :	Coefficient de Variation
CVCA (HVAC) :	Chauffage, Ventilation et Conditionnement de l'Air (Heating, Ventilating, Air Conditioning)
DMENO :	Dose Minimale entraînant un Effet Nocif Observable
EMS :	Environmental Monitoring Systems
ET :	Écart Type
FF :	Amorce Fungi Forward
FR :	Amorce Fungi Reverse
IgE :	Immunoglobuline E
IgG :	Immunoglobuline G
INSPQ :	Institut National de Santé publique du Québec

IRSST :	Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail
ITS :	Internal Transcribed Spacer
LD :	Limite de Détection (Detection Limit)
LOEL :	Lowest Observed Effect Levels
MFECM (MCE) :	Membrane en Fibres d'Ester de Cellulose Mélangés (Mixed Cellulose Ester)
MV :	Mycometer Value
NADCA :	National Air Duct Cleaners Association
NAHA	β -N-acétylhexosaminidase
NIOSH :	National Institute for Occupational Safety and Health
ODTS :	Organic Dust Toxic Syndrome
OMS (WHO) :	Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)
QAI (IAQ) :	Qualité de l'Air Intérieur (Indoor Air Quality)
q-PCR :	Polymerase Chain Reaction quantitative
Q-Q :	Quantile-Quantile
r :	Coefficient de corrélation de Pearson
rpm :	rotation par minute
UFC (CFU) :	Unité Formant une Colonie (Colony Forming Unit)
URF :	Unité Relative de Fluorescence
UV :	Ultraviolets
V_e :	Volume de l'échantillon
V_f :	Volume filtré
VLE :	Valeur Limite d'Exposition

DÉDICACES

À mes parents décédés :

Jacqueline Ntsame Assa et Jean-Marie Mve Ndong, qui m'ont inculqué les valeurs nobles, surtout la résilience. Elle a été possible grâce à cette structuration de ma personnalité dès mon plus jeune âge.

À mes nombreux grands frères et sœurs :

Maman Clémentine, Papa Ndong Mve (parti aussi trop tôt), Maman Ntsame Ndong, Sœur Brigitte, Jean-Joel, Betougou, Toto, Sam et Nana, qui ont repris le flambeau après la disparition de nos parents. Sans vous, je n'aurais pas pu continuer les études et vivre ces expériences constructives.

À mon petit frère :

Cyrille, j'aimerais tant te soutenir comme l'ont fait les autres pour moi, mais...

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Geneviève Marchand et Maximilien Debia de m'avoir fait confiance en acceptant de me confier ce projet et de m'avoir encadré rigoureusement tout le long de ce travail. Merci pour vos conseils et vos critiques constructives qui m'ont poussé à aller chercher le meilleur. Geneviève, merci pour tes encouragements perpétuels. Je n'ai pas lâché, ce n'est pas ma nature.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit des personnes qui ont contribué de façon substantielle à la réalisation de ce projet. Je pense notamment à Yves Cloutier, Nancy Lacombe, Carole Pépin et Pierre Drouin. Je voudrais vous témoigner toute ma reconnaissance pour vos connaissances et votre savoir-faire. Yves et Nancy, merci aussi de m'avoir initié au « bricolage en recherche ».

Je remercie aussi Jacques Lavoie d'avoir accepté de faire partie du comité de parrainage. Merci pour ton écoute, ta disponibilité et tes conseils.

En plus des personnes citées plus haut, j'exprime aussi mes remerciements envers celles qui ont rendu mon séjour à l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail très agréable. La liste est longue, mais j'ai quelques noms : Nicole Brassard, Claude Létourneau, Émilie Lauzon, Sylvie Demers, Daniel Plamondon et Michel Dupuis. Rafael, Néjib, Clothilde et Michaela, merci pour les bonnes conversations.

Je ne vais pas oublier de remercier le Département de santé environnementale et santé au travail et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal pour m'avoir octroyé une bourse.

Je ne terminerai pas sans avoir formulé mes remerciements à mon conjoint Abraham Hervé Midéton. Merci pour ton soutien psychologique et tes encouragements.

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les citoyens passent plus de 80% de leur temps à l'intérieur des édifices (habitations, bureaux, écoles, hôpitaux), pour les Canadiens, c'est 90% de leur temps. La qualité de l'air intérieur (QAI) est donc un paramètre de grande importance. La QAI peut être affectée par une multitude de polluants (1). Ils sont surtout d'origine chimique et biologique. Les polluants chimiques proviennent des appareils de combustion, de la fumée de tabac, des produits domestiques et de soins personnels et de divers matériaux de construction. Les polluants biologiques contribuent entre 5 et 34% de la pollution de l'air intérieur (2). Les bioaérosols rencontrés dans l'air intérieur sont des bactéries, des moisissures et des virus ou leurs composantes comme les glucanes, les endotoxines et les ergostérols, ou encore, des produits microbiens comme les mycotoxines et les composés organiques volatils (COV).

La contamination des moisissures en milieu intérieur n'est pas un phénomène nouveau. Elle a déjà été mentionnée dans l'Ancien Testament comme « lèpre des maisons » :

« L'Éternel dit à Moïse et à Aaron : ... si je mets une plaie de lèpre sur une maison... Le prêtre examinera la plaie, s'il voit qu'elle se présente sur les murs de la maison sous forme de cavités verdâtres ou rougeâtres qui font un creux dans le mur... s'il voit que la plaie s'est étendue sur les murs de la maison, il ordonnera qu'on enlève les pierres attaquées... On prendra d'autres pierres que l'on mettra à la place des premières... » (Lévitique 14 : 33-57).

1.1. Les moisissures

1.1.1. Généralités sur les moisissures

Le mot moisissure est un terme générique définissant les champignons microscopiques. Les moisissures sont des organismes vivants constitués de filaments et de cellules spécialisées productrices de spores. Le terme «moisissure» fait référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse. Tout comme les animaux et les plantes, les moisissures sont des eucaryotes, leur matériel génétique est confiné à l'intérieur d'un noyau. Elles diffèrent des autres eucaryotes de par la présence de cellulose et de chitine dans leur paroi. Les moisissures, contrairement aux plantes, sont dépourvues de chlorophylle. Elles sont généralement non mobiles. Les champignons constituent le 5^e groupe du règne des vivants, celui des mycètes.

Tout comme les autres règnes du monde vivant, les champignons sont repartis en classes, ordres, familles, genres et espèces. Les moisissures sont classées en quatre groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes, les ascomycètes (3).

Un champignon est formé d'un thalle constitué de structures filamenteuses appelées hyphes qui lorsqu'elles se regroupent forment le mycélium. Lorsque les moisissures arrivent à maturité, elles génèrent des spores qui sont la structure de dissémination. Les spores peuvent résister à des conditions environnementales extrêmes (4).

1.1.2. Écologie des moisissures

Les champignons sont majoritairement saprophytes. Pour leur croissance, ils ont besoin principalement de trois éléments : un substrat, de l'eau et une température appropriée. Ils ont également besoin pour leur croissance d'un pH adéquat et d'oxygène.

a) Éléments nutritifs

Les moisissures ont besoin de la matière organique pour leur croissance. Les produits cellulosiques comme les matériaux de construction, les cartons, le papier, le placoplâtre, les fibres naturelles et synthétiques, les tapis, les tissus, les plantes empotées, les aliments stockés, les amas de matières végétales ou les poussières organiques sont de bons substrats supportant la croissance fongique (5-9).

b) Disponibilité en eau

Deux paramètres liés à l'eau sont importants pour la croissance des moisissures : l'humidité relative de l'air et l'activité en eau du substrat.

L'humidité relative de l'air correspond à la quantité de vapeur d'eau nécessaire pour saturer un volume d'air à une température et pression donnée. La croissance fongique est favorable à partir d'une humidité relative égale ou supérieure à 65% (4). Les moisissures hygrophiles ont besoin d'un taux d'humidité relative supérieur à 90%, tandis que les moisissures xérophiles croissent à une humidité relative inférieure à 80%.

L'activité en eau (A_w), comprise entre 0 et 1, correspond à la disponibilité en eau du substrat. La majorité des moisissures croit à une A_w comprise entre 0.85 et 0.99. Une A_w inférieure à 0.65 ne favorise pas la croissance microbienne, bien que les spores de moisissures peuvent rester viables pendant un certain temps (10, 11).

c) Température

Les champignons sont capables de se multiplier sous une gamme de température allant de 4 à 60°C (4, 12). Toutefois, la température optimale de croissance de la majorité se situe entre 20 et 25°C.

1.1.3. Les moisissures dans les environnements intérieurs

Les moisissures sont omniprésentes dans l'air extérieur et sont trouvées pratiquement dans tous les habitats. Les niveaux extérieurs varient selon les régions et les saisons (13). Ils sont plus élevés dans les régions chaudes, en été et en automne dans les régions tempérées. Dans les régions subarctiques, les niveaux de spores sont plus faibles en hiver. Les spores fongiques de l'air extérieur sont transportées à l'intérieur des bâtiments par les courants d'air générés par la ventilation naturelle et mécanique, les humains, les animaux domestiques et les plantes. Elles peuvent également être transportées lorsqu'elles sont déposées sur des surfaces comme le linge des occupants.

Les niveaux intérieurs de spores, dans les environnements communs ventilés de façon mécanique sans problèmes de moisissures, sont habituellement beaucoup plus faibles que les niveaux extérieurs. En effet, l'air est filtré avant d'être desservi dans les zones appropriées, ce qui réduit la charge mycologique de l'air. De plus, les vitesses de l'air à l'intérieur des édifices étant faibles, elles favorisent le dépôt des spores. Les niveaux de spores de moisissures typiquement trouvés dans l'air ambiant des édifices à bureaux se situent en dessous de 10^3 unités formant une colonie (UFC)/m³ d'air. Même si la présence des moisissures est souvent démontrée dans les bâtiments ayant des niveaux élevés d'humidité, les niveaux fongiques dans l'air intérieur de ces bâtiments sont généralement similaires ou

modérément plus élevés par rapport à l'air extérieur et excèdent rarement 10^4 UFC/m³ d'air (14). Des travaux de décontamination des matériaux dans des édifices endommagés par l'eau peuvent toutefois contaminer des environnements intérieurs et les niveaux fongiques dans l'air peuvent alors excéder 10^5 UFC/m³ (14). L'agriculture, l'industrie de bois, l'industrie alimentaire et le traitement des déchets sont des environnements professionnels où les niveaux d'exposition aux moisissures sont beaucoup plus élevés. Dans certains milieux de travail comme l'industrie alimentaire (produits laitiers, boissons alcoolisées, pain) où l'activité est reliée à la manipulation des moisissures, ou dans l'industrie de traitement des déchets (compostage, tri) où les conditions sont favorables à leur croissance, la contribution des spores fongiques extérieures est négligeable par rapport aux émissions intérieures (14).

Les moisissures couramment rencontrées dans les environnements intérieurs appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Alternaria*. Dans les édifices avec des problèmes de moisissures, les niveaux de *Penicillium* et d'*Aspergillus* sont souvent beaucoup plus élevés comparativement à l'air extérieur. Les conditions d'humidité excessive favorisent par exemple la croissance de *Stachybotrys chartarum* (14).

1.1.4. Effets des moisissures sur la santé

a) Toxicocinétique des moisissures

L'exposition des humains aux moisissures (spores et hyphes) ou à leurs produits se fait principalement par voie respiratoire, et dans une moindre mesure par contact cutané ou ingestion (14, 15). La taille, la forme ainsi que la structure de la surface des éléments fongiques jouent un rôle important dans leur comportement aérodynamique, et donc sur la région où ils vont se déposer dans les voies respiratoires. Le diamètre des spores varie entre 2 et 200 μm , bien que la majorité se situe entre 2 et 20 μm (4). En raison de leur taille variable, les spores fongiques peuvent se déposer dans l'ensemble du système respiratoire. Les éléments fongiques dont la taille est supérieure à 10 μm se déposent dans les voies respiratoires supérieures, alors que les structures dont la taille est comprise entre 2 et 4 μm peuvent se retrouver dans le poumon profond (14).

Des études in vivo chez des animaux montrent que certaines spores fongiques provenant des voies respiratoires peuvent se propager jusqu'à d'autres organes, particulièrement le foie, la rate et les reins (16, 17). L'exposition gastro-intestinale peut se produire via la clairance muco-ciliaire des spores qui ont été déposées dans les voies respiratoires et qui sont avalées lorsque le mucus atteint la gorge (14).

L'élimination de spores montre que les macrophages alvéolaires sont la ligne de défense principale contre les spores fongiques (14). La majorité des spores fongiques est éliminée du poumon sur une période de temps variant de quelques heures à quelques jours selon les doses administrées (14, 16-18).

b) Structures fongiques capables de provoquer des effets

Les composants fongiques, viables ou non viables, susceptibles d'entraîner des effets néfastes sur la santé humaine peuvent être des structures fongiques dans leur intégralité comme les spores, des substances élaborées par les moisissures ou des éléments provenant de la paroi cellulaire fongique entre autre (19-21).

i) Mycotoxines

Ce sont des substances toxiques de faible poids moléculaire élaborées par des moisissures dans certaines conditions environnementales (lumière, température, dioxyde de carbone dans l'air, éléments nutritifs, présence d'autres espèces). Elles se retrouvent aussi bien sur le mycélium que dans la spore. Difficilement dégradables, les mycotoxines peuvent persister longtemps dans l'environnement, même lorsque les structures fongiques ne sont plus viables. Il existe de nombreuses mycotoxines, environ quatre cents seraient actuellement répertoriées. Chaque mycotoxine n'est pas spécifique à une moisissure, tout comme une moisissure ne produit pas qu'une seule mycotoxine. Les mycotoxines comme l'aflatoxine B1 et B2 et la citrine peuvent être élaborées par *Aspergillus flavus*. Les trichotécènes peuvent à la fois être produits par *Stachybotrys chartarum* et plusieurs espèces de *Fusarium* (22).

ii) Composés organiques volatils

Ils sont issus du métabolisme des moisissures. Plusieurs composés ont été identifiés et appartiennent aux groupes des alcools, aldéhydes et cétones (6). Les COV sont responsables de l'odeur caractéristique de moisis. Leur seuil de détection est très faible, et peut permettre de détecter une problématique bien avant l'apparition des signes visibles de croissance fongique (23).

iii) (1,3) - β -D-glucanes

Ce sont des sucres complexes constituants de la membrane cellulaire de la plupart de moisissures. On peut également les retrouver chez certaines plantes et bactéries.

iv) Allergènes

De poids moléculaire élevé, les allergènes sont principalement des protéines, des polysaccharides et des lipopolysaccharides (24). Constituants de la paroi et du cytoplasme des cellules fongiques, les allergènes sont rencontrés au niveau des spores et des fragments fongiques. Théoriquement, toute moisissure peut contenir des substances allergènes. Cependant, les genres *Aspergillus*, *Alternaria*, *Caldosporium* et *Penicillium* sont les plus fréquemment impliqués dans les réactions allergiques (4).

c) Symptômes et effets des moisissures et de leurs composants

L'exposition des humains aux moisissures ne s'accompagne pas nécessairement de symptômes. Cependant, l'inhalation des particules fongiques peut aggraver, voire engendrer une maladie. Des expositions répétées augmentent les risques pour la santé (4). Les effets des moisissures sur la santé humaine dépendent de plusieurs facteurs :

- **l'agent mis en cause** : certaines espèces comme *Aspergillus fumigatus* ou *Alternaria* sont souvent impliquées dans des allergies causées par les moisissures,
- **la voie d'exposition** : l'inhalation est la principale voie, plus rarement elle peut se faire par contact cutané ou par ingestion,

- **la dose d'exposition** : les expositions répétées ou de fortes concentrations sont plus susceptibles de provoquer une réaction,
- **la susceptibilité individuelle** : les personnes âgées, les nourrissons et les jeunes enfants, les personnes atopiques souffrant de certaines affections telles que la mucoviscidose, des problèmes respiratoires (asthme, maladies pulmonaires obstructives) et des personnes immunodéprimées sont plus susceptibles de développer des problèmes de santé lorsqu'elles sont exposées à des composants fongiques (4).

La principale exposition des humains aux moisissures étant la voie respiratoire, leurs effets se manifestent plus particulièrement sur le système respiratoire. Les effets des moisissures sur la santé humaine peuvent être classés en 4 catégories : irritatifs, immunologiques, infectieux et toxiques (4, 6, 25).

i) Effets irritatifs

La présence des moisissures est souvent associée à l'irritation des yeux, du nez, de la gorge et de la peau et à des symptômes s'apparentant à la grippe ou au rhume. Il s'agirait d'une irritation mécanique des structures fongiques (spores et fragments) ou de leurs produits (COV, glucanes, mycotoxines), lesquels entreraient en contact avec les muqueuses (4).

ii) Effets immunologiques

Ces effets peuvent être classés en deux catégories : les effets allergiques et les effets d'hypersensibilité. La réponse immunitaire due aux allergènes se traduit par la production d'immunoglobuline E (IgE). Les maladies provoquées suite à une exposition aux allergènes fongiques incluent la rhinite allergique, la conjonctivite, la dermatite, l'asthme allergique, l'aspergillose broncho-pulmonaire, la sinusite allergique, la dermatite (4, 6). La gravité des effets est variable d'un individu à l'autre et selon le type de moisissure pour un même individu (10). Les effets d'hypersensibilité sont surtout observés suite aux expositions chroniques et à de fortes concentrations, particulièrement en milieu de travail agricole ou industriel. Les effets se traduisent alors par la production d'anticorps spécifiques immunoglobulines G (IgG), causant ainsi un syndrome appelé la pneumonite

d'hypersensibilité (alvéolite allergique extrinsèque). Le poumon du fermier, dont un des agents causals est *Aspergillus fumigatus*, constitue un exemple (4).

iii) Effets infectieux

Peu de moisissures retrouvées en milieu intérieur (matériaux de construction ou systèmes de ventilation) peuvent provoquer des infections. L'aspergillose est la forme d'infection la plus connue. On distingue deux formes d'aspergillose : l'aspergillose invasive et l'aspergillose non invasive. L'aspergillose non invasive n'est pas réellement une infection, puisqu'il s'agit de la colonisation locale du poumon par un amas de mycélium (mycétome) sans franchir l'épithélium pulmonaire (26). Le plus connu des mycétomes est l'aspergillose caractérisée par une obstruction pulmonaire. L'aspergillose invasive est une infection bien connue en milieu hospitalier et représente la forme la plus sévère engageant le pronostic vital (27). Cependant, elle frappe le plus souvent les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Contrairement à l'aspergillose non invasive, la forme invasive peut envahir tout le poumon et se propager à d'autres organes.

iv) Effets toxiques

Des effets immédiats peuvent survenir suite à une exposition aiguë à de fortes doses de moisissures. Une exposition importante aux poussières organiques contaminées par des moisissures peut provoquer le syndrome toxique des poussières organiques (Organic Dust Toxic Syndrome-ODTS) (28). D'autres affections, telles que les mycotoxicoses, peuvent apparaître à moyen ou à long terme suite à des expositions chroniques répétées aux mycotoxines. Les mycotoxicoses peuvent conduire à des effets tels que la fatigue générale, des maux de tête, des effets systémiques (neurocomportementaux, cognitifs, douleurs articulaires ou des symptômes gastro-intestinaux (29-36).

Peu de données existent sur des maladies chroniques causées par l'exposition aux moisissures ou à leurs composants. Cependant, l'aflatoxine est maintenant reconnue comme un cancérigène (groupe 1 par le Centre international de recherche sur le cancer-CIRC) pour le foie suite à une ingestion d'aliments fortement contaminés ou à l'inhalation de fortes doses, principalement dans les milieux agricoles (14).

1.1.5. Recommandations sur les expositions des moisissures

Il n'y a aucun accord général sur la façon dont l'exposition fongique devrait être évaluée dans l'air. La démonstration des particules autres que les spores fongiques comme les hyphes, les différences entre les méthodes de prélèvement, les fluctuations dans les niveaux de base, les difficultés de réaliser des études épidémiologiques rigoureuses, les relations dose-réponse insuffisamment documentées, le manque de données sur des effets synergiques d'une exposition multiple ou d'une dose cumulative compliquent l'analyse de l'exposition (4, 10).

Cependant, plusieurs organisations gouvernementales et des associations professionnelles ont proposé des lignes directrices. Elles peuvent être catégorisées de différentes façons. Selon les principales méthodes utilisées aujourd'hui pour quantifier les niveaux fongiques dans l'air, les limites d'expositions acceptables (équivalentes aux valeurs limites d'exposition-VLE) peuvent être classées en deux catégories : les recommandations d'exposition pour les moisissures cultivables en UFC/m³ d'air et celles exprimées en spores totales/m³ d'air.

En 2009, Eduard a proposé une dose minimale entraînant un effet nocif observable (DMENO, Lowest Observed Effect Levels-LOEL) de 10⁵ spores/m³ d'air. Cette concentration limite est relativement constante pour diverses espèces fongiques dans les populations non sensibilisées (14).

Très peu de données sur les limites des moisissures dans les poussières de surface existent. Selon l'organisme Américain National Air Duct Cleaners Association (NADCA), les moisissures totales cultivables dans les poussières de surface doivent être inférieures à 15 000 UFC/g de poussières. Le Ministère de la Défense en Angleterre en 2004 a proposé également des spécifications pour le nettoyage des conduits dans les bases militaires. Pour des échantillons de surface, le compte doit être inférieur à 200 UFC/100 cm².

1.2. Les systèmes de chauffage, ventilation et conditionnement de l'air (CVCA)

1.2.1. Composants des systèmes CVCA

Un système de ventilation peut desservir un immeuble tout entier, l'étage ou une zone donnée d'un immeuble. Quel que soit le type de CVCA, il comprend une partie ou la totalité des éléments suivants (37, 38) :

- **la prise d'air extérieur** (alimentation) peut être située sur le mur ou sur le toit. Elle permet de faire entrer l'air frais, et doit être située à l'écart d'une source de contaminants,
- **le plénum de mélange** est un caisson à l'intérieur duquel est mélangé l'air neuf nouvellement admis et l'air re-circulé,
- **les filtres** permettent de débarrasser l'air des particules telles que les poussières, les insectes et les microorganismes,
- **les serpentins** sont des échangeurs thermiques qui servent à réchauffer ou à refroidir l'air qui circule dans les conduits,
- **l'humidificateur** a pour fonction de traiter l'air diffusé en injectant des volumes d'eau pour assurer un niveau d'humidité convenable,
- **les ventilateurs** servent à forcer la circulation de l'air du plénum de mélange jusqu'aux diffuseurs et à évacuer l'air vicié vers l'extérieur. Il existe donc un ventilateur d'alimentation, un ventilateur de retour et un ventilateur d'évacuation,
- **le silencieux** permet de réduire le bruit généré par les équipements de ventilation,
- **le réseau de distribution d'air** correspond à tous les conduits par lesquels l'air passe pour être acheminé ou évacué d'une zone. Il existe donc des conduits d'alimentation, de retour et d'évacuation,
- **les boîtes de fin de course** sont des modulateurs de température ou de débit d'air qui pénètre dans une zone. Il y a des boîtes de fin de course à réchauffage et des boîtes de fin de course à volume variable,
- **les diffuseurs d'air** assurent la distribution et la reprise de l'air dans une pièce.
- **la sortie d'air** est l'endroit où l'air vicié est refoulé à l'extérieur du bâtiment.

1.2.2. Types de CVCA

Les CVCA peuvent être catégorisés de différentes façons. Selon le type de traitement de l'air, du transfert d'énergie et de la régulation, les CVCA sont regroupés en quatre types principaux : les installations de climatisation à air, des installations de chauffage et de climatisation à l'eau, des installations de climatisation mixtes (eau et air) et des unités autonomes.

1.2.3. Traitements de l'air

Pour maintenir une bonne QAI, l'air doit être traité avant d'être distribué. Différents procédés existent pour fournir une bonne qualité d'air, notamment le contrôle de la température et de l'humidité, le contrôle de la pression, la filtration, la dilution, l'évacuation et l'irradiation ultraviolette germicide (37).

a) Contrôle de la température

Il se fait par chauffage ou par refroidissement de l'air. Le chauffage permet d'augmenter la température de l'air froid en le faisant passer à travers un serpentin dans lequel circule l'eau ou la vapeur chaude. Le refroidissement de l'air s'effectue par injection de l'air chaud à travers un serpentin dans lequel circule de l'eau froide ou un liquide frigorigène (37).

b) Contrôle de l'humidité

Pour être confortable, l'air doit être maintenu à un taux d'humidité compris entre 30 et 60% selon les saisons. Le contrôle de l'humidité se fait par humidification ou déshumidification de l'air. La déshumidification consiste à passer de l'air humide à travers un serpentin de refroidissement ou un déshumidificateur à dessiccation. L'eau contenue dans l'air va alors se condenser, réduisant ainsi son taux d'humidité. L'humidification peut s'effectuer de deux façons, soit par atomisation d'eau liquide dans un flux d'air ou par injection de vapeur saturée dans le système de ventilation (37).

c) Contrôle des mouvements d'air

L'écoulement de l'air est effectué des zones les plus propres vers les moins propres. Certaines salles sont maintenues en pression positive pour éviter que les contaminants des pièces

adjacentes n'y pénètrent. D'autres pièces sont en pression négative pour empêcher les contaminants de migrer vers les pièces adjacentes (37).

d) Filtration

Son rôle est de débarrasser l'air des particules aéroportées telles que les poussières, les insectes et les microorganismes. Pour cela, l'air passe à travers le filtre, et une partie des contaminants est alors retenue. L'air qui en ressort est plus propre. Une filtration additionnelle peut être nécessaire pour satisfaire certaines exigences (37).

e) Dilution

Elle consiste à réduire la concentration de contaminants dans l'air en rejetant une partie de l'air intérieur et en la remplaçant avec de l'air neuf propre. Un grand nombre de systèmes CVCA assure la dilution (37).

f) Évacuation

Elle consiste à rejeter une partie ou la totalité de l'air intérieur vicié à l'extérieur. L'évacuation est généralement réalisée par l'unité de ventilation principale (37).

g) Irradiation ultraviolette germicide

Comme une mesure additionnelle à la filtration, l'irradiation consiste à détruire les microorganismes présents dans l'air avec les ultraviolets (UV) de longueurs d'ondes comprises entre 200 et 207 nm. L'irradiation peut être effectuée de trois façons en fonction de l'endroit où est situé le dispositif d'irradiation. La source d'UV peut directement être placée dans la centrale d'air, à l'intérieur des conduits ou dans une pièce spécifique lorsqu'on veut désinfecter un composant du système de ventilation (37).

1.2.4. Nettoyage des CVCA

Il n'y a pas de règle universelle pour la fréquence d'entretien des CVCA. Le Règlement canadien sur la santé et la sécurité au travail dans la partie I section III, mentionne que :

« L'inspection et le nettoyage des systèmes de ventilation doivent être effectués par le personnel qualifié selon une fréquence minimale d'une fois tous les cinq ans s'il est requis ».

Le guide de qualité de l'air intérieur dans les établissements du réseau de la santé et des services sociaux du Québec suggère que chaque organisme doit se donner ses propres fréquences selon ses spécificités. Ces fréquences de nettoyage doivent alors varier selon le type de CVCA, les activités qui se déroulent dans les locaux à ventiler et la localisation des bâtiments (37). Au niveau du Québec, l'article 104 du règlement sur la santé et la sécurité au travail (c.S-2.1, r.19.01) stipule que :

«Tout système de ventilation mécanique doit être inspecté et réglé au moins une fois par année, et les filtres entretenus ou remplacés au besoin ».

Cette inspection définit les actions à entreprendre selon le niveau d'encrassement. Le niveau de saleté peut être évalué de deux façons :

- **au moyen d'une caméra vidéo** : la propreté est ainsi estimée selon trois niveaux. Le niveau 1, qualifié de niveau normal de propreté, correspond à un conduit propre ou ayant une mince couche uniforme de poussières. Le niveau 2, au-dessus de la normalité, est une couche uniforme et d'accumulations localisées de poussières. Enfin, le troisième niveau, qualifié de grave, correspond à une accumulation importante de poussières.
- **au moyen des tests d'empoussièrement** : ce sont des prélèvements surfaciques des poussières. Plusieurs organismes, notamment la NADCA, l'Association française pour la prévention et l'étude de la contamination (ASPEC) et l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) proposent des critères de déclenchement de nettoyage des systèmes CVCA (tableau I).

La NADCA considère qu'une surface est propre lorsqu'aucune substance ou débris n'est visible à l'intérieur du conduit. La valeur limite post-nettoyage proposée est de 0.75 mg de poussières/100 cm² de surface, mais aucune limite de déclenchement n'est proposée par cet organisme. L'ASPEC suggère le nettoyage des systèmes CVCA lorsque la quantité de poussières déposées dans les conduits est supérieure à 4 mg/100 cm². Il considère un niveau inférieur à 1 mg/100 cm² comme représentatif d'un système propre. L'IRSST estime que le nettoyage doit être effectué à partir de 6 mg/100 cm² et ne propose aucune valeur post-nettoyage. Les méthodes NADCA et ASPEC utilisent une cassette 37 mm munie d'une

membrane en fibres d'ester de cellulose mélangées (MFECM) de 0.8 μm de porosité afin de prélever les poussières déposées sur une surface de 100 cm^2 . La méthode IRSST utilise une cassette 25 mm munie d'un filtre en chlorure de polyvinyle (CPV) de 0.8 μm de porosité et la surface à prélever est de 62 cm^2 .

Tableau I. Critères de déclenchement de nettoyage des systèmes de ventilation

	Pré-nettoyage (mg/100 cm^2)	Post-nettoyage (mg/100 cm^2)	Matériel d'échantillonnage	Surface (cm^2)
NADCA	-	0.75	Cassette 37 mm MFECM (0.8 μm)	100
ASPEC	> 4	<1	Cassette 37 mm MFECM (0.8) μm	100
IRSST	6	-	Cassette 25 mm CPV (0.8 μm)	62

À la suite des investigations des systèmes CVCA, dans le cas où leur nettoyage est requis, deux types de nettoyage peuvent être effectués : le dépoussiérage et la désinfection. Le dépoussiérage peut se faire au moyen d'une aspiration par contact, avec de l'air comprimé, par brosse mécanique couplé à une aspiration ou par pulvérisation d'eau. La désinfection qui vise à extraire des contaminants biologiques du système de ventilation peut être effectuée en utilisant les biocides ou l'ozone.

1.3. Problématique et objectifs du projet

La fonction première des systèmes CVCA est de distribuer l'air dans les bâtiments. En revanche, lorsque ces systèmes ne sont pas bien entretenus et maintenus propres, les poussières déposées constituent des substrats qui permettent de supporter la croissance fongique (39-42). Les spores de moisissures présentes dans les systèmes peuvent être entraînées dans l'air ambiant des bâtiments par le CVCA et ainsi produire une mauvaise qualité de l'air intérieur. Les occupants sont alors exposés aux moisissures, à leurs particules ou à leurs composés. Or de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre les moisissures ou leurs composants et des effets sur la santé (29-36).

En Amérique du Nord, le déclenchement du nettoyage des systèmes de ventilation est basé sur une inspection visuelle de la quantité de poussières déposées dans le conduit. Il ne tient pas compte du fait que des surfaces empoussiérées peuvent contenir des microbes, particulièrement les moisissures. Une évaluation gravimétrique, sans tenir compte de la charge mycologique, ne peut pas être le seul facteur de déclenchement de nettoyage tel qu'il est actuellement proposé. L'évaluation de la biomasse mycologique doit être considérée. Toutefois, cela nécessite préalablement des méthodes fiables de prélèvement de poussières et d'analyse du contenu en moisissures de ces poussières. C'est pour combler cette lacune importante que ce projet a vu le jour.

Afin d'aider les gestionnaires des édifices publics, industriels et des tours à bureaux au jugement de l'état de salubrité des systèmes CVCA et par conséquent de prévenir les occupants de ces édifices de l'exposition aux moisissures, ce projet a pour objectifs :

- de proposer une méthode de prélèvement des poussières déposées sur les conduits des systèmes CVCA en évaluant les performances et les limitations de deux systèmes d'échantillonnage des poussières,
- de suggérer une méthode d'évaluation de la biomasse mycologique dans ces poussières en comparant quatre méthodes d'analyse de moisissures.

II. MÉTHODOLOGIE

Dans un premier temps, deux méthodes de prélèvement des poussières ont été comparées (article 1). Pour ce faire, des poussières ont été générées dans un conduit miniaturisé au laboratoire. L'utilisation du conduit pour l'évaluation des méthodes permet de simuler les niveaux de poussières retrouvées dans divers systèmes CVCA en conditions contrôlées. Les poussières déposées sur le radier du conduit miniaturisé ont été prélevées par chacune des méthodes. La méthode ayant fourni les prélèvements quantitatifs, les plus reproductibles et les échantillons les plus simples à traiter en laboratoire a servi pour la deuxième étape du projet. En second lieu, quatre méthodes d'analyse de la biomasse fongique ont été validées, puis comparées entre elles (article 2). Pour y parvenir, des poussières ont été générées dans l'enceinte simultanément avec des spores de moisissures, puis analysées par chacune des quatre méthodes. Les méthodes ont été comparées selon différents critères afin de choisir celle qui est la mieux adaptée aux besoins de l'évaluation de la biomasse mycologique. Tout d'abord, les critères analytiques et la comparaison des résultats obtenus par chacune des méthodes par rapport à la méthode de référence ont permis de faire une première sélection. Par la suite, un examen des coûts d'analyse en fonction des bénéfices de chaque méthode a été réalisé.

Le projet se scinde en deux étapes principales : la validation d'une méthode de prélèvement des poussières (article 1) et la mise au point et la comparaison de quatre méthodes analytiques des moisissures (article 2).

2.1. Poussières

Les poussières utilisées pour réaliser la génération, aussi bien pour la validation d'une méthode de prélèvement des poussières que pour la comparaison des méthodes analytiques, ont été obtenues telles que décrites dans l'article 1.

2.2. Chambre de génération

La génération de dépôts de poussières dans un conduit en condition de laboratoire avait déjà été réalisée dans le cadre du projet 099-641 à l'IRSST. Cette même technique a été utilisée dans nos

générations. Cependant, la technique a été modifiée puisque l'intérieur du conduit miniaturisé a été doté de 12 plaques de cuivre amovibles et lisses. Chaque plaque avait une dimension de 10 cm x 10cm. Sur ces plaques, soit les poussières seules ou en concomitance avec les spores de moisissures ont été déposées par aérosolisation des particules. La chambre de génération est décrite dans l'article 1.

2.3. Validation de la méthode de prélèvement des poussières

La première étape a consisté à valider une méthode de prélèvement des poussières, soit une méthode par essuyage (frottis), soit une méthode par aspiration en générant uniquement les poussières. Afin de mimer les niveaux de poussières qu'on peut rencontrer dans divers systèmes de ventilation, les générations ont été réalisées avec des durées d'empoussièrement différentes. Puis elles ont été prélevées par chacune des deux méthodes. Au préalable, les plaques étaient pré-pesées avant la génération des poussières, puis post-pesées suite à la génération. Le but était de connaître les masses réelles de poussières déposées sur les plaques et qui devaient être récupérées par les méthodes de prélèvement testées.

2.3.1. Méthode de prélèvement par aspiration

La méthode de prélèvement par aspiration évaluée dans ce projet est une adaptation de la méthode ASPEC décrite par Lavoie et *al.* (43, 44). Elle est décrite en détails dans l'article 1. La figure 1 montre la cassette d'aspiration.



Figure 1. Photographie de la cassette de prélèvement

2.3.2. Méthode de prélèvement par essuyage (frottis)

Le système de prélèvement par frottis était constitué d'une manchette de plastique SHW1340 Hand Wand (DSA Detection®, North Andover, MA, USA) à l'intérieur de laquelle était introduite une lingette sèche en polyester tricoté Anticon 100 ® stérile 100™ (Contec Inc., Spartanburg, SC, USA566). Seule la lingette était pré-pesée, puis post-pesée pour connaître la quantité de poussières prélevées. Pour chacune des plaques, le prélèvement s'effectuait par passage du tissu en faisant des lignes parallèles, puis perpendiculaires, et ce sur toute la surface de 10 cm x 10 cm. L'essuyage était maintenu tant que les poussières étaient visibles sur la plaque et que la lingette n'était pas saturée en poussières. La figure 2 montre l'échantillonnage de poussières sur la plaque de cuivre par frottis.

2.4. Validation et comparaison des méthodes analytiques des moisissures

La deuxième étape a été subdivisée en deux parties : la validation des méthodes d'analyse de la biomasse fongique pour les adapter à cette problématique spécifique et la comparaison de ces méthodes à partir d'échantillons générés au laboratoire.

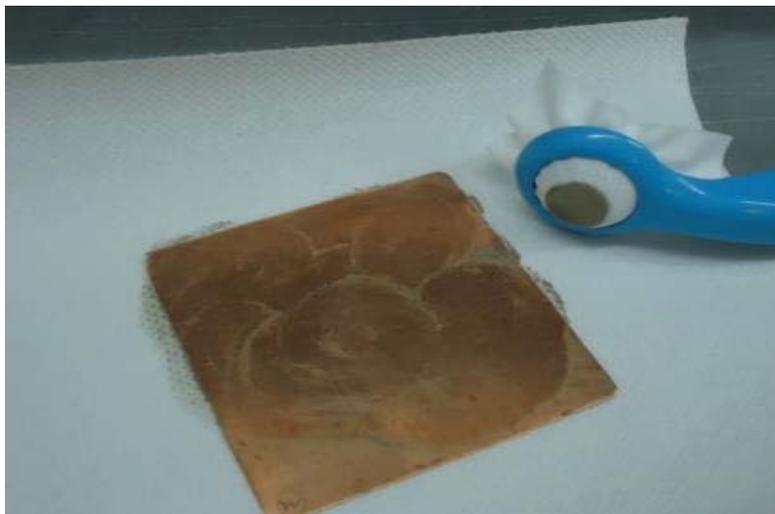


Figure 2. Photographie du frottis

2.4.1. Souches fongiques

Pour ce projet, six souches de moisissures ont été utilisées : *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium digitatum*, *Ulocladium chartarum*, *Acremonium recifei*, *Syncephalastrum racemosum* et *Absidia corymbifera*. Elles ont été choisies en fonction de 3 critères. La taille de la colonie devait être convenable sur la gélose et les spores facilement différenciables au microscope. Les souches devaient avoir une forte sporulation afin de récupérer facilement les spores, une étape essentielle pour la génération. Enfin, elles ne devaient pas produire de mycotoxines pour des raisons de sécurité des manipulateurs. Toutes ces souches provenaient de la banque de l'IRSST. Le premier repiquage a été effectué à partir des souches congelées à -80°C par dépôt de billes sur la gélose. Tout au long du projet, le milieu de culture pour les moisissures a été la gélose à l'extrait de malt MEA. Les géloses inoculées étaient toujours incubées à 25°C pour une période de 5 à 10 jours afin d'obtenir une croissance suffisante de la moisissure. Chaque suspension de spores a été obtenue tel que décrit dans l'article 2. La figure 3 montre le prélèvement de spores sur la culture à l'aide d'un écouvillon pour produire la suspension de spores utilisée pour la génération.



Figure 3. Photographie du prélèvement de spores à l'aide d'un écouvillon

2.4.2. Validation des méthodes analytiques des moisissures

Quatre méthodes d'analyse de la biomasse mycologique ont été choisies car les indicateurs qu'elles utilisent ont déjà servi pour évaluer la présence de moisissures dans différentes situations. Ces méthodes sont la méthode d'analyse par croissance sur un milieu gélosé (culture), qui est la méthode de référence en microbiologie, le comptage direct des spores par microscopie

(CDSM), le dosage enzymatique de la β -N-acétylhexosaminidase (NAHA) et la méthode de biologie moléculaire Polymerase Chain Reaction (18S-q-PCR).

L'analyse des moisissures par la méthode culture se limite aux structures fongiques cultivables. Chaque unité cellulaire qu'elle soit une cellule, un groupe de cellules ou d'hyphes donnera une seule UFC. Tandis que pour les trois autres méthodes, un compte total des structures fongiques (spores et hyphes) viables ou non viables est obtenu.

La validation de chaque méthode a consisté à déterminer sa limite de détection (LD), sa réplicabilité et sa répétabilité telle que décrit dans l'article 2.

a) Limite de détection

Elle correspond à la plus petite quantité de spores ou d'UFC que la méthode est capable de rapporter au-dessus du bruit de fond.

b) Réplicabilité et répétabilité

La réplicabilité est définie comme étant la fidélité de la méthode sous des conditions où les résultats d'analyses sont obtenus par la même méthode, sur des échantillons identiques, dans le même laboratoire, par la même analyste, utilisant le même équipement, les mêmes lots de consommables et pendant un intervalle de temps court. La répétabilité, quant à elle, est identique à la réplicabilité, mais en faisant varier au moins un des paramètres. Dans notre cas, il s'agissait des analystes.

2.4.3. Comparaison des méthodes analytiques des moisissures

Afin de mimer un échantillon que l'on pourrait retrouver dans des conditions réelles d'un conduit de ventilation contaminé, les poussières ont été générées simultanément avec les spores de moisissures tel que décrit dans l'article 2. Le but était de reproduire toutes les situations possiblement rencontrées dans divers systèmes de ventilation, notamment beaucoup de poussières et de moisissures, peu de poussières et de moisissures, beaucoup de poussières mais peu de moisissures, peu de poussières mais beaucoup de moisissures.

a) Prélèvement des échantillons (échantillonnage)

Les prélèvements des poussières étaient effectués avec la cassette préalablement validée dans ce projet (article 1). Afin de connaître la masse totale de particules prélevées, les cassettes entières ont été pré-pesées puis post-pesées et ce selon les recommandations de la validation présentées à l'article 1.

b) Extraction des échantillons

Tous les échantillons étaient extraits aussitôt après le prélèvement afin de prévenir un développement de la flore mycologique entre le prélèvement et l'analyse. Les échantillons ont été récupérés directement dans la cassette par introduction de 3 mL d'eau stérile PCR pour contrôler la perte de l'échantillon. Pour s'assurer que la variabilité observée provenait uniquement de la méthode d'analyse, une extraction commune de chaque échantillon a été effectuée, puis séparée en quatre pour être analysée par chacune des méthodes analytiques.

c) Protocoles des méthodes analytiques des moisissures

i) Culture

La méthode de croissance utilisée dans ce projet est une adaptation de la méthode IRSST MA-343. Afin de différencier facilement les colonies sur les géloses pour des échantillons ayant un grand nombre de moisissures, chaque échantillon a subi deux dilutions successives au $1/10^e$ en plus de l'échantillon pur (10^0) : 10^{-1} et 10^{-2} . Les colonies étaient préférentiellement comptées sur les géloses de la dilution 10^0 . Dans le cas où le dénombrement était impossible sur cette dilution, le décompte était effectué à 10^{-1} , puis sur la dilution 10^{-2} . Pour chaque échantillon, les trois géloses de la dilution considérée étaient comptées. Une moyenne était effectuée pour rapporter ce nombre en UFC/100 cm². La figure 4 montre un échantillon de culture après 7 jours d'incubation à 25°C.



Figure 4. Photographie d'un échantillon de culture après 7 jours d'incubation à 25°C

ii) Microscopie

Cette méthode, décrite par Adhikari et *al.* (2003) et Reponen et *al.* (2010), a été adaptée à la problématique des moisissures contenues dans les poussières (45, 46). Afin de diminuer l'interférence entre les structures fongiques et les débris de poussière, chaque échantillon a subi une dilution au 1/10^e (10⁻¹) en plus de l'échantillon pur (10⁰). La filtration est décrite en détails dans l'article 2. Après la filtration de chaque dilution, les spores étaient préférentiellement comptées sur la dilution 10⁰, dans le cas échéant sur la dilution 10⁻¹. La figure 5 montre les spores de *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium digitatum* et *Ulocladium chartarum* telles qu'elles sont observées au microscope.

Les spores ont été comptées aléatoirement sur 50 des 1 535 champs disponibles sur la membrane. Ainsi, en utilisant la formule 1, on peut rapporter le nombre de spores par échantillon :

$$V_e \times 1\,535 \times \text{nombre de spores comptées} / (50 \times V_f) \quad (1)$$

avec V_e le volume de l'extrait total de l'échantillon (mL) et V_f le volume filtré (mL)

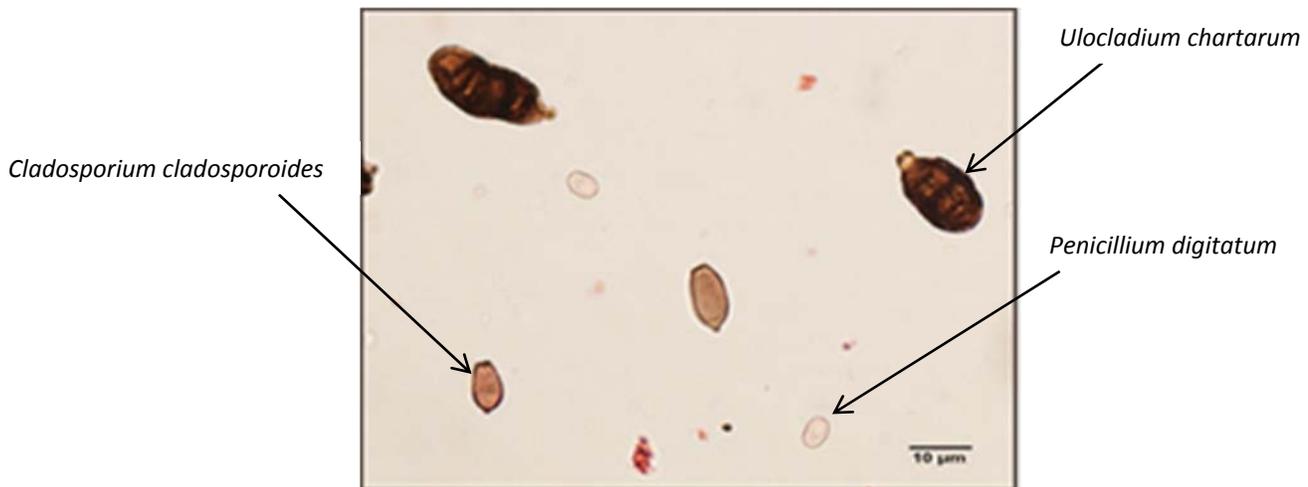


Figure 5. Photographie des spores au microscope (1600X)

iii) Dosage enzymatique de la NAHA

Le dosage de la NAHA a été effectué en modifiant le protocole de dosage fournit avec le Myco-meter® (MycoMeter of handbook, 2011). Le dosage de l'activité de la β -N-Acétylhexosaminidase est basé sur le principe suivant : l'enzyme fongique, en présence du substrat l'hydrolyse. En se clivant, le substrat libère un fluorophore quantifié par fluorescence. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon et donc du nombre de spores (figure 6).

Une courbe standard a été établie à partir de la moyenne de trois séries de dilutions successives d'une suspension de spores de *Penicillium digitatum* de concentration 10^6 spores/mL. L'équation de la droite de régression (équation 2) ainsi obtenue permet de rapporter la fluorescence en nombres de spores :

$$y = 0.0005x - 3.428 \quad (2)$$

avec y la fluorescence (URF) mesurée sur l'échantillon et x le nombre de spores correspondant.

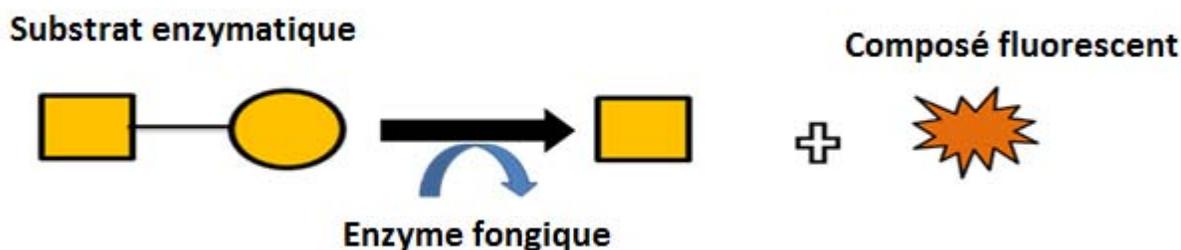


Figure 6. Principe du dosage de la Béta-N-Acétylhexosaminidase

iv) q-PCR

C'est une méthode de biologie moléculaire qui permet de dupliquer une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques (amplicons) et de marqueurs spécifiques (amorces et sonde) (47-53). La fluorescence émise est proportionnelle au nombre de copies polymérisées. Les marqueurs ont été choisis de façon à ce qu'ils détectent l'ensemble des moisissures, particulièrement, les embranchements des Ascomycètes, des Basidiomycètes et des Zygomycètes, susceptibles d'être trouvés dans les systèmes de ventilation. Toutes les amorces testées ont été choisies dans des régions conservatrices, notamment dans les sous-unités ribosomiales de l'acide ribonucléique (ARNr) des régions conservées (5.8S, 18S, 28S) et les régions Internal Transcribed Spacer (ITS) (figure 6). Plusieurs couples d'amorces (ou d'amorces couplées à une sonde) ITS1/ITS2 ; ITS1/ITS4 ; ITS1/ITS4-ITS-probe ; ITS1-F/ITS4-A ; ITS1-F/ITS2 ; ITS3/ITS4 ; ITS3/ITS4-A ; FF390/FR1 ; FungiQuantF/FungiQuantR-FungiQuant-probe, ainsi que le kit Genesig® (Primerdesign Ltd, Southampton, Royaume-Uni) ont été testés (tableau I).

Pour rapporter le nombre d'amplicons générés par la polymérisation de l'ADN en nombre de spores, une courbe standard est intégrée à chaque plaque d'amplification. L'ADN provient d'une suspension de spores de *Penicillium digitatum* de concentration 10^7 spores/mL.

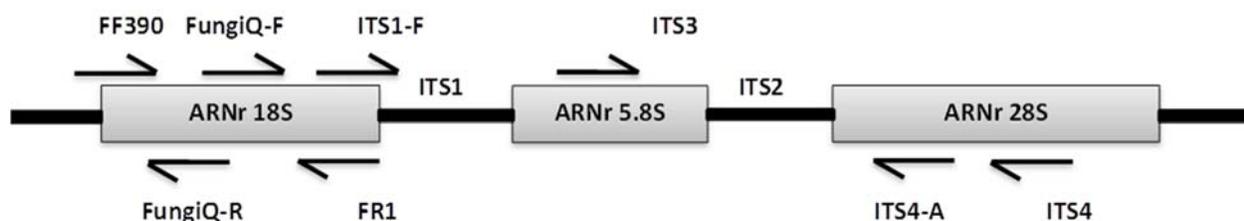


Figure 7. Schéma des sous-unités de l'ARNr des eucaryotes et la position des amorces testées

v) Comparaison des UFC par rapport au nombre de spores

Pour comparer les UFC avec les spores, on a admis qu'une UFC correspond au nombre minimal de structures fongiques que les trois autres méthodes sont capables de rapporter. En principe la méthode par culture donnera toujours des concentrations inférieures (54, 55).

Tableau II. 1. Séquences des amorces et sondes testées

Amorces	Séquences
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS4-A	CGC CGT TAC TGG GGC AAT CCC TG
FF390	CGA TAA CGA ACG AGA CCT
FR1	AIC CAT TCA ATC GGT AIT
FungiQuant-F	GGR AAA CTC ACC AGG TCC AG
FungiQuant-R	GSW CTA TCC CCA KCA CGA
FungiQuant-probe	TGG TGC ATG GCC GTT
ITS-probe	TCT TGG GAT TGG GTT GGG TTA TTT TAA CTC CT

Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, US

2.5. Évaluation de coûts et des bénéfices de chaque méthode

L'analyse des coûts a été faite en calculant les frais en consommables et le temps technique nécessaire. Les bénéfices ont été estimés en évaluant les délais nécessaires entre le prélèvement de l'échantillon et le résultat final de l'analyse.

III. ARTICLE 1 : UNE MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE OPTIMISÉE POUR LA COLLECTE DES DÉPÔTS DE POUSSIÈRES DE SURFACE DANS LES SYSTÈMES DE CHAUFFAGE, VENTILATION ET CONDITIONNEMENT DE L'AIR (CVCA)

3.1. Contribution des auteurs

Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve a participé à la mise au point de la chambre de génération et a effectué des générations de poussières. Elle a ensuite collecté et analysé les échantillons. Puis elle a analysé et interprété les résultats. Elle a également effectué la recherche bibliographique et rédigé l'article.

Yves Cloutier a élaboré la chambre de génération et a participé à sa mise au point. Il a aussi supervisé la génération des poussières et a contribué à l'analyse et à l'interprétation des résultats. Il a également corrigé et révisé l'article.

Maximilien Debia a contribué à développer le devis du projet, a effectué la recherche du financement. Il a également corrigé et révisé l'article.

Geneviève Marchand a développé le devis du projet et a effectué la recherche du financement. Elle a supervisé les simulations et la collecte des échantillons. Elle a participé à l'analyse et à l'interprétation des résultats. Elle a corrigé et révisé l'article.

An Optimized Sampling Method for Collection of Surface Dust Deposits in HVAC system

Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve^{1,2}, Yves Cloutier², Maximilien Debia¹, Geneviève Marchand^{1, 2*}

Authors' affiliation

¹Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal

²Occupational Health and Safety Research Institute

***Corresponding author**

Geneviève Marchand

Article soumis à « *Environmental Monitoring Assessment* »

3.2. Abstract

Decisions to proceed to the cleaning of ventilation systems are based on the amount of dust observed during visual inspections of the ductwork. Given the subjective nature of such inspections, a number of organizations have proposed quantitative evaluation criteria based on vacuum sampling methods. A comparative study of the French organization Association pour la prévention et l'étude de la contamination (ASPEC), The U.S. organization National Air Duct Cleaner Association (NADCA) and the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) methods recommended the ASPEC one, though it has certain limitations. The purpose of this study was to assess the performance and limitations of an improved sampling system for collecting dust deposited on ductwork surfaces. Dust deposits were produced on removable plates located in a miniaturized duct during five laboratory dust-generation sessions. The dust was collected at a flow rate of 15L/min from the removable plate with a modified plastic cassette having an integrated nozzle collector and a polyvinyl chloride filter. For all 54 samples collected, dust loss percentages were calculated for each cassette and each filter. Cassette dust losses ranged from -0.33% to 12.46%, with a median of 1.4%, whereas filter losses ranged from 5.45% to 35%, with a median of 16.30%. Unlike the significantly greater losses at low dust deposit levels with the filters, there was no difference in losses with the cassettes no matter what was the dust level (high, medium or low). Although the dust losses were significant when the filter alone was considered, the collection efficiency of the cassette proved to be close to 99% when the entire cassette was weighed. Use of this cassette to sample dust deposited in ventilation systems is recommended.

Keywords : ventilation systems, dust sampling, vacuum cassette sampler, HVAC.

3.3. Introduction

Ventilation has always been used as a means of controlling contaminants, and it is crucial to maintaining good indoor air quality (IAQ) (1). Natural ventilation was once adequate, but today's large sealed buildings require mechanical ventilation systems to ensure an outdoor air supply sufficient to maintain IAQ. Because they distribute air throughout buildings, heating, ventilation and air conditioning (HVAC) systems also disperse indoor contaminants when dust deposited on HVAC duct surfaces is resuspended (2-7).

Decisions to initiate cleaning of ventilation systems are essentially based on the amount of dust noted in the ductwork during visual inspections. Given the subjective nature of such inspections, a number of organizations have suggested quantitative criteria for assessing HVAC cleanliness (1-3). The problem is the wide variation in sampling methods and in cleaning initiation criteria suggested by the different organizations. In 2011, Lavoie and *al.* conducted a comparative study of three vacuum sampling methods (8). The purpose of the study was to evaluate and compare the performances of the methods suggested by the National Air Duct Cleaners Association (NADCA) and the Association pour la prévention et l'étude de la contamination de France (ASPEC) with an improved method proposed by the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). The NADCA and ASPEC methods use 37-mm cassettes with 0.8- μm mixed cellulose ester (MCE) membranes and a 100 cm² sampling area. The IRSST method uses 25-mm cassettes with 0.8- μm polyvinyl chloride (PVC) filters and a 62-cm² sampling area. The ASPEC method was recommended by authors because of its superior collection performance : three times more dust was collected with the ASPEC method than with the IRSST method and close to 10 times more than with the NADCA method. In addition to its collection performance, this method also demonstrated less variation.

Despite the superior performance of the ASPEC method, the research team mentioned certain limitations. First, the MCE filters are sensitive to moisture, suggesting that other types of filters would be more suitable for gravimetric testing. Second, the beveled collection tube is cut by the user, which means there is variation in the angle of the cut and in the length of the tube. The angle of the cut affects the quality of the adhesion to the surface, which can mean less effective dust collection. In addition, the length of the tube can affect the amount of dust deposited on the inside walls of the collection nozzle. In fact, studies have already demonstrated that anywhere

from 13% to 45% of the dust collected from a surface can accumulate on the inner surface of the suction hose of the sampler (9, 10). Technical improvements are possible to limit dust losses and obtain more reproducible results.

The purpose of this study was to evaluate the performance and limitations of a system for sampling dust deposited on HVAC component surfaces in an experimental model using a laboratory dust-generation chamber.

3.4. Materials and methods

3.4.1. Dust preparation

The dust used in the dust-generation chamber was collected from household and office-building vacuum cleaners. It was milled and screened through a 1000- μm to 38- μm mesh. Only dust particles smaller than 38- μm were used for the dust-generation experiments. The dust was then sterilized in an autoclave and then dried and stored at room temperature until used.

3.4.2. Dust generation system

A model 3400A fluidized bed aerosol generator (TSI Inc., Shoreview, MN, USA) was used to resuspend the dust in a dust-generation chamber that imitated an HVAC duct system (Figure 1). The air in this system is recirculated in a close loop. The pressure inside is maintained to a slight negative pressure compared to the ambient pressure in order to avoid leaks to the outside of the chamber. This pressure is adjusted by a valve connected to a suction system once the generator is in function. The chamber formed by the main section of the system is equipped with a door.

The floor of this chamber is equipped with trays that are fitted to receive 12 removable 10 cm x 10 cm smooth copper plates. A model 8533 DustTrak aerosol dust monitor (TSI Inc., Shoreview, MN, USA), is connected to the centre of the chamber, to follow the dust concentration in the chamber in real time. Air velocity was measured at different location in the chamber using a VelociCalc Plus 8384 thermal anemometer (TSI Inc., Shoreview, MN, USA). A total of five dust-generation experiments were performed at different dust level concentrations. The deposit

level on the plates was adjusted by either letting the system run for longer period of time or by increasing the outlet of the generator or both.

Before each generation, the twelve copper plates were pre-weighed with a model AP250D Analytic Plus electronic balance (OHAUS, Butler, NJ, USA), accurate to 0.01 mg. After generation but before collecting the samples, the plates were weighed again, to determine the amount of dust actually deposited on the surface.

3.4.3. Sampling method

The vacuum sampling method tested in this study is based on the ASPEC method mentioned previously (8, 11) but improved by the use of a 37-mm plastic cassette with a molded bevelled-end orifice produced by EMS to specifications (EMS Inc., Charleston, SC, USA). Because the collection nozzle is now an integral part of the cassette, all the samples were collected with an identical cassette system. This eliminated the bias caused by variation in the length of the Tygon® sampling tube and of its cut angle when it was prepared manually as stated in the original method. A fiberglass support filter (Millipore Ltd, Etobicoke, ON, Canada) and a pre-weighed 5 µm PVC filter (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA) were used with this cassette for each sampling. Once mounted, the whole cassette (cassette, support and filter) was also pre-weighed before being used. The dust deposited on the copper plates were collected by connecting the bevelled edge sampling cassette to a GAST pump (GAST Manufacturing Inc., Benton Harbor, MI, USA). The airflow was calibrated at 15 L/min with a DryCal® Defender 510 flow calibrator (Bios International Corp., Butler, NJ, USA) before each use. Dust samples were always collected in the same manner i.e. by using successive parallel strokes and then perpendicular ones over the entire 10 cm x 10 cm surface of each copper plate. The vacuuming continued until there was no visible dust left on the plates. The cassettes and the filters were each individually weighed after the sampling.

To assess the impact of dust deposit level on sampling method performance, three dust deposit groups were formed : low dust deposit (< 50 mg); medium dust deposit (between 50 mg to 100 mg); high dust deposit (> 100 mg).

3.4.4. Data analysis

The difference between the pre- and post-sampling weights made it possible to determine the amount of dust on the plate, in the cassette and on the filter. The amount of dust on the plates were used as a reference value. Percentage loss between the amount of dust collected by the whole sampling cassette and this reference value allowed establishing the global efficiency of the sampling method with the bevelled edge cassette. Ratio between the amounts of dust collected on the filter and the mass of the assembled sampling cassette allows for the evaluation of the inner wall losses of the sampling cassette. The Lognormality of data was assessed graphically using quantile-quantile (Q-Q) plots. All statistical analyses were performed on log-transformed data. Student's t-test was performed to compare average variations of dust loss between the three substrates. Analysis of variance (ANOVA) made it possible to compare average losses between the plate and the cassette for the three different dust deposit levels, then between the cassette and the filter for these three dust deposit levels. The Tukey's multiple comparison tests was used to identify group means that were significantly different. IBM's SPSS Statistics software for Windows, version 21.0 was used (IMB Corp., Armonk, NY, USA, 2012).

3.5. Results

A total of 54 samples were collected and analyzed following the five dust generation sessions on the system. The dust particles were not uniformly distributed on the floor of the simulation system. Visibly greater quantities of dust, including several aggregates, were noted at the entrance to the chamber, whereas less dust of more uniform size was noted at the chamber exit. Minimum concentration of dust deposited on the chamber floor was 26.4 mg/100 cm² and maximum concentration was 144.5 mg/100 cm².

Figure 2 shows percentages for dust loss between the floor plate and the cassette and between the cassette and the filter. For the cassette, losses ranged from -0.33% to 12.46%, with a median of 1.4%, whereas losses for the filter ranged from 5.45% to 35%, with a median of 16.30%. Student's t-test demonstrated a significantly greater loss between the cassette and the filter ($p < 0.05$) than between the plate and the cassette.

Figure 3 shows percentages for dust loss between the plate and the cassette for the three levels of dustiness : for the low level, losses ranged from -0.33% to 12.46%, with a median of 1.44% ; for the medium level, losses ranged from 0.32% to 4.03%, with a median of 1.07%; and for the high level, losses ranged from 0.66 to 5.33%, with a median of 1.60%. ANOVA showed no significant differences of dust losses across the dust deposit levels ($p>0.05$).

Figure 4 shows percentages for additional dust losses between the cassette and the filter for the same three dust deposit levels: for the low level, loss ranged from 7.11% to 35%, with a median of 17.42%; for the medium level, loss ranged from 9.11% to 24.74%, with a median of 13.26% ; and for the high level, loss ranged from 5.45% to 18.07%, with a median of 13.04%. Tukey's test showed a significantly greater loss only for the low dustiness level compared to the high dustiness level ($p<0.05$).

3.6. Discussion and conclusion

Several dust deposit levels were simulated in the laboratory, with surface concentrations ranging from 26.4 mg/100 cm² to 144.5 mg/100 cm². The dust levels generated are well within the different levels of dust deposit reported in the literature for HVAC systems. In 2013, Boor and *al.* (12) reported that deposits on the surfaces of ventilation ducts can range from 10 mg/100 cm² to 1 000 mg/100 cm². In 2011, Lavoie and *al.* (8) found concentrations ranging from 0.14 mg/100 cm² to 337 mg/100 cm² in samples collected from a variety of HVAC ducts under real conditions. Larger surface deposits could be reached with the system used in this system but would have needed more time.

The vacuum sampling method proved highly effective, with virtually all of the dust on the plate collected with the improved cassette. Median loss between the plate and the cassette was only 1.4% that is, a median recovery of 98.6%, which is very good and higher than the ones reported for all either methods. Different studies reported surface sample collection efficiencies ranging from 1% to more than 80% (10, 13-17). Several parameters may explain the higher collection efficiency obtained in this study. First, the dust was collected from hard, smooth copper plates. Collection efficiency is known to depend on substrate type, with dust recoveries higher from smooth and hard surfaces and lower from rough or porous surfaces (10, 14, 18). In addition,

sampling continued until no dust was visible, unlike with other techniques that recommend fixed sampling times or a specific number of passes over the surface to be sampled (10, 18). Last, enhanced adherence of the nozzle to the surface thanks to the proposed technical improvements to the cassette (cassette with integrated collection nozzle) probably explains the higher recovery rate.

The median loss between the cassette and the filter was 16%. The dust collection rate on the filter removed from the cassette is estimated at 84%. This residual amount of dust is significantly different from the one measured in the cassette ($p < 0.05$). The losses between the cassette and the filter could be due to retention of dust on the inner walls of the cassette and of its collection nozzle. Our results are consistent with those of Lavoie et al (8), who noted the same phenomenon. Other researchers have also reported that up to 45% of the dust collected remained on the inner wall of the collection nozzle (9, 10). These results demonstrated a serious risk to underestimate the amount of dust if only the filter is analyzed. To limit the significance of the inner wall losses, it is recommended that the entire cassette be weighed.

When dust losses are expressed as percentage loss, there is no significant difference between the plate and the cassette. This contradicts the findings of Reynolds and al. (14), who demonstrated superior collection efficiency when dustiness levels were higher on smooth surfaces. The main difference between our study and that of Reynolds and al. is the dust loadings used. Dust loads in the Reynolds and al. study were very low, ranging from 0.00139 mg/100 cm² to 0.0217 mg/100 cm², whereas those in our study were 26.4 mg/100 cm² to 144.5 mg/100 cm², that is, closer to the loads encountered in HVAC systems (8, 12).

The percentage of dust lost between the cassette and the filter varied significantly depending on the dust deposit level. Losses were greater when dust deposit level were low. One hypothesis, suggested by Ashley and al. (10), is that smaller deposits are composed mainly of small particles that are more prone to be retained within the collection nozzle. However, this hypothesis could not be confirmed by microscopic examination of the particle-size distribution of the deposited particles, as no difference in particle size was noted between the copper plates placed in the generation chamber (data not shown). We disagree with the explanation of Ashley and al. that

small particles are more prone to be retained in the collection nozzle. We rather think that larger particles are more likely to be retained in the collection nozzle by impaction. Larger particles will account for a lot of mass compared to the smaller particles that could follow the streamlines and reach the filter. If the amount of dust deposited on the filter is small, we can expect the mass of the larger particles collected in the nozzle to represent a somewhat larger proportion of the total mass, explaining these results.

Although Byrne (18) reports that sampled surface texture is an important determinant of collection efficiency, this study used a single smooth copper substrate to assess method efficiency. This limitation leaves open the possibility that recovery rates might be different with other surface types. Future studies should be performed with substrates from different regular ventilation ducts, old and new.

Byrne (18) also reports variability related to the operator, as do Royster and Fish (15) in their study of 21 sample collectors. A change of operator would have probably also affected the variability and the overall collection efficiency of the method in this study. It would be also interesting to verify if the manipulation of the cassette by the experimenters, or the high level of humidity can lead to significant variation of masses.

Other factors may influence the particle collection efficiency, particularly the flow rate (13, 17). To improve the collection efficiency of the aspiration methods, Ashley *et al.* (2007) recommended to use rates above 10 L/min. As did Lavoie *et al.* (2010, 2011), a high rate of 15L/min was used in our study.

In conclusion, the collection efficiency of the cassette proved to be excellent, as it picked up close to 99% of the dust deposited on the floor of the generation chamber. Dust loss when the filter was removed for weighing was not negligible. Weighing of the entire cassette is a good alternative for simple assessment of the amount of dust deposited on a surface, especially on HVAC ducts, no matter what the dustiness level.

3.7. Acknowledgments

This study was supported by the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve was granted a M.Sc scholarship from the School of Public Health of the University of Montreal and from the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies.

3.8. Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

3.9. References

1. Kuhn-Kinell, J. 2000. The History of Ventilation and Air Conditioning : Is CERN up to Date with the Latest Technological Developments. In *Proceedings of the Third ST Workshop-CERN*. 200.
2. Lavoie, J., and Lazure, L. 1994. Guide for the prevention of microbial growth in ventilation systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(7) : 2165-2172.
3. Carletti, C., Cellar, G., Raffellini, G., and Sciarpi, F. 2003. Air Quality and Ductwork Contamination : State of the Art and Guidelines. *Advances in Air Pollution Series*. 13 : 413-422.
4. Burge, H. A., Solomon, W. R., and Boise, J. R. 1980. Microbial Prevalence in Domestic Humidifiers. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(4) : 840-844.
5. Mendell, M. J., and Smith, A. H. 1990. Consistent Pattern of Elevated Symptoms in Air-Conditioned Office Buildings : a Reanalysis of Epidemiologic Studies. *American Journal of Public Health*. 80(10) : 1193-1199.
6. Krauter, P., and Biermann, A. 2007. Reaerosolization of Fluidized Spores in Ventilation Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(7) : 2165-2172.
7. Wang, S., Zhao, B., Zhou, B., and Tan, Z. 2012. An Experimental Study on Short-Time Particle Resuspension from Inner Surfaces of Straight Ventilation Ducts. *Building and Environment*. 53 : 119-127.
8. Lavoie, J., Marchand, G., Cloutier, Y., and Lavoué, J. 2011. Validation of the Criteria for Initiating the Cleaning of Heating, Ventilation, and Air-Conditioning (HVAC) Ductwork under Real Conditions. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 8(8) : 467-472.
9. Holopainen, R., Asikainen, V., Pasanen, P., and Seppänen, O. L. L. I. 2002. The Field Comparison of Three Measuring Techniques for Evaluation of the Surface Dust Level in Ventilation Ducts. *Indoor Air*. 12(1) : 47-54.
10. Ashley, K., Applegate, G. T., Wise, T. J., Fernback, J. E., and Goldcamp, M. J. 2007. Evaluation of a Standardized Micro-Vacuum Sampling Method for Collection of Surface Dust. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 4(3) : 215-223.

11. Lavoie, J., Bahloul, A., Cloutier, Y., and Gravel, R. 2010. Cleaning Initiation Criteria for Heating, Ventilation and Air-Conditioning (HVAC) Systems in non-Industrial Buildings. *ASHARE Transactions*. 116 : 1-7.
12. Boor, B. E., Siegel, J. A., and Novoselac, A. 2013. Monolayer and Multilayer Particle Deposits on Hard Surfaces : Literature Review and Implications for Particle Resuspension in the Indoor Environment. *Aerosol Science and Technology*. 47(8) : 831-847.
13. Hee, S. S. Q., Peace, B., Clark, C. S., Boyle, J. R., Bornschein, R. L., and Hammond, P. B. 1985. Evolution of Efficient Methods to Sample Lead Sources, Such as House Dust and Hand Dust, in the Homes of Children. *Environmental Research*. 38(1) : 77-95.
14. Reynolds, S. J., Etre, L., Thorne, P. S., Whitten, P., Selim, M., and Popendorf, W. J. 1997. Laboratory Comparison of Vacuum, OSHA, and HUD Sampling Methods for Lead in Household Dust. *American Industrial Hygiene Association*. 58(6) : 439-446.
15. Savichtcheva, O., D. Frigon, M.O. Ngadi, and Chénier, M. R. 2015. Assessment of the fungal microflora in a pizza factory. *65e congrès annuel de la société canadienne des microbiologistes, affiche AE32* : 109.
16. Wheeler, J. P., and Stanclffe, J. 1998. Comparison of Methods for Monitoring Solid Particulate Surface Contamination in the Workplace. *Annals of Occupational Hygiene*. 42(7) : 477-488.
17. Byrne, M. A. 2000. Suction Methods for Assessing Contamination on Surfaces. *Annals of Occupational Hygiene*. 44(7) : 523-528.

3.10. Figures

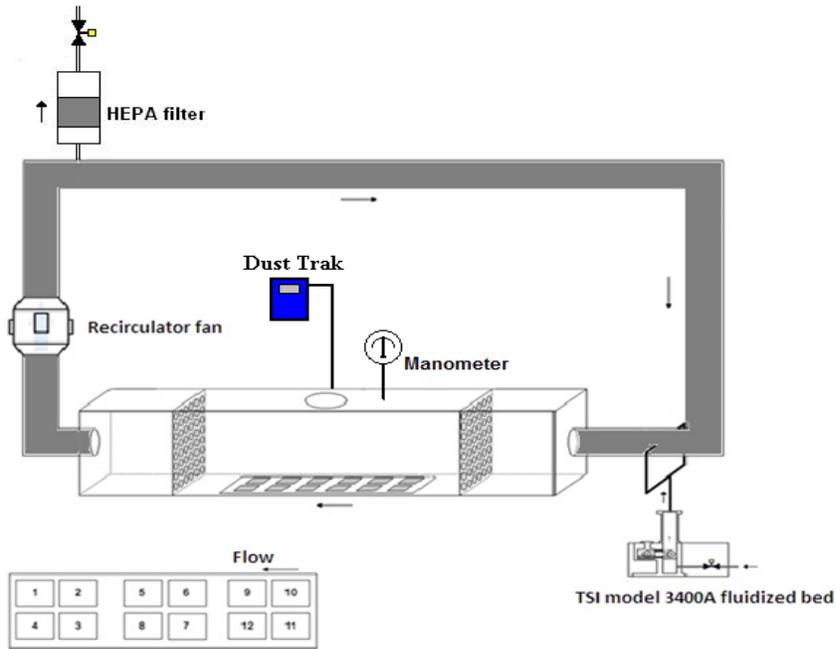


Figure 1. Generation Chamber

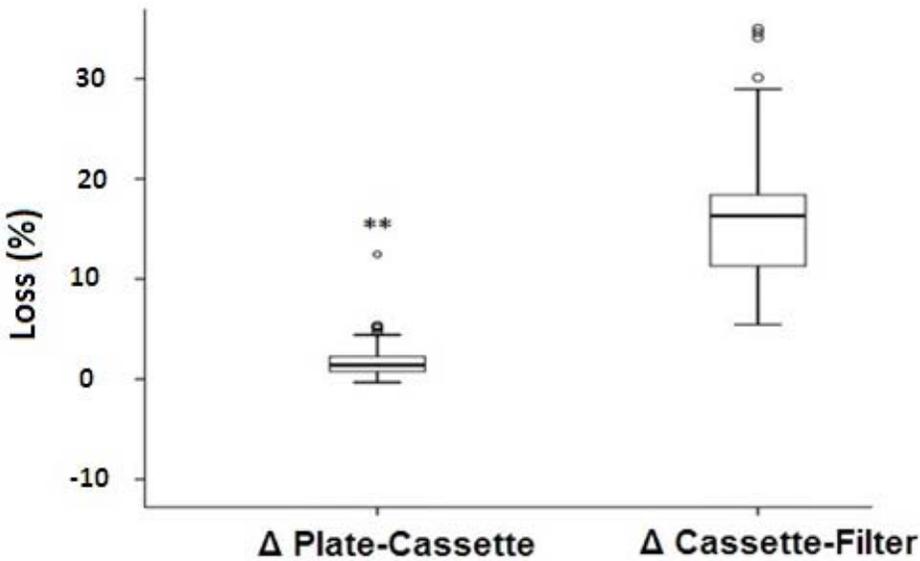


Figure 2. Dust losses (%) between the plate and the cassette (Plate-Cassette) and between the cassette and the filter (Cassette-Filter)

**p-value < 0.05

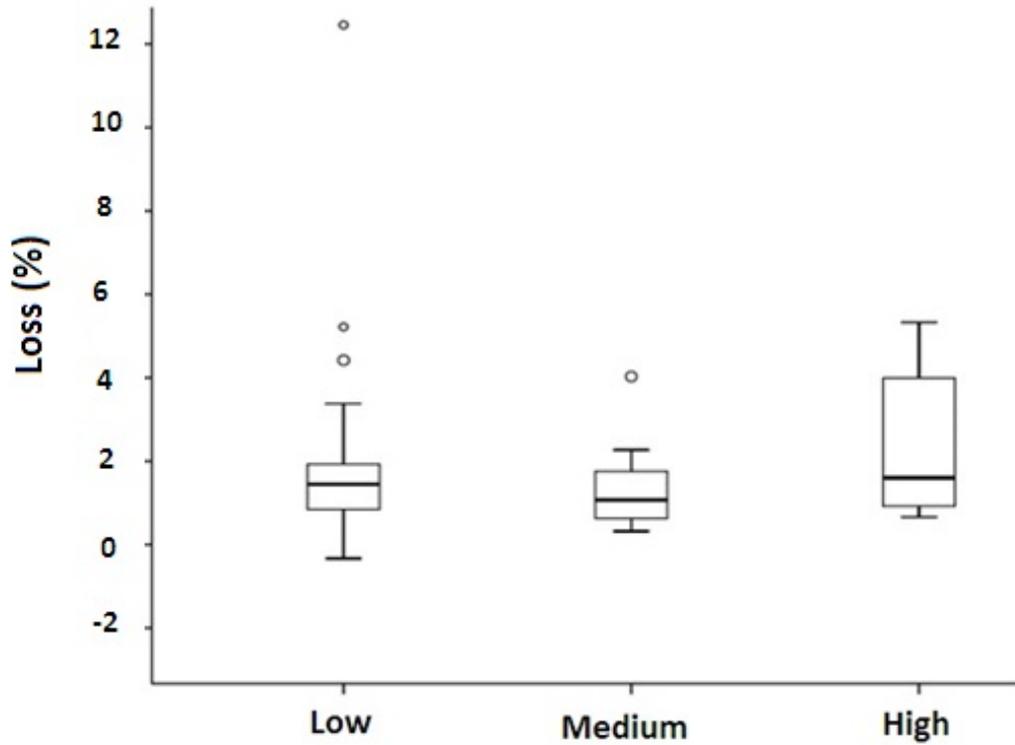


Figure 3. Dust losses (%) between the plate and the cassette at different dustiness levels

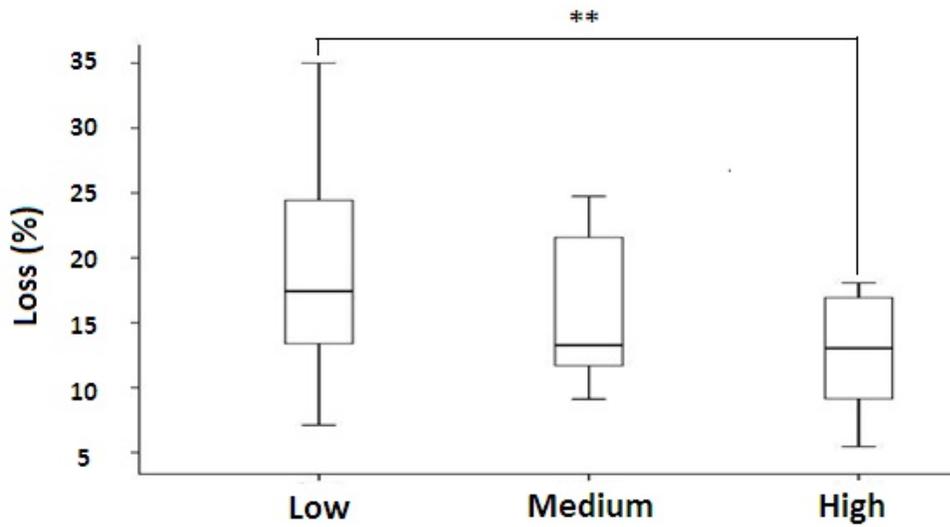


Figure 4. Dust losses (%) between the cassette and the filter at different dustiness levels

**p-value < 0.05

IV. ARTICLE 2 : COMPARAISON DES MÉTHODES POUR ÉVALUER LA BIOMASSE MYCOLOGIQUE DANS LES POUSSIÈRES DES SYSTÈMES DE CHAUFFAGE, VENTILATION ET CONDITIONNEMENT DE L’AIR (CVCA)

4.1. Contribution des auteurs

Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve a participé à la mise au point de la chambre de génération et a effectué des générations de poussières et de spores. Elle a ensuite collecté et analysé les échantillons. Puis elle a analysé et interprété les résultats. Elle a également effectué la recherche bibliographique et rédigé l’article.

Yves Cloutier a participé à la mise au point de la chambre de génération et a supervisé la génération des poussières et des spores. Il a contribué à l’analyse et à l’interprétation des résultats. Il a également corrigé et révisé l’article.

Nancy Lacombe a contribué à l’analyse des échantillons et à l’interprétation des résultats.

Maximilien Debia a contribué à développer le devis du projet, a effectué la recherche du financement. Il a également corrigé et révisé l’article.

Geneviève Marchand a développé le devis du projet et a effectué la recherche du financement. Elle a supervisé les simulations et la collecte des échantillons. Elle a participé à l’analyse et à l’interprétation des résultats. Elle a corrigé et révisé l’article.

Comparison of Methods to Evaluate the Fungal Biomass in Heating, Ventilation and Air-Conditioning (HVAC) Dust Systems

Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve^{1,2}, Yves Cloutier², Nancy Lacombe², Maximilien Debia¹, Geneviève Marchand^{1,2*}

Authors' affiliation

¹Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal

²Occupational Health and Safety Research Institute

***Corresponding author**

Geneviève Marchand

Article soumis à « *Environmental Monitoring and Assessment* »

4.2. Abstract

Poorly maintained heating, ventilation and air-conditioning (HVAC) systems contains dust that can have fungal contamination. Molds have harmful effects on respiratory health. HVAC cleaning decisions are often based on visual inspections of the quantity of dust, without taken into account the mold content. The purpose of this study is to propose a method for fungal contamination estimating of dust in HVAC. Comparisons of different analytical methods were carried out in a controlled-atmosphere exposure chamber. Sixty samples were analysed using four methods: culture, direct microscopic spores count (DMSC), β -*N*-acetylhexosaminidase (NAHA) dosing and qPCR. For each method, the limit of detection, replicability, repeatability and Pearson correlation coefficients were determined. Depending on the analytical method, median spore concentrations per 100 cm² of dust ranged from 10,000 to 815,000. Limits of detection varied from 120 to 218,000 spores/100 cm². Replicability and repeatability were between 1% and 15% depending on the methods. Correlation between methods varied from -0.08 to 0.83. 18S q-PCR showed the best sensitivity and precision, as well as the best correlation. PCR targets molds only, and a total count of fungal structures is obtained. Mold DNA amplification by qPCR is the method recommended for estimating the fungal content found in dust of HVAC systems.

Keywords: HVAC, cleaning criteria, mold biomass, dust, q-PCR,

Summary:

Criteria on the cleaning of ventilation systems should not only be based on an objective evaluation of the dust deposited but it should also consider the mold content. The use of an exposure chamber to evaluate four methods to quantify the mold content of the dust deposited in the HVAC system is reported. This study gives HVAC inspectors tools to objectively evaluate the full cleanliness of the ventilation ducts.

4.3. Introduction

In North America, decisions about cleaning ventilation duct systems are based on a visual assessment of the amount of dust that has accumulated on the inner duct surfaces (Lavoie *et al.*, 2011, 2010; NADCA, 2006). To address the subjective nature of this method of assessment, various organizations have proposed quantitative criteria for evaluating HVAC cleanliness (Lavoie *et al.*, 2011, 2010; NADCA, 2006). However, none of these criteria takes into account the mycological load that the dust may contain. A number of authors have shown that poorly maintained HVAC systems can be contaminated by fungal growth (Burge *et al.*, 1985; Krause and Hammad, 2002; Mendell *et al.*, 2003). The dust deposited in HVAC systems is a source of nutrients that can support the growth of mold when the environmental conditions are favourable (Foarde *et al.*, 1996; Mensah-Attipoe *et al.*, 2015). Xerophilic molds can grow easily in low water environments such as HVAC dust. Krause and Hammad (2002) have shown that samples taken from an HVAC system that has just been cleaned and looks clean can still contain high levels of fungal contamination. Aerosolization of HVAC contaminated dust can increase fungal spore concentrations in the ambient air of the areas served and can therefore be responsible for the exposition of the building occupants (Bernstein *et al.*, 1983; Buttner *et al.*, 1999; Kulp, 1995).

Many epidemiological studies have highlighted a link between excessive humidity, molds or their sub-products, and health effects (CDC-NIOSH, 2012; World Health Organization *et al.*, 2009). Molds are suspected of being responsible for respiratory tract illnesses, such as rhinitis, humidifier fever, asthma and hypersensitivity pneumonitis (World Health Organization *et al.*, 2009). Symptoms of sick building syndrome have been reported, the most common being lethargy; irritation of the nose, throat and eyes; headache; wheezing; shortness of breath and concentration problems (Burge *et al.*, 1985; Fisk *et al.*, 2010; Garrett *et al.*, 1998; Jarvis and Morey, 2001; Meklin *et al.*, 2002; Mendell *et al.*, 2003; Menzies *et al.*, 2003; Menzies and Bourbeau, 1997; Park *et al.*, 2006). A higher prevalence of symptoms has been found among the occupants of buildings affected by mold or humidity. When occupants are moved away from contaminated environments or when corrective measures are taken, a significant drop in symptoms is seen (Jarvis and Morey, 2001; Meklin *et al.*, 2005). A dose-response relationship between these illnesses and molds, their components or indicators of their presence, such as humidity, has been suggested (Jarvis and Morey, 2001; Park *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 1997).

Mold biomass in surface dust of HVAC should be considered when judging the dirtiness of HVAC systems or the effectiveness of their cleaning. In this regard, the availability of a reliable analytical method is essential. A number of methods permitting to analyse an environment's mycological load have been reported (Krause et al., 2003; Mandal and Brandl, 2011; Mensah-Attipoe et al., 2015; Rylander et al., 2010). Some approaches focus on the analysis of the mold containing particles, while others assess for their fragments or mold sub-products. In this study, four methods that had already been used to assess the presence of mold in various environments were evaluated (Krause et al., 2003; Krause and Hammad, 2002; Mandal and Brandl, 2011; Reeslev et al., 2003; Rylander et al., 2010). The four methods are the culture, direct microscopic spore count (DMSC), enzyme assay of β -N-acetylhexosaminidase (NAHA) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

The objective was to propose a method of estimating the mold biomass contained in dust of HVAC system in order to determine the state of dirtiness or to assess the cleaning effectiveness. More specifically, this study compared four mold analysis methods based on samples generated in a laboratory exposure chamber.

4.4. Materials and methods

4.4.1. Mold strains and fungal cultures

Six mold strains from the IRSST's microbial collection were used to contaminate dust used for the generation of samples in the lab exposure chamber: *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium digitatum*, *Ulocladium chartarum*, *Acremonium recifei*, *Syncephalastrum racemosum* and *Absidia corymbifera*. Fungal spores were harvest from a 7-10 days old culture grown on malt extract agar (MEA) (Oxoid, Nepean, ON, Canada) at 25°C and inoculated in PCR grade water. The concentrations of the spore suspensions were determined using a hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA). Each suspension contained between one and three different strains of molds.

4.4.2. Analytic method validation

The limit of detection (LOD), replicability and repeatability were determined for each method. To determine the LOD, a spore suspension with a concentration of 10^6 spores/mL was diluted

progressively until no signal could be detected by each method. The LOD corresponds to three times the standard deviation of 10 measured taken at this weaker concentration. Replicability was determined by analysing six times four suspensions of different concentrations. The mean of the four coefficients of variation (CV) obtained for each suspension was used to calculate replicability. The same calculations were performed for repeatability, but in this case, the readings were taken in duplicate by three different analysts. For the qPCR method, exclusivity and specificity were validated by assessing the detection system's amplification ability on 56 strains of mold for specificity and on 40 strains of bacteria for exclusivity.

4.4.3. Comparison of analytic methods

a) Simulation of dust contamination in the exposure chamber

The dust and spores were generated inside an exposure chamber. The floor of this chamber was equipped with trays that are fitted to receive 12 removable 10 cm x 10 cm smooth copper plates. The air in this system is recirculated in a close loop. A 6 jet Collison nebulizer (BGI, Butler, NJ, USA) was used to aerosolize mold spores from the suspensions. Sterilized sieved dust particles, less than 38 μm in diameter, were also resuspended at the same time using a fluidized bed (model 3400A, TSI, Shoreview, MN, USA). Ten separate sessions of generation were conducted during the study. Generation times varied between 15 minutes and 8 hours. Generation times for molds and dusts were not necessarily the same. The purpose was to produce variable levels of dust and mold on the surface of the chamber.

b) Tacking samples in chamber

Samples of settled dust containing mold were collected with a vacuum sampler method, using a 37 mm dust sampling cassette loaded with a 0,5 μm polyvinyl chloride filter and equipped with an integrated angulated nozzle collector having a 5 mm inlet diameter (EMS, Charleston, SC, USA) (Biyeyeme Bi Mve et al., 2016). To find out the mass of each sample collected, the entire cassettes were pre- and post-weighed using an Analytic Plus AP250D (0.01 g) analytical balance (OHAUS, Butler, NJ, USA,). Six samples were taken per generation, for a total of 60 samples analysed by the four methods.

c) Extraction of samples

All the samples were extracted the same day. The contents of the cassettes were recovered by introducing 3 mL of sterile PCR water directly into the cassette through the collector spout. The cassettes were then agitated on a maxi-vortex DVX-2500 (VWR, Radnor, PA, USA) at 2,500 rpm for 5 minutes. Each extract was separated into four aliquots before being analysed by each method.

d) Culture

Three successive 1/10 dilutions were performed, and 100 μ L were plated on MEA media. After 4 to 7 days of incubation at 25°C, the colonies were counted using an SMZ-2T stereo microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at 20X enlargement. The results were reported in terms of colony-forming units (CFU)/100 cm².

e) Microscopy (DMSC)

Mixed cellulose ester (MEC) membrane filter (diameter: 25 mm; pore size: 0.8 μ m) (SKC, Eighty Four, PA, USA) were used. In order to proceed to the filtration, 100 μ L of a concentrated extract or of its 1/10 dilution were added to 3 mL of sterile water already in the filtering funnel. Then, 100 μ L of 5% safranin (Becton Dickinson, Sparks Glencoe, MD, USA) were added and the suspension was filtered by vacuum. The filtrate was dried at ambient temperature for 24 h, and then transparized with hot acetone using a Vap-300 vaporizer (BGI, Waltham, MA, USA). For this method, 50 random fields at 750X enlargement were counted using a Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon, Melville, NY, USA). The concentration in spores/100 cm² of sampled surface was reported.

f) NAHA assay by Mycometer® method modification

The NAHA assay was done by modifying the assay protocol provided with the Mycometer® (Mycometer handbook, 2011) (Mycometer, Tampa, FL, USA), a liquid aliquot of the sample was analysed. First, the baseline fluorescence of the developer, blank value 1 (BV1), was measured, then an intermediate fluorescence (BV2) was measured on 100 μ L of the fluorogenic substrate added to 2 mL of the developer. Then, 100 μ L of the sample were incubated in 2 mL of substrate. After 30 minutes at ambient temperature, the enzyme activity was quantified by measuring the fluorescence analysis value (AV) of the sample. The actual fluorescence, expressed in relative

fluorescence units (RFUs), was obtained by calculating the Mycometer value (MV) using the formula provided. The number of spores/100 cm² was calculated using equation (1) obtained from the regression line of the standard curve for a suspension of spores of *Penicillium digitatum*.

$$(MV + 3.428) * 3 \text{ mL} / (0.0005 * 0.1 \text{ mL}) \quad (1)$$

g) qPCR

The genomic DNA was extracted using the ZR Fungal Bacterial DNA Miniprep™ kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The primers and probes of the amplification system used are shown in Table 1. The volume of the qPCR reaction was 25 µL. Each reaction contained 2.5 Unit of HotStarTaq® mix (Qiagen, Limburg, Netherlands); 1.25 µM of each primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA); 0.375 µM of the probe; 2 mM of MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 6.75 µL of sterile PCR water and 2 µL of DNA. Amplification was done using a Master Cycler Realplex2 (Eppendorf, Hamburg, Germany) following this program: 15 min at 95°C, followed by forty 15-second cycles at 94°C; 30 seconds at 55.5°C and 15 seconds at 72°C. The standard curve was produced with the DNA of *Penicillium digitatum*. All amplifications were done in duplicate. The results obtained are reported in spores/100 cm².

4.4.4. Data analysis

All statistical analyses were performed on log-transformed data. A quantile-quantile (Q-Q) plot was used to graphically determinate the lognormal distribution. Variance analyses (ANOVAs) were performed on the logarithms of spore concentrations reported by each method. Dunnett's test was used to identify significantly different means from those obtained by the culture method that was used as the reference method. Linear associations on the logarithms data between the different methods were obtained using the Pearson correlation coefficients (*r*). Results below the detection limit were imputed a value of LOD/√2 for all statistical analyses. For the PCR method, all samples having a cycle threshold (Ct) below 35 were considered to be positive. IBM's SPSS Statistics software package for Windows, release 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA, 2012) was used.

4.5. Results

4.5.1 Analytical methods validation

Table 2 presents the analytical validation parameters of the four methods. Limits of detection varied from 120 to 218,000 spores/100 cm². Replicability and repeatability were between 1% and 15%. For the qPCR method, selectivity testing showed that all the bacteria produce Cts greater than 35, whereas for specificity, all the molds tested produced much lower Cts, between 17 and 27. Of the sixty samples, twelve (20%) were undetected by microscopy method and two (3%) by NAHA assay.

4.5.2 Comparison methods

Figure 1 presents the mass of dust sampled, as well as the number of CFUs obtained for each generation. The masses of dust sampled varied between 11.50 and 168 mg/100 cm², while the CFU values obtained with the reference method ranged between 1,080 and 99,000 per 100 cm².

Figure 2 presents the spore concentrations obtained for the 60 samples analysed with each method. The median number of spores reported by the other three methods ranged from 10,000 to 815,000 spores/100 cm². Dunnett's multiple comparison procedure showed that qPCR and enzyme assay produce statistically higher concentrations than culture ($p < 0.05$), whereas microscopy is not statistically different ($p = 0.30$). Enzyme assay yielded significantly higher concentrations than the qPCR method, which itself yielded more spores than the microscopy method.

Figure 3 shows the linear associations between different methods and the Pearson correlation coefficients (r) obtained. A significant correlation exist between culture and qPCR ($p < 0.01$), as well as with the DMSC method ($p < 0.01$), whereas culture has no correlation with the NAHA method ($p = 0.57$). A significant correlation can also be seen between qPCR and the DMSC ($p < 0.01$) and NAHA ($p < 0.05$) methods. No significant correlation was seen between the NAHA assay and DMSC method ($p = 0.57$).

4.6. Discussion and conclusion

The dust levels generated correspond to the different levels of dustiness found in HVAC systems. In 2013, Boor and *al.* reported that deposits on the surfaces of ventilation ducts can range from

10 mg/100 cm² to 1,000 mg/100 cm². In 2011, Lavoie and *al.* found concentrations ranging from 0.14 mg/100 cm² to 337 mg/100 cm² in samples collected from a variety of HVAC ducts under real conditions.

In the present study, a common extraction was performed for all the methods in order to control the variability among the samples and to be able to assign the observed differences only to the analytical methods and not the samples. This is a significant methodological difference from other studies.

With the reference culture method, analysts may find interpretation of the counts difficult when confluence is present on the petri dishes, making it hard to distinguish between colonies and to establish the real concentrations. This method is also limited to the culturable fraction of mold biomass that can explain the lower concentration expected.

The enzyme assay is very easy to perform. It doesn't require a specialist and can be performed directly in the field, whereas for the other methods, a trained analyst working in a laboratory is required. The Enzyme assay proved to be the least sensitive of the methods evaluated. In this study, the LOD was 72,000 spores/mL, which is equivalent, depending on the unit of measure used, to 40 RFU/mL or 120 RFU/100 cm². Despite the lack of sensitivity noted, the LOD was comparable to those reported by other authors. In fact, (Mensah-Attipoe et *al.*, 2015) reported an LOD of 216 RFU/100 cm², while (Reeslev et *al.*, 2003) reported 140 RFU/mL, and (Krause and Hammad, 2002) 120 RFU/mL. The differences between the reported LODs may be due to the computation methods used. In this study, the LOD corresponds to three times the standard deviation calculated from 10 readings taken on a suspension having a concentration slightly above the background level. Other studies did not specify their LOD estimation methods. Though less sensitive, enzyme assay always yielded higher spore concentrations than the other methods did. This result is consistent with those reported by (Mensah-Attipoe et *al.*, 2015) and (Krause and Hammad, 2002), who respectively found that the counts of culturable cells and of spores by the microscopy methods were lower than the one obtained by the NAHA assay. (Mensah-Attipoe et *al.*, 2015) reported correlations between the colony count and the NAHA assay. In their work, an independent sample was used for each analytical method. The NAHA enzyme can be found on

viable and non-viable structures, which may explain the overestimation in relation to the culture method (Mensah-Attipoe et al., 2015; Rylander et al., 2010). In addition, as reported by Rylander, the NAHA enzyme is not exclusive to molds, as it is also produced by bacteria, protozoa, pollen and mammalian cells (Rylander et al., 2010). Bacteria and pollen were found in some of our samples. The overestimation may also be explained by a lack of specificity, since the measured fluorescence may not originate exclusively from the fungal enzymes.

Surprisingly, the direct microscopy method turned out to be less sensitive than the culture one. Unlike the culture method, the microscopy method is not limited to the culturable cells. The culture underestimation is well documented and can sometimes reach two orders of magnitude (Krause et al., 2003; Mandal and Brandl, 2011; Schnürer, 1993). Higher concentrations by microscopy were expected. This lack of sensitivity was also confirmed by Mandal and Brandl (2011). In fact, from their point of view, microscopy is a semi-quantitative method. For the microscopy method, only 50 random fields of the 1,535 possible ones are counted. Even though good repeatability was demonstrated in validation process, this approach seems to produce estimates of the concentration found in the dust sample. In addition to this limitation, there is also the difficulty of distinguishing fungal structures from other particles which may interfere with the ability to see the spores.

The qPCR method showed a LOD of 132 spores/100 cm², showing the best sensitivity. This sensitivity is attributable to the fact that the method detects fungal DNA regardless of the spore viability. The qPCR is not limited to the analysis of culturable fungal. This is an important characteristic, as all fungal structures, culturable or not, can have health effects (World Health Organization et al., 2009). The universal qPCR detection system (Liu et al., 2012) used for this study demonstrated excellent specificity as only the molds and none of the bacteria tested were amplified. Although all of the methods achieved the 25% precision limits suggested by NIOSH (Kennedy et al., 1994), qPCR was the best in terms of replicability and repeatability, suggesting that it is the most accurate. In addition to showing a significant correlation with all tested methods in this study, the qPCR also had the best correlation with the reference method that is culture.

To conclude, because of these advantages, the qPCR with the universal markers is recommended for the estimation of the mold biomass in the dust of HVAC system, as a complement to the gravimetric analyses sometimes performed.

4.7. Acknowledgments

This study was supported by the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). Marie Jeanne Biyeyeme Bi Mve was granted a M.Sc scholarship from the School of Public Health of the University of Montreal and from the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies.

4.8. Declaration of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

4.9. References

- Bernstein, R.S., Sorenson, W.G., Garabrant, D., Reaux, C., Treitman, R.D., 1983. Exposures to Respirable, Airborne *Penicillium* from a Contaminated Ventilation System: Clinical, Environmental and Epidemiological Aspects. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 44, 161–169. doi:10.1080/15298668391404581.
- Biyeyeme Bi Mve, M.-J., Cloutier, Y., Lavoie, J., Debia, M., Marchand, G., 2016. An optimized sampling method for the collection of surface dust deposits in HVAC systems. *Environ. Monit. Assessment* Submitted in January 2016.
- Boor, B. E., Siegel, J. A., and Novoselac, A. 2013. Monolayer and Multilayer Particle Deposits on Hard Surfaces : Literature Review and Implications for Particle Resuspension in the Indoor Environment. *Aerosol Science and Technology.* 47(8) : 831-847.
- Burge, P.S., Finnegan, M., Horsfield, N., Emery, D., Austwick, P., Davies, P.S., Pickering, C.A., 1985. Occupational asthma in a factory with a contaminated humidifier. *Thorax* 40, 248–254.
- Buttner, M.P., Cruz-Perez, P., Garrett, P.J., Stetzenbach, L.D., 1999. Dispersal of fungal spores from three types of air handling system duct material. *Aerobiologia* 15, 1–8.
- CDC-NIOSH, 2012. NIOSH Alert: Preventing occupational respiratory disease from exposures caused by dampness in office buildings, schools, and other nonindustrial buildings.
- Fisk, W.J., Eliseeva, E.A., Mendell, M.J., 2010. Association of residential dampness and mold with respiratory tract infections and bronchitis: a meta-analysis. *Environ. Health* 9, 72. doi:10.1186/1476-069X-9-72.
- Foarde, K.K., VanOsdell, D.W., Chang, J.C.S., 1996. Evaluation of Fungal Growth on Fiberglass Duct Materials for Various Moisture, Soil, Use, and Temperature Conditions. *Indoor Air* 6, 83–92. doi:10.1111/j.1600-0668.1996.t01-2-00004.x.
- Garrett, Rayment, Hooper, Abramson, Hooper, 1998. Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children. *Clin. Immunol Allergy* 28, 459–467. doi:10.1046/j.1365-2222.1998.00255.x.
- Jarvis, J.Q., Morey, P.R., 2001. Allergic Respiratory Disease and Fungal Remediation in a Building in a Subtropical Climate. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 16, 380–388. doi:10.1080/10473220117482.

- Kennedy, E.R., Fischbach, T.J., Song, R., Eller, P.M., Shulman, S.A., 1994. Guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation. National Inst. for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH (United States).
- Krause, J.D., Hammad, Y.Y., 2002. Measuring the Efficacy of Mold Remediation on Contaminated Ductwork, in: Proceedings of the 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate: Indoor Air. pp. 360–365.
- Krause, J.D., Hammad, Y.Y., Ball, L.B., 2003. Application of a Fluorometric Method for the Detection of Mold in Indoor Environments. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 18, 499–503. doi:10.1080/10473220301457.
- Kulp, R.N., 1995. Two Case Studies Evaluating HVAC Systems as Sources of Bioaerosols. Inside IAQ.
- Lavoie, J., Bahloul, A., Cloutier, Y., Gravel, R., 2010. Cleaning initiation criteria for heating, ventilation and air conditioning (HVAC) systems in non-industrial buildings. *Extraction* 180, 0–1.
- Lavoie, J., Marchand, G., Cloutier, Y., Lavoué, J., 2011. Validation of the Criteria for Initiating the Cleaning of Heating, Ventilation, and Air-Conditioning (HVAC) Ductwork Under Real Conditions. *J. Occup. Environ. Hyg.* 8, 467–472. doi:10.1080/15459624.2011.590740.
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.-R., Huang, Y.-T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., others, 2012. FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 12, 255.
- Mandal, J., Brandl, H., 2011. Bioaerosols in indoor environment-a review with special reference to residential and occupational locations. *Open Environ. Biol. Monit. J.* 4, 83–96.
- Meklin, T., Husman, T., Pekkanen, J., Hyvärinen, A., Hirvonen, M.R., Nevalainen, A., 2002. Effects of moisture-damage repair on microbial exposure and health effects in schools. *Proceeding Indoor Air* 416–420.
- Meklin, T., Potus, T., Pekkanen, J., Hyvärinen, A., Hirvonen, M.R., Nevalainen, A., 2005. Effects of moisture-damage repairs on microbial exposure and symptoms in schoolchildren. *Indoor Air* 15, 40–47.

- Mendell, M.J., Naco, G.M., Wilcox, T.G., Sieber, W.K., 2003. Environmental risk factors and work-related lower respiratory symptoms in 80 office buildings: An exploratory analysis of NIOSH data. *Am. J. Ind. Med.* 43, 630–641. doi:10.1002/ajim.10211.
- Mensah-Attipoe, J., Reponen, T., Salmela, A., Veijalainen, A.-M., Pasanen, P., 2015. Susceptibility of green and conventional building materials to microbial growth. *Indoor Air* 25, 273–284. doi:10.1111/ina.12140.
- Menzies, D., Bourbeau, J., 1997. Building-related illnesses. *N. Engl. J. Med.* 337, 1524–1531.
- Menzies, D., Popa, J., Hanley, J.A., Rand, T., Milton, D.K., 2003. Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers' health and wellbeing: double-blind multiple crossover trial. *The Lancet* 362, 1785–1791.
- NADCA, 2006. Assessment, cleaning and restoration of HVAC systems.
- Park, J.-H., Cox-Ganser, J., Rao, C., Kreiss, K., 2006. Fungal and endotoxin measurements in dust associated with respiratory symptoms in a water-damaged office building. *Indoor Air* 16, 192–203. doi:10.1111/j.1600-0668.2005.00415.x.
- Reeslev, M., Miller, M., Nielsen, K.F., 2003. Quantifying Mold Biomass on Gypsum Board: Comparison of Ergosterol and Beta-N-Acetylhexosaminidase as Mold Biomass Parameters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3996–3998. doi:10.1128/AEM.69.7.3996-3998.2003.
- Rylander, R., Reeslev, M., Hulander, T., 2010. Airborne enzyme measurements to detect indoor mould exposure. *J. Environ. Monit.* 12, 2161. doi:10.1039/c0em00336k.
- Schnürer, J., 1993. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 552–555.
- Williamson, I.J., Martin, C.J., McGill, G., Monie, R.D., Fennerty, A.G., 1997. Damp housing and asthma: a case-control study. *Thorax* 52, 229–234.
- World Health Organization, Heseltine, E., Rosen, J. (Eds.), 2009. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. WHO, Copenhagen.

4.10. Tables and figures

Tableau I. Universal system (primers and probe) used for amplifying the mold by the PCR method

FungiQuant-F	GGR AAA CTC ACC AGG TCC AG
FungiQuant-R	GSW CTA TCC CCA KCA CGA
FungiQuant-Probe	TGG TGC ATG GCC GTT

Tableau II. Analytical parameters to evaluate the sensitivity and accuracy of each method for mold analysis in dust

Method	LOD	Replicability (%)	Repeatability (%)
Culture (CFU/100 cm²)	120	12	11
DMSC (spores/100 cm²)	1,980	5	10
NAHA assay (spores/100 cm²)	218,000	6	15
PCR (spores/100 cm²)	132	1	1

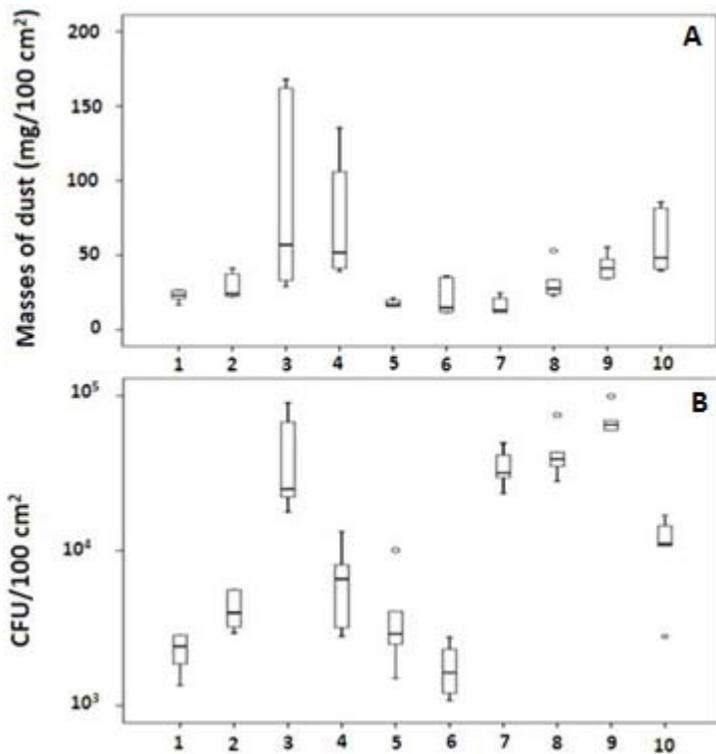


Figure 1. Average of masses of dust (mg/100 cm²) (A) and the CFU/100 cm² (B) obtained for each of the ten concurrent generations of dust and mold spores

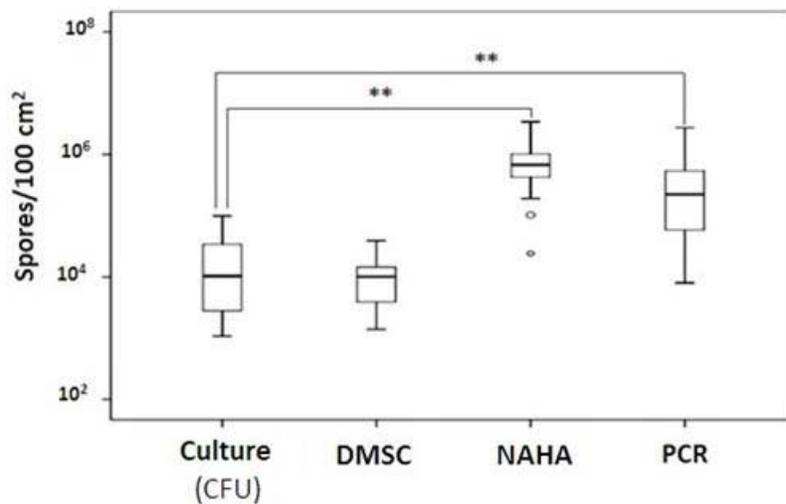


Figure 2. Average spores (or CFU) reported for each method for sixty samples of dust analyzed

**p<0.05

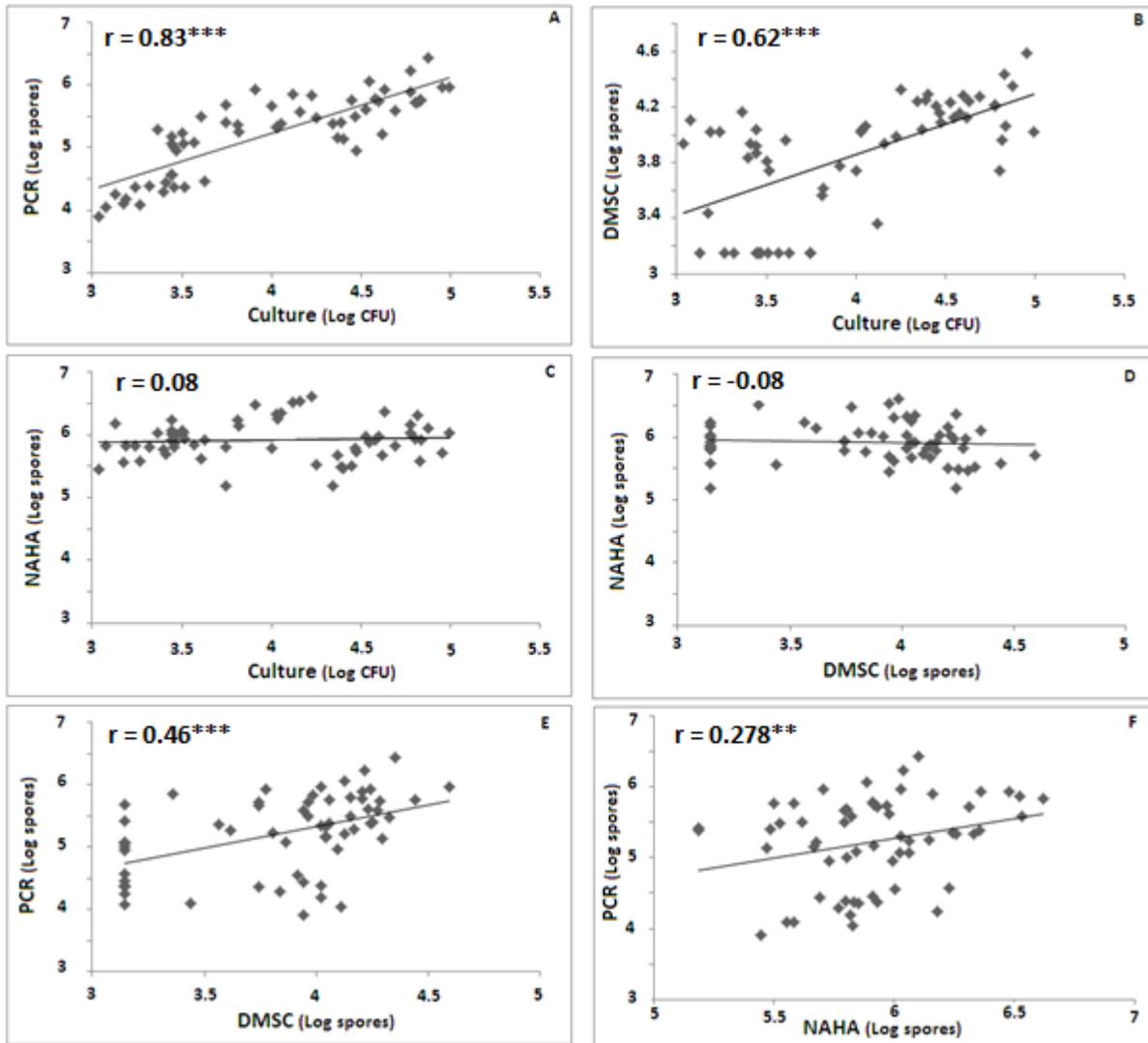


Figure 3. Linear associations and Pearson correlation coefficient obtained between the different analytical methods

** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$

V. ÉVALUATION DES COÛTS ET DES BÉNÉFICES DE CHAQUE MÉTHODE

Tableau I. Comparaison des méthodes d'analyse de la flore mycologique dans la poussière des systèmes CVCA en fonction du temps de réalisation, des délais d'analyse et des coûts

Méthode	Délai d'analyse	Temps technique	Coût (\$)	Dénombrement
Culture	5 jours	40 min	10	Cultivable
Microscopie	24 h	25 min	2	Cultivable, viable, non viable
Dosage NAHA	1 h	10 min	25	Cultivable, viable, non viable
PCR	3h	90 min	15	Cultivable, viable, non viable

Selon la méthode analytique, le délai entre le début de l'analyse et le résultat final varie d'une heure à 5 jours. Le temps effectif pour les manipulations varie de 10 à 90 min, tandis que les coûts varient de 2 à 25 \$ par échantillon.

VI. DISCUSSION GÉNÉRALE

6.1. Méthode de prélèvement des poussières

Les travaux de recherche présentés dans le premier article ont permis en premier lieu de rendre disponible une méthode de prélèvement des poussières de surfaces en améliorant sur le plan technique la méthode ASPEC existante. En effet, grâce à une simulation d'un conduit miniaturisé en laboratoire, plusieurs niveaux d'empoussièrement ont été produits, correspondant à des niveaux qu'on peut trouver dans des situations réelles (43, 44). Les poussières ont été prélevées par une nouvelle cassette qui a montré une excellente efficacité de récupération des poussières déposées. La quasi-totalité des poussières présentes sur les plaques a été prélevée. L'efficacité de collecte (médiane à 99%) ainsi obtenue est comparable, voire supérieure aux autres efficacités rencontrées dans la littérature (1 à plus de 80%) (56-60). De plus, cette méthode de prélèvement semble ne pas être influencée par le niveau d'empoussièrement qu'il soit faible, moyen ou élevé. C'est la première fois que cette cassette est utilisée, puisqu'elle a été initialement fabriquée pour les besoins de ce projet. Cette cassette peut être utilisée pour juger de façon quantitative et objective sans risque de sous-estimer les niveaux de poussières présentes sur les surfaces des systèmes de ventilation lorsqu'elle est pesée en entier et que l'extraction se fait directement dans la cassette dans le cas où les analyses sont requises.

Dans cette étude, la cassette a été testée sur des surfaces lisses et dures mais pas sur d'autres substrats pouvant présenter plus de difficultés de collecte comme les substrats rugueux et poreux. Toutefois, Reynolds et *al.* (1997) révèlent que les méthodes de collecte par aspiration ont souvent une meilleure efficacité de collecte sur des surfaces rugueuses et poreuses comparées aux méthodes par essuyage (58). Cette cassette montrerait possiblement une bonne efficacité de collecte sur ce type de substrat par rapport à d'autres méthodes qui pourraient être utilisées.

Les résultats du premier article permettent également de démontrer qu'il y a une sous-estimation importante des poussières présentes sur la surface, lorsqu'on ne traite que les poussières retenues sur le filtre. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Lavoie et *al.* (2010, 2011) ainsi qu'Ashley et *al.* (2007) qui avaient également observés ce phénomène (43, 44, 60). En effet, les poussières adhèrent non seulement aux parois de la cassette, mais aussi au bec de collecte. La pesée

uniquement du filtre produit un biais important de la quantité réelle de poussière échantillonnée. Avec la méthode proposée, ceci ne pose plus de problème puisque la cassette est pesée entièrement.

Les méthodes d'échantillonnage des poussières de surface peuvent être classées en deux catégories : les méthodes par essuyage (frottis) et les méthodes par aspiration (suction). Les méthodes par essuyage sont largement utilisées en hygiène du travail et de l'environnement pour déterminer la contamination des surfaces (60). C'est pourquoi, en plus de la cassette, nous avons jugé utile de tester aussi une méthode par essuyage. La méthode par frottis évaluée durant cette étude s'est montrée très peu efficace et a été abandonnée dès les premiers essais. Le milieu de collecte s'est saturé bien avant que la surface de prélèvement puisse être parcourue. Ceci confirme ce que Halopainen *et al.* (2002) avaient démontré, notamment que les méthodes par essuyage ne sont pas bien adaptées pour les surfaces ayant des dépôts importants de poussières (61). Puisque dans les CVCA, des quantités importantes de poussières peuvent être rencontrées, il paraît évident que les méthodes par aspiration doivent être privilégiées pour effectuer les prélèvements dans les conduits des systèmes CVCA.

6.2. Comparaison des méthodes analytiques des moisissures

À notre connaissance, aucune étude n'a fait la comparaison de ces quatre méthodes d'analyse de la biomasse mycologiques sur des échantillons de poussières provenant des systèmes de ventilation. En comparant ces quatre méthodes, le deuxième article propose une méthode analytique optimale d'évaluation du contenu fongique des poussières, soit la méthode PCR.

La PCR est la méthode qui s'est démarquée comme méthode d'évaluation de la biomasse mycologique dans les poussières. En effet, elle a montré les meilleures performances analytiques, notamment par sa sensibilité et sa fidélité. Nous pensons qu'il s'agit de la méthode qui a vraisemblablement rapporté la quantité de spores la plus près du nombre réel dans les échantillons analysés. Tout d'abord, elle ne sous-estime pas les structures fongiques comme la microscopie ou la culture, puisqu'elle détecte toutes les structures fongiques (spores, hyphes, mortes, cultivables, vivantes) et qu'elle n'est pas sujette aux d'interférences par rapport aux débris de poussières. De plus, elle a démontré une meilleure spécificité puisque les amorces et la

sonde utilisées n'ont pas amplifié d'autres organismes, particulièrement les bactéries testées dans cette étude. De ce fait, la méthode PCR ne surestime probablement pas les fragments mycologiques comme le fait dosage de la NAHA. Également, c'est la méthode qui a montré non seulement une corrélation significative avec toutes les autres méthodes testées (CDSM et NAHA), mais aussi la corrélation la plus forte avec la méthode de référence (culture). Enfin le délai entre le début de l'analyse et le résultat final est court. Malgré tous ces points positifs, la PCR présente certaines contraintes techniques et financières puisqu'elle nécessite que les analyses soient effectuées dans un laboratoire par un analyste spécialisé en biologie moléculaire et qu'elle est une méthode assez onéreuse.

Le comptage direct des spores par microscopie présente des avantages non négligeables. En effet, son coût est très faible, il est douze fois moins cher que celui du dosage de la NAHA et elle détecte non seulement toutes les structures fongiques (pas uniquement les viables), mais aussi elle peut permettre une identification au genre de certaines spores. Comparé à la méthode de référence, le délai d'analyse est relativement court, mais il demeure plus long que celui des deux autres méthodes (PCR et dosage de la NAHA). Les résultats du deuxième article permettent d'affirmer comme ceux de plusieurs autres chercheurs, que le CDSM est une méthode qui sous-estime les structures fongiques et que cette méthode devrait plutôt être considérée comme une méthode semi-quantitative du décompte des fragments fongiques (54, 55). Cette sous-estimation peut être provoquée par l'obstruction des spores par les débris de poussières, mais aussi par une interprétation difficile et subjective de la part de l'analyste qui doit faire la distinction entre les structures fongiques et les autres débris.

Le dosage de la NAHA est une méthode très facile à exécuter. Elle ne nécessite aucune spécialisation de l'analyste. Les analyses peuvent être effectuées directement sur le site de prélèvements et les résultats sont quasi immédiats. Du fait que l'enzyme soit présente sur la paroi cellulaire fongique des structures viables ou non viables, le dosage de la NAHA présente aussi l'avantage de rapporter un compte total de structures fongiques. C'est la méthode la moins sensible comparativement aux autres. La concentration de spores, requise pour avoir un signal au-dessus du bruit de fond, est très élevée. Cette méthode manque également de spécificité pour les moisissures. En effet, l'enzyme est rencontrée chez d'autres organismes tels que les bactéries, le

pollen, les cellules de mammifères ou les protozoaires (62). Ce manque de spécificité entraîne un « risque » non négligeable de surestimation du compte total qui produirait des résultats faussement positifs. La méthode NAHA est la seule qui n'est pas corrélée avec la méthode de référence par culture. Elle a rapporté le plus grand nombre de spores par rapport aux autres méthodes, confirmant possiblement la surestimation en raison du manque de spécificité comme expliqué précédemment. Enfin, le dosage de la NAHA est la méthode la plus onéreuse, ce qui peut limiter l'intérêt pour son utilisation.

La croissance fongique est une méthode standard en microbiologie permettant d'évaluer les moisissures cultivables. Elle donne une idée générale de la flore mycologique capable de croître en conditions offertes en laboratoire. Tout comme la microscopie, l'identification des moisissures est possible. En plus, c'est la méthode la moins dispendieuse après la microscopie. Son délai d'analyse très long (au moins 5 jours), ainsi que la sous-estimation des structures fongiques non cultivables sont les limitations principales de cette méthode.

VII. CONCLUSION

En somme, ce projet a permis de proposer une méthode améliorée, optimisée et performante de prélèvement des poussières de surface à partir d'une simulation d'empoussièrement dans un conduit de ventilation miniaturisé. Pesée entièrement, cette cassette permet de mesurer les masses de poussières déposées dans les conduits de ventilation. Il est préconisé que l'échantillon soit extrait directement dans la cassette et non pas à partir du filtre, peu importe la méthode analytique d'évaluation de la flore mycologique. Bien qu'elle soit onéreuse par rapport à la culture et la microscopie, la PCR est la méthode recommandée pour l'évaluation de la biomasse mycologique contenue dans les poussières des conduits de ventilation, notamment parce qu'elle a montré à la fois une meilleure sensibilité et une meilleure fidélité, elle ne sous-estime pas ou ne surestime pas les structures fongiques, et elle a montré à la fois une corrélation avec toutes les autres méthodes et la meilleure corrélation avec la méthode standard. Une validation de cette conclusion est en cours sur des échantillons prélevés dans divers systèmes de ventilation en situation réelle.

Les méthodes d'échantillonnage et d'analyse des poussières des systèmes CVCA ainsi proposées permettront d'améliorer une problématique de santé publique. En plus des mesures gravimétriques, elles pourront être utilisées pour juger de l'état de salubrité des systèmes de ventilation ou d'en évaluer l'efficacité du nettoyage afin de prévenir l'exposition des moisissures aux occupants, et par conséquent de réduire des effets possibles sur leur santé. Toutefois, cela nécessite l'établissement préalable des critères de déclenchement en terme de quantité de moisissures dans les poussières, critères auxquels doivent se référer les gestionnaires des édifices.

BIBLIOGRAPHIE

1. Carletti, C., Cellar, G., Raffellini, G., and Scurpi, F. 2003. Air Quality and Ductwork Contamination : State of the Art and Guidelines. *Advances in Air Pollution Series*. 13 : 413-422.
2. Mandal, J., and Brandl, H. 2011. Bioaerosols in Indoor Environment-a Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations. *Open Environmental and Biological Monitoring Journal*. 4 : 83-96.
3. Kendrick, B. 2002. The fifty Kingdom. Third Edition. Mycologue Publications. Sydney Canada. 373 p.
4. Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur : rapport scientifique. Consulté en mars 2015 et disponible sur : https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/126_RisquesMoisissuresMilieuInterieur.pdf
5. Rowan, N. J., Johnstone, C. M., McLean, R. C., Anderson, J. G., and Clarke, J. A. 1999. Prediction of Toxigenic Fungal Growth in Buildings by Using a Novel Modelling System. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11) : 4814-4821.
6. Méheust, D. 2012. Exposition aux moisissures en environnement intérieur : méthodes de mesure et impacts sur la santé. Dissertation doctorale, Université Rennes 1. Consulté en juin 2015 et disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00768444/document>
7. Grant, C., Hunter, C. A., Flannigan, B., and Bravery, A. F. 1989. The Moisture Requirements of Moulds Isolated From Domestic Dwellings. *International Biodeterioration*. 25(4) : 259-284.
8. Mensah-Attipoe, J., Reponen, T., Salmela, A., Veijalainen, A. M., and Pasanen, P. 2014. Susceptibility of Green and Conventional Building Materials to Microbial Growth. *Indoor Air*. 25(3) : 273-284.
9. Foarde, K. K., VanOsdell, D. W., and Chang, J. C. S. 1996. Evaluation of Fungal Growth on Fiberglass Duct Materials for Various Moisture, Soil, Use, and Temperature Conditions. *Indoor Air*. 6(2) : 83-92.
10. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 1999. Bioaerosols : Assessment and Control. Publication 3180. Janet Macher Editor. 526 p.

11. Stevenson, A., Cray, J. A., Williams, J. P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N., McClure, C. D., Grant, I. R., Houghton, J. D., Quinn, J. P., and others. 2014. Is there a Common Water-Activity Limit for the three Domains of Life. *The ISME Journal*.
12. Tri, M. N. M. 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam-étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Dissertation doctorale, Institut National Polytechnique de Toulouse. Consulté le 18 mai 2015 et disponible sur : http://www.healthvalue.net/th_se_.pdf
13. Gots, R. E., Layton, N. J., and Pirages, S. W. 2003. Indoor Health: Background Levels of Fungi. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 64(4) : 427-438.
14. Eduard, W. 2009. Fungal Spores: a Critical Review of the Toxicological and Epidemiological Evidence as a Basis for Occupational Exposure Limit Setting. *Critical Reviews in Toxicology*. 39(10) : 799-864.
15. Mazur, L. J., and Kim, J. 2006. Spectrum of Noninfectious Health Effects from Molds. *Pediatrics*. 118(6) : e1909-e1926.
16. Kurup, V. P. 1984. Interaction of *Aspergillus Fumigatus* Spores and Pulmonary Alveolar Macrophages of Rabbits. *Immunobiology*. 166(1) : 53-61.
17. Waldorf, A. R., Levitz, S. M., and Diamond, R. D. 1984. In Vivo Bronchoalveolar Macrophage Defense Against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Infectious Diseases*. 150(5) : 752-760.
18. Schaffner, A., Douglas, H., and Braude, A. 1982. Selective Protection Against Conidia by Mononuclear and Against Mycelia by Polymorphonuclear Phagocytes in Resistance to *Aspergillus* : Observations on these Two Lines of Defense in Vivo and in Vitro with Human and mouse Phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 69(3) : 617.
19. Verhoeff, A. P., and Burge, H. A. 1997. Health Risk Assessment of Fungi in Home Environments. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 78(6) : 544-556.
20. Korpi, A., Kasanen, J. P., Alarie, Y., Kosma, V. M., and Pasanen, A. L. 1999. Sensory Irritating Potency of some Microbial Volatile Organic Compounds (MVOCs) and a Mixture of five MVOCs. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 54(5) : 347-352.

21. Rylander, R. 1999. Indoor Air-Related Effects and Airborne (1--> 3)-beta-D-Glucan. *Environmental Health Perspectives*. 107(Suppl 3) : 501.
22. Etzel, R. A. 2002. Mycotoxins. *Journal of the American Medical Association*. 287(4) : 425-427.
23. Schleibinger, H., Laussmann, D., Bornehag, C. G., Eis, D., and Rueden, H. 2008. Microbial Volatile Organic Compounds in the Air of Moldy and Mold-free Indoor Environments. *Indoor Air*. 18(2) : 113-124.
24. Husman, T. 1996. Health Effects of Indoor-Air Microorganisms. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 5-13.
25. Fischer, G., and Dott, W. 2003. Relevance of Airborne Fungi and their Secondary Metabolites for Environmental, Occupational and Indoor Hygiene. *Archives of Microbiology*. 179(2) : 75-82.
26. Kawamura, S., Maesaki, S., Tomono, K., Tashiro, T., and Kohno, S. 2000. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma. *Internal medicine*. 39(3) : 209-212.
27. Gangneux, J. P., Poirot, J. L., Morin, O., Derouin, F., Bretagne, S., Datry, A., et autres. 2002. Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive : propositions de standardisation des méthodologies et des modalités d'application. *La Presse Médicale*. 31(18) : 841-848.
28. Reboux, G. 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. 46(3) : 208-212.
29. Menzies, D., and Bourbeau, J. 1997. Building-Related Illnesses. *New England Journal of Medicine*. 337(21) : 1524-1531.
30. Menzies, D., Popa, J., Hanley, J. A., Rand, T., and Milton, D. K. 2003. Effect of Ultraviolet Germicidal Lights Installed in Office Ventilation Systems on Workers' Health and Wellbeing : Double-Blind Multiple Crossover Trial. *The Lancet*. 362(9398) : 1785-1791.
31. Garrett, M. H., Rayment, P. R., Hooper, M. A., Abramson, M. J., and Hooper, B. M. 1998. Indoor Airborne Fungal Spores, House Dampness and Associations With

- Environmental Factors and Respiratory Health in Children. *Clinical and Experimental Allergy*. 28(4) : 459-467.
32. Mendell, M. J., Naco, G. M., Wilcox, T. G., and Sieber, W. K. 2003. Environmental Risk Factors and Work-related Lower Respiratory Symptoms in 80 Office Buildings: an Exploratory Analysis of NIOSH Data. *American Journal of Industrial Medicine*. 43(6) : 630-641.
33. Meklin, T., Potus, T., Pekkanen, J., Hyvärinen, A., Hirvonen, M. R., and Nevalainen, A. 2005. Effects of Moisture-Damage Repairs on Microbial Exposure and Symptoms in Schoolchildren. *Indoor Air*. 15(s10) : 40-47.
34. Burge, P. S., Finnegan, M., Horsfield, N., Emery, D., Austwick, P., Davies, P. S., and Pickering, C. A. 1985. Occupational Asthma in a Factory with a Contaminated Humidifier. *Thorax*. 40(4) : 248-254.
35. Park, J. H., Cox-Ganser, J., Rao, C., and Kreiss, K. 2006. Fungal and Endotoxin Measurements in Dust Associated with Respiratory Symptoms in a Water-Damaged Office Building. *Indoor Air*. 16(3) : 192-203.
36. Jarvis, J. Q., and Morey, P. R. 2001. Allergic Respiratory Disease and Fungal Remediation in a Building in a Subtropical Climate. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 16(3) : 380-388.
37. Gouvernement du Québec. 2011. Guide de qualité de l'air intérieur dans les établissements du réseau de la santé et des services sociaux. Consulté en mars 2015 et disponible sur : <http://publications.msss.gouv.qc.ca/msss/fichiers/2011/11-610-05W.pdf>
38. Lavoie, J., Lazure, L. 1994. Guide de prévention contre la prolifération microbienne dans les systèmes de ventilation. Montréal : IRSST, Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec. Consulté en septembre 2014 et disponible sur : <https://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/RG-088.pdf>
39. Burge, H. A., Solomon, W. R., and Boise, J. R. 1980. Microbial Prevalence in Domestic Humidifiers. *Applied and Environmental Microbiology*. 39(4) : 840-844.
40. Mendell, M. J., and Smith, A. H. 1990. Consistent Pattern of Elevated Symptoms in Air-Conditioned Office Buildings: a Reanalysis of Epidemiologic Studies. *American Journal of Public Health*. 80(10) : 1193-1199.

41. Krauter, P., and Biermann, A. 2007. Reaerosolization of Fluidized Spores in Ventilation Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(7) : 2165-2172.
42. Wang, S., Zhao, B., Zhou, B., and Tan, Z. 2012. An Experimental Study on Short-time Particle Resuspension from Inner Surfaces of Straight Ventilation Ducts. *Building and Environment*. 53 : 119-127.
43. Lavoie, J., Bahloul, A., Cloutier, Y., and Gravel, R. 2010. Cleaning Initiation Criteria for Heating, Ventilation and Air Conditioning (HVAC) Systems in non-Industrial Buildings. *ASHARE Transactions*. 116 : 1-7.
44. Lavoie, J., Marchand, G., Cloutier, Y., and Lavoué, J. 2011. Validation of the Criteria for Initiating the Cleaning of Heating, Ventilation, and Air-Conditioning (HVAC) Ductwork under Real Conditions. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 8(8) : 467-472.
45. Adhikari, A., Martuzevicius, D., Reponen, T., Grinshpun, S. A., Cho, S., Sivasubramani, S., et al. 2003. Performance of the Button Personal Inhalable Sampler for the Measurement of Outdoor Aeroallergens. *Atmospheric Environment*. 37: 4723–4733.
46. Reponen, T., Singh, U., Schaffer, C., Vesper, S., Johansson, E., Adhikari, A., ... and LeMasters, G. 2010. Visually Observed Mold and Moldy Odor versus Quantitatively Measured Microbial Exposure in Homes. *Science of the Total Environment*. 408(22) : 5565-5574.
47. Liu, C. M., Kachur, S., Dwan, M. G., Abraham, A. G., Aziz, M., Hsueh, P. R., ... & Keim, P. 2012. FungiQuant: a Broad-Coverage Fungal Quantitative Real-time PCR Assay. *BMC Microbiology*. 12(1) : 1.
48. Janke, T., Schwaiger, K., Ege, M., Fahn, C., von Mutius, E., Bauer, J., and Mayer, M. 2013. Analysis of the Fungal Flora in Environmental Dust Samples by PCR–SSCP Method. *Current Microbiology*. 67(2) : 56-169.
49. Manter, D. K., and Vivanco, J. M. 2007. Use of the ITS Primers, ITS1F and ITS4, to Characterize Fungal Abundance and Diversity in Mixed-Template samples by qPCR and Length Heterogeneity Analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 71(1) : 7-14.
50. Elías, N. A., Cuestas, M. L., Sandoval, M., Poblete, G., Lopez-Daneri, G., Jewtuchowicz, V., ... and Mujica, M. T. 2012. Rapid Identification of *Histoplasma Capsulatum* Directly from Cultures by Multiplex PCR. *Mycopathologia*. 174(5-6) : 451-456.

51. Wu, Z., Wang, X. R., and Blomquist, G. 2002. Evaluation of PCR Primers and PCR Conditions for Specific Detection of Common Airborne Fungi. *Journal of Environmental Monitoring*. 4(3) : 377-382.
52. Hospodsky, D., Yamamoto, N., and Peccia, J. 2010. Accuracy, Precision, and Method Detection Limits of Quantitative PCR for Airborne Bacteria and Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(21) : 7004-7012.
53. Zhou, G., Whong, W. Z., Ong, T., and Chen, B. 2000. Development of a Fungus-specific PCR Assay for Detecting Low-Level Fungi in an Indoor Environment. *Molecular and Cellular Probes*. 14(6) : 339-348.
54. Krause, J. D., Hammad, Y. Y., and Ball, L. B. 2003. Application of a Fluorometric Method for the Detection of Mold in Indoor Environments. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 18(7) : 499-503.
55. Schnürer, J. 1993. Comparison of Methods for Estimating the Biomass of three Food-Borne Fungi with Different Growth Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(2) : 552-555.
56. Royster, G. W. and Fish, B. R. 1964. Techniques for Assessing Removable Surface Contamination. In "Surface Contamination" : *Proceedings of a Conference held in Galtinburg Tennessee*. Pergamon Press, Oxford.
57. Hee, S. S. Q., Peace, B., Clark, C. S., Boyle, J. R., Bornschein, R. L., and Hammond, P. B. 1985. Evolution of Efficient Methods to Sample Lead Sources, such as House Dust and Hand Dust, in the Homes of Children. *Environmental Research*. 38(1) : 77-95.
58. Reynolds, S. J., Etre, L., Thorne, P. S., Whitten, P., Selim, M., and Pependorf, W. J. 1997. Laboratory Comparison of Cacuum, OSHA, and HUD Sampling Methods for Lead in Household Dust. *American Industrial Hygiene Association*. 58(6) : 439-446.
59. Wheeler, J. P., and Stanclffe, J. 1998. Comparison of Methods for Monitoring Solid Particulate Surface Contamination in the Workplace. *Annals of Occupational Hygiene*. 42(7) : 477-488.
60. Ashley, K., Applegate, G. T., Wise, T. J., Fernback, J. E., and Goldcamp, M. J. 2007. Evaluation of a Standardized Micro-vacuum Sampling Method for Collection of Surface Dust. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 4(3) : 215-223.

61. Holopainen, R., Asikainen, V., Pasanen, P., and Seppanen, O. L. L. I. 2002. The Field Comparison of Three Measuring Techniques for Evaluation of the Surface Dust Level in Ventilation Ducts. *Indoor Air*. 12(1) : 47-54.
62. Rylander, R., Reeslev, M., and Hulander, T. 2010. Airborne Enzyme Measurements to Detect Indoor Mould Exposure. *Journal of Environmental Monitoring*. 12(11) : 2161-2164.

APPENDICES

Tableau 1A : Masses brutes de poussières mesurées sur la plaque, dans la cassette et sur le filtre par échantillon prélevé

Génération	Échantillon	Plaque (mg)	Cassette (mg)	Filtre (mg)
1	1	28,6	28,2	23,1
	2	33	32,5	29,2
	3	24,1	23,7	15,6
	4	22,5	22,2	18,0
	5	40,3	39,7	35,2
	6	43	42,2	39,2
	7	29,8	29,4	25,6
	8	26,4	26	23,4
	9	83,5	82,4	75,9
	10	80	76,8	69,2
	11	56,9	55,9	48,8
	12	58,8	58,4	50,7
2	13	46,1	45,1	36,8
	14	51	50,1	44,8
	15	37,4	36,5	30,0
	16	34,9	34,6	30,7
	17	61,9	61,7	56,1
	18	69,7	69,2	61,5
	19	42,4	42	34,9
	20	40,3	40,1	32,7
	21	115,2	114	104,5
	22	133	126,3	112,8
	23	87,3	85,9	74,7
3	24	41,1	40,7	35,2
	25	46,4	46,4	38,9
	26	33,4	33,4	27,3
	27	30,3	30,4	22,6
	28	57,7	57,5	50,5
	29	70,4	70	57,2
	30	37,6	37,6	31,3
	31	104,4	103,6	95,2
	32	124,8	121,2	114,6
	33	90,6	90	73,7
	34	75,6	73,4	65,1
4	35	35,1	34,4	22,4
	36	65,7	65	50,7
	37	70,7	69,7	52,8
	38	48,4	48	33,6
	39	43,1	42,7	30,3
	40	109,7	108,6	89,4
	41	144,5	143,4	119,1
	42	94,6	93,8	77,7
	43	77,28	74,2	61,7
5	44	41,4	40	33,4
	45	46,16	46,1	39,2
	46	30,55	29,2	25,3
	47	28,9	25,3	19,4
	48	48,3	47,5	40,6
	49	62,1	59,6	44,9
	50	40,2	38,1	27,4
	51	37,1	36,5	23,9
	52	102,2	97,4	83,2
	53	107	101,3	86,2
	54	66,1	64,6	50,9

Tableau 2A : Nombre de spores ou d'UFC rapportées par chaque méthode analytique par échantillon analysé

Génération	Échantillon	Culture (UFC/100cm ²)	Microscopie (spores/100cm ²)	Dosage NAHA (spores/100cm ²)	PCR (spores/100cm ²)
1	1	1860	1400	384240	12180
	2	2100	1400	628800	24648
	3	1350	1400	1514016	17736
	4	2850	1400	713856	23154
	5	2850	1400	632040	100254
	6	2760	1400	1695228	38070
2	7	2940	1400	980532	89700
	8	4260	1400	816276	28794
	9	3210	1400	1054632	116418
	10	3690	1400	693288	121650
	11	5580	1400	635160	479784
	12	5580	1400	153811	258072
3	13	22200	17505	153811	240318
	14	17790	21180	332892	303918
	15	24600	17955	304824	255474
	16	25350	19800	295464	137676
	17	90000	39150	504780	913338
	18	67500	27630	383952	587058
4	19	2790	7368	1158372	118596
	20	3180	6447	1149048	171966
	21	6600	4145	1401072	182778
	22	6510	3684	1760748	229326
	23	13290	2303	3320436	726672
	24	8100	5987	3011544	842628
5	25	1500	2760	357420	12540
	26	2580	8745	489756	27456
	27	3270	5520	854352	23568
	28	2490	6915	588144	19338
	29	4050	9210	414444	317436
	30	10080	5520	623568	462828
6	31	1080	8750	280392	8076
	32	1200	12894	674688	11112
	33	1740	10592	681180	23634
	34	1530	10592	656556	15408
	35	2760	11052	827184	150810
	36	2310	14736	1069476	197856
7	37	23400	11052	463152	144864
	38	29610	14276	619248	318666
	39	29910	12434	537336	91368
	40	41400	13355	476484	163242
	41	49500	18881	663492	385614
	42	33600	17039	956088	411090
8	43	27990	16118	316056	588858
	44	39990	19341	930312	551130
	45	38010	14276	814248	614508
	46	42990	17499	2294376	866052
	47	35010	13355	769872	1168182
	48	75000	22565	1269624	2736000
9	49	66000	9210	2041224	520194
	50	69000	11520	821352	569214
	51	63990	5520	852744	529974
	52	60000	16125	1452888	784698
	53	60000	16575	1087896	1704000
	54	99000	10590	1068744	924120
10	55	10800	11055	1810536	216102
	56	2790	8295	1008888	36204
	57	10710	10590	2136216	218190
	58	11310	11520	2270544	240348
	59	14430	8745	3413232	382980
	60	16920	9675	4154688	678894

Tableau 3A: Liste des bactéries testées pour l'exclusivité

B26	B133	B164	B173	B183
B95	B145	B165	B174	B239
B98	B150	B166	B175	B240
B102	B152	B167	B176	B243
B103	B155	B168	B177	B245
B125	B158	B169	B178	B250
B127	B159	B171	B180	B255
B128	B161	B172	B181	B306

Banque IRSST

Tableau 4A : Liste des moisissures testées pour la spécificité

B135*	M147	M227	M267	M303	M346	M368
M23	M178	M230	M274	M304	M350	M369
M40	M186	M237	M281	M307	M359	M370
M55	M200	M245	M282	M308	M361	M371
M65	M204	M252	M287	M336	M362	M372
M78	M220	M253	M290	M339	M363	M374
M101	M221	M254	M291	M343	M364	
M140	M225	M257	M301	M344	M365	

Banque IRSST