

É

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-677



Travailleurs exposés aux fluides de coupe de métaux

**Évaluation de l'exposition aux bioaérosols
et effets sur la santé respiratoire et cutanée
(version révisée)**

*Caroline Duchaine
Yvon Cormier
Yan Gilbert
Marc Veillette
Jacques Lavoie*

*Anne Mériaux
Christine Touzel
Denis Sasseville
Yves Poulin*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

travaillent pour vous !

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.

De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement.
www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST.
Abonnement : 1-877-221-7046

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales
2011
ISBN : 978-2-89631-544-4 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
avril 2011

Substances chimiques et agents biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-677

Travailleurs exposés aux fluides de coupe de métaux

Évaluation de l'exposition aux bioaérosols et effets sur la santé respiratoire et cutanée (version révisée)

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Caroline Duchaine¹, Yvon Cormier¹, Yan Gilbert¹,
Marc Veillette¹, Jacques Lavoie², Anne Mériaux¹,
Christine Touzel¹, Denis Sasseville³, Yves Poulin¹*

¹Centre de recherche de l'IUCPQ

²Service de la recherche, IRSST

³Hôpital Royal Victoria

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

Cette étude a été financée par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSST

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs désirent exprimer leur gratitude envers les usines et les travailleurs ayant accepté de participer à cette étude. De sincères remerciements vont aussi aux infirmières de recherche Mylène Duchaine et Johanne Talbot pour la saisie des informations et des échantillons sur les volontaires et à Yves Beudet et Claude Létourneau, techniciens à l'IRSST. Nous remercions aussi la contribution de Serge Simard, biostatisticien pour l'analyse statistique des données et pour son support analytique.

Yan Gilbert a reçu une bourse du programme de formation en santé respiratoire du FRSQ (2005-2006). Caroline Duchaine est chercheur-boursière Junior 2 du FRSQ et est membre du Réseau en santé respiratoire du FRSQ.

SOMMAIRE

Certains problèmes respiratoires sont observés chez les machinistes travaillant avec des fluides de coupe solubles (FC). Ces problèmes pourraient être reliés aux aérosols contenant des microorganismes présents dans les systèmes de FC. Pour mieux comprendre les effets de ces aérosols sur la santé humaine, l'environnement de travail doit être caractérisé. Nous avons détaillé la flore microbienne des FC ainsi que celle de l'air, les brouillards d'huile, les poussières inhalables et les endotoxines de 44 sites d'usinage répartis dans 25 usines du Québec. La PCR quantitative a été utilisée afin de dénombrer les bactéries totales ainsi que les mycobactéries de l'espèce *Mycobacterium immunogenum* alors que la technique du PCR DGGE a été employée afin de décrire la biodiversité microbienne présente dans les différents échantillons. Une investigation de la santé des travailleurs œuvrant dans ces environnements a été réalisée. Les participants se sont soumis à une prise de sang veineux et à une mesure de spirométrie. Un questionnaire portant sur la santé respiratoire et cutanée des travailleurs leur a été soumis. Les concentrations de microorganismes dans l'air variaient de $1,2 \times 10^1$ à $1,5 \times 10^5$ UFC/m³ (unités formatrices de colonies/m³) alors que nous avons observé des concentrations de bactéries allant jusqu'à $2,4 \times 10^9$ UFC/ml dans les échantillons de FC. Les poussières inhalables variaient de < 0,1 à 2,6 mg/m³. Seulement neuf sites respectaient les recommandations en ce qui a trait aux changements d'air/heure qui variaient de 0,6 à 14,3 changements/heure pour les 44 sites. Les mesures de brouillards d'huile étaient entre 0,02 et 0,89 mg/m³ soit sous les valeurs limites recommandées par le RSST de 5 mg/m³. Les dosages d'endotoxines dans l'air variaient d'indétectables à 183 unités d'endotoxines (UE)/m³ ne démontrant de corrélations ni avec les microorganismes dans l'air ni avec les poussières inhalables. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* a été l'espèce microbienne retrouvée le plus fréquemment et en concentrations considérables. Les différentes données obtenues démontrent qu'il n'y a pas d'évidence de pathologie respiratoire et/ou cutanée attribuable à l'environnement de travail des travailleurs de l'étude.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Population touchée et problématique.....	1
1.2 FC et contamination microbienne	1
1.3 Maladies respiratoires	2
1.4 Maladies cutanées	5
1.5 Résultats préliminaires.....	5
1.6 État des connaissances scientifiques ou techniques sur le sujet.....	6
1.7 Contamination microbienne et toxicité des FC	6
1.8 Analyse microbiologique des FC	7
1.9 Méthodes alternatives à la culture pour l'étude des microorganismes des FC: écologie microbienne moléculaire.....	7
1.10 Fondements.....	7
1.11 Hypothèses	9
1.12 Objectifs	10
2. METHODOLOGIE.....	11
2.1 Visite des usines.....	11
2.2 Collecte des échantillons.....	11
2.2.1 Échantillons FCM	11
2.2.2 Échantillons d'eau.....	11
2.2.3 Échantillons d'air	11
2.2.4 Poussières inhalables	12
2.2.5 Endotoxines.....	12
2.2.6 Brouillards d'huile	12
2.2.7 Changements d'air	12
2.2.8 Particules aéroportées	13

2.3	Identification des isolats	13
2.4	Quantification des bactéries et <i>M. immunogenum</i>	14
2.5	Analyse DGGE de la biodiversité	15
2.6	Analyse de la santé des travailleurs :	15
2.6.1	Santé respiratoire	15
2.6.2	Santé cutanée	16
2.7	Analyse statistique	16
3.	RÉSULTATS.....	17
3.1	Profil des usines.....	17
3.2	Types de fluides de coupe utilisés aux différents sites d'usinage à l'étude.	18
3.3	Résultats analyses microbiologiques et biodiversité des fluides	19
3.3.1	Concentrations de bactéries totales dans les fluides	19
3.3.2	Identification des isolats	23
3.3.3	Analyse des profils DGGE.....	23
3.4	Caractérisation de l'air ambiant	25
3.4.1	Bactéries dans l'air.....	28
3.4.2	Moisissures dans l'air	31
3.4.3	Changements d'air	31
3.4.4	Poussières inhalables	31
3.4.5	Diamètre aérodynamique des particules	31
3.4.6	Quantification des endotoxines.....	32
3.4.7	Brouillards d'huile	32
3.5	Analyse de la santé des travailleurs.....	32
3.5.1	Profil des travailleurs	32
3.5.2	Questionnaire	33
3.5.3	Mesure d'anticorps	34
3.5.4	Spirométrie.....	36
4.	DISCUSSION.....	39
4.1	Biodiversité des fluides	39
4.2	Caractérisation de la qualité de l'air.....	40
4.2.1	Bactéries dans l'air.....	40
4.2.2	Moisissures dans l'air	41
4.2.3	Poussières inhalables	42
4.2.4	Diamètre aérodynamique des particules	42

4.2.5	Mesures d'endotoxines dans l'air	43
4.2.6	Brouillards d'huile	44
4.3	Santé respiratoire des travailleurs	45
4.4	Questionnaire	46
4.5	Spirométrie et exposition.....	46
4.6	Santé cutanée.....	46
5.	CONCLUSION	48
6.	APPLICABILITÉ DES RÉSULTATS	49
7.	RETOMBÉES ÉVENTUELLES	51
8.	LISTE DES ARTICLES ET DES COMMUNICATIONS	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Résumé des études relatant des cas de maladies respiratoires dans les usines où des FC sont utilisés

Tableau 2: Amorces et sondes utilisées dans cette étude

Tableau 3: Description des usines visitées lors de l'étude

Tableau 4: Identification des fluides utilisés aux différents sites à l'étude

Tableau 5 : Concentrations de bactéries obtenues en PCR quantitative et en culture pour les fluides de coupe échantillonnés à chacun des sites à l'étude. La concentration de moisissures de type *Fusarium* est aussi notée lorsque cette espèce était présente. L'identification par affiliations au microorganisme le plus proche est notée de même que le nombre de paires de bases utilisées pour réaliser l'identification et le pourcentage de similarité

Tableau 6: Affiliation des différents ribotypes retrouvés dans les profils DGGE réalisés avec les échantillons de fluides de coupe

Tableau 7: Caractérisation des aérosols aux différents sites d'usinage

Tableau 8: Fréquence et affiliation des isolats de bactéries aéroportées issues des échantillons d'air des ateliers d'usinage

Tableau 9: Symptômes respiratoires actuels chez les travailleurs

Tableau 10: Symptômes liés au travail chez les travailleurs

Tableau 11: Toux chez les travailleurs

Tableau 12: Impact dermatologique chez les travailleurs (Problèmes aux doigts, mains, poignets avant-bras ou visage)

Tableau 13: Protections cutanées utilisées

Tableau 14 : Cotes d'anticorps pour les différents pathogènes, travailleurs vs témoins

Tableau 15 : Valeurs de spirométrie selon les divisions territoriales effectuées

Tableau 16 : Corrélation de Spearman entre les valeurs de spirométrie et les décomptes des bioaérosols

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dendrogramme généré à partir de profils DGGE des échantillons de fluide de coupe de métaux, basé sur un index de corrélation de Pearson et UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages).

Figure 2: Fractions des concentrations de particules totales dans l'air pour chaque intervalle de grosseurs aérodynamiques mesurées à l'aide du conteur de particules MetOne

Figure 3 : Relation entre les concentrations de bactéries cultivables trouvées dans l'air et les bactéries totales dans les FC quantifiées par PCR quantitative

Figure 4 : Comparaison entre les concentrations de poussières inhalables en fonction des différents types d'équipement utilisés pour la transformation du métal (Tour n=6; Tour numérique n=6; Centre d'usinage n=21; Rectifieuse n=6, Scie n=3).

Figure 5 : Comparaison entre les concentrations d'endotoxines en fonction des différents types d'équipement utilisés pour la transformation du métal (Tour n=6; Tour numérique n=6; Centre d'usinage n=21; Rectifieuse n=6, Scie n=3).

Figure 6 : Comparaison entre les concentrations de brouillards d'huile en fonction des différents types d'équipements utilisés pour la transformation du métal (Tour n=6; Tour numérique n=6; Centre d'usinage n=21; Rectifieuse n=6, Scie n=3).

1. INTRODUCTION

1.1 Population touchée et problématique

Les fluides de coupe (FC) de métaux sont utilisés dans les opérations de tournage du métal. Leur utilisation permet d'éviter le réchauffement des pièces, la corrosion ainsi que l'usure des outils. Les FC étant utilisés dans toutes les étapes de transformation du métal et de ses produits dérivés, on peut comprendre que ce genre de fluides est omniprésent dans les petites et grandes industries où l'on pratique des opérations de tournage. Aux États-Unis, on estime à 1,2 million le nombre de travailleurs qui utilisent des FC. Si le nombre de travailleurs qui utilisent des FC est inconnu au Canada, au Québec, la CSST estimait en 2000 ce nombre à près de 8000 travailleurs répartis dans plus de 860 établissements. Au cours des vingt dernières années, de nombreux problèmes de santé ont été rapportés concernant l'exposition directe aux fluides de coupe. Dermatitis de contact, autres éruptions cutanées (Goh, 1994; Grattan, 1989; Hodgson, 1976; Rycroft, 1980; Shvedova, 2001) et cancers (NIOSH, 1998) ont fait l'objet de plusieurs articles scientifiques.

Toutefois, depuis 20 ans, on assiste plutôt à une recrudescence des cas de problèmes de santé respiratoire notamment d'alvéolite allergique extrinsèque (AAE) (MMWR, 1996; Dutkiewicz, 2001; Kennedy, 1989). Peu d'études canadiennes se sont penchées sur les travailleurs des usines de tournage du métal. Les seules études canadiennes publiées se sont intéressées à la santé respiratoire des travailleurs des usines de tournage de métal et sur les brouillards d'huile sans mettre l'emphase sur la contamination microbienne (Kennedy, 1999; Eisen, 2001; Zaka 2003). Au Québec, les seules études publiées s'intéressant à la contamination microbienne des FC ont été effectuées par notre équipe (étude exploratoire-IRSST et *Mycobacterium immunogenum*-Fondation JD Bégin) et aucune étude ne s'est intéressée à l'état de santé respiratoire des travailleurs exposés aux bioaérosols générés lors de l'utilisation de fluides de coupe.

1.2 FC et contamination microbienne

Les FC sont composés principalement d'huile émulsionnée dans de l'eau additionnée d'additifs tels des agents anti-corrosion, anti-moussant, antimicrobiens, etc. Ils représentent une source de nutriment pour les microorganismes. Depuis le début de leur utilisation, la contamination microbienne des fluides de coupe de métaux (FC) préoccupe tant les industries qui les élaborent que celles qui les utilisent. En effet, la croissance microbienne dans un FC a pour effet d'entraîner la perte de ses caractéristiques intrinsèques. Les microorganismes sont susceptibles d'induire une baisse du pH. Certains microorganismes anaérobies, telles les bactéries sulfato-réductrices, génèrent des produits soufrés tel le sulfure d'hydrogène (Burgess, 1995). On observe, chez des fluides contaminés, entre autres une perte de viscosité, une diminution de la résistance thermique ainsi qu'une augmentation de la corrosion et ce, sans parler du risque pour les travailleurs exposés. Les FC à base d'eau ou FC solubles sont les plus propices à la croissance microbienne étant donné leur pourcentage important en eau bio-disponible (a_w). Le tournage implique la génération d'aérosols contaminés par les bactéries et susceptibles d'être inhalés par les travailleurs. De fait, la présence de bactéries a été notée dans la fraction d'aérosols provenant d'un FC supérieure à 2 μm alors qu'elles étaient absentes dans la fraction inférieure à 1 μm (Burgess, 1995).

Les fluides de coupe sont presque toujours colonisés par des bactéries et parfois par des moisissures (Sabina, 1956; Tant, 1956). Bien que cette colonisation soit de notoriété publique, peu d'études à date portent sur la caractérisation microbiologique des FC. L'utilisation massive de biocides est quelquefois suffisante pour contrôler les problèmes de nature physique imputables à la croissance des microorganismes. Depuis la recrudescence de problèmes de santé reliés à l'utilisation de FC, des études ont tenté d'identifier et de quantifier la charge microbienne afin d'identifier des liens cause-à-effet entre la contamination et la croissance microbienne. Des concentrations aussi impressionnantes que 10^7 unités formatrices de colonies (UFC)/ml ont été rapportées et des espèces bactériennes telles *Pseudomonas oleovorans*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus vulgaris* ont été identifiées dans plusieurs études (Bernstein, 1995; Kreiss, 1997; Mattsby-Baktzer, 1989a, 1989b). Ces microorganismes sont, pour la plupart, d'origine environnementale et proviennent de l'eau utilisée comme diluant ou d'autres sources environnementales. Par exemple : *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* et plusieurs *Staphylococcus* sp. et *Micrococcus* sp., sont généralement des bactéries qui proviennent de la flore normale des travailleurs (NIOSH, 1998). Selon Burgess, (1995), lorsque des programmes de contrôle exceptionnels sont appliqués, des concentrations de 5×10^4 UFC/ml sont rencontrées; pour les programmes de contrôle raisonnable, des concentrations de l'ordre de 10^6 UFC/ml sont retrouvées; lorsqu'il n'y a pas de contrôle, les concentrations peuvent atteindre 10^9 UFC/ml. Dans un article de revue publié en février 2004, Gordon affirme que les efforts de recherche doivent se pencher sur les changements dynamiques des contaminants microbiens des FC et que, outre les endotoxines, d'autres agents microbiens seraient responsables des affections chez les travailleurs. Certaines études font état des informations limitées en ce qui a trait aux mesures de bactéries et endotoxines dans l'air et de la relation que ces bioaérosols ont sur la santé des travailleurs (Gordon, 2004; Gorny, 2004).

1.3 Maladies respiratoires

On croit depuis quelques années que les travailleurs manipulant des FC ou étant exposés aux aérosols résultant du tournage sont en contact avec des bactéries du genre *Mycobacterium*. En effet, certaines publications récentes font état de la présence de *Mycobacterium chelonae* et *Mycobacterium immunogenum* dans les fluides de coupe impliqués lors d'éclotions d'alvéolite allergique (Hodgson, 2001; Shelton, 1999; Wallace, 2002; Wilson, 2001). Ces publications ont en commun de tenter de relier la présence de mycobactéries dans les systèmes contenant des FC aux éclotions d'alvéolite allergique sans toutefois se poser de questions sur la façon dont les mycobactéries colonisent les fluides.

L'intérêt porté à l'alvéolite allergique en relation avec l'exposition aux FC est relativement récent. Cette maladie implique une réaction immunologique à un antigène inhalé. Comme une allergie commune, cette pathologie requiert une pré-exposition à l'antigène en question. Généralement, l'alvéolite allergique est causée par l'inhalation de bactéries ou actinomycètes thermophiles et moisissures. Toutefois, bien qu'inhabituelle, la relation entre l'inhalation de mycobactéries et le développement d'une alvéolite allergique a été relatée dans d'autres environnements que les ateliers de tournage (Embil, 1997; Kahana, 1997).

On rapporte six cas d'alvéolite allergique confirmés à l'aide de biopsies pulmonaires (MMWR, 1996). Cette étude visait des travailleurs du milieu automobile et ce, dans trois ateliers différents. Dans tous les cas, les problèmes respiratoires symptomatiques et périodiques étaient relatés chez les travailleurs utilisant des FC solubles à leur poste de travail.

Suite aux résultats publiés par Bernstein et collaborateurs (1995), une étude plus vaste subventionnée par UAW-Daimler Chrysler a été entreprise. Les travaux de Kreiss et Cox-Ganser (1997) rapportaient un suivi de 8 ateliers d'usinage en industrie automobile. Lors de ce suivi, 98 cas d'alvéolite allergique ont été décrits. Trois conclusions générales peuvent être tirées de l'étude de Kreiss.

- Un risque d'alvéolite allergique est associé à l'utilisation de FC solubles si ces derniers sont contaminés par une flore microbienne prédominante indésirable (mycobactéries).
- La plupart des cas rapportés sont apparus chez des travailleurs exposés à des concentrations de FC aérosolisés inférieures à 0,5 mg/m³ d'air (valeur de référence américaine-NIOSH).
- Un agent pouvant causer l'alvéolite allergique a été retrouvé dans quatre des six ateliers testés (2 ateliers n'ont pas été testés). Il s'agissait ici d'une mycobactérie : *Mycobacterium chelonae*.

Jusqu'à récemment, les cas d'alvéolite allergique pouvaient sembler relativement inhabituels. Toutefois, cette maladie n'a pas été systématiquement étudiée chez les travailleurs exposés aux FC. L'émergence récente de cas diagnostiqués dans les usines utilisant des FC solubles stimule la recherche dans ce domaine. Il est possible que l'alvéolite allergique soit présente chez certains travailleurs exposés aux FC mais qu'elle n'ait jamais été diagnostiquée parce qu'elle est difficile à déceler et est souvent confondue avec d'autres maladies aux symptômes similaires (infections respiratoires, influenza). La seule solution lors de la détection d'alvéolite allergique est le retrait du milieu de travail (contact avec l'antigène). Parfois un traitement aux corticostéroïdes est nécessaire. Des séquelles irréversibles peuvent toucher les personnes atteintes d'alvéolite allergique, même si cette affection évolue à bas bruit (Lancette, 1993).

En 2003, O'Brien et collaborateurs ont mis en évidence que l'incidence des cas d'alvéolite allergique dans une usine était directement reliée avec le taux d'exposition des travailleurs. En effet, trois zones de contaminations différentes furent identifiées dans cette usine soit : faible (0-100 µg huile/m³), moyenne (100-200 µg huile/m³) et élevée (200-300 µg huile/m³). Les incidences de cas d'alvéolite allergique chez les travailleurs en contact avec ces différentes zones étaient respectivement de 4%, 19% et 34% (O'Brien, 2003).

D'autre part, il a été démontré que la plupart des aérosols générés lors des opérations de tournage sont d'un diamètre pouvant atteindre les parties profondes des poumons (Chan, 1990; Thornburg, 2000; Woskie, 1994), que l'exposition aux aérosols des FC amène une baisse des fonctions respiratoires chez les travailleurs (MMWR, 2001; Abrams, 2000; Ameille, 1995; Bukowski, 2003; Oudyk, 2003; Detwiler-Okabawashi, 1996; Eisen, 2001; Gordon, 1999; Greaves, 1997; Robins, 1997) et que les bactéries présentes dans les fluides solubles semblent responsables de ces baisses de fonctions pulmonaires (Bukowski, 2003, Gordon, 2004). Très peu d'information

est disponible quant à la détection préventive de ce genre microbien dans les FC et sur l'impact réel que les mycobactéries peuvent avoir sur la santé respiratoire des travailleurs lors de l'absence d'éclosion d'alvéolite allergique.

En plus des mycobactéries, les impacts de l'exposition continue et massive à d'autres microorganismes tels *Pseudomonas* ont été très peu étudiés. Il est possible que des changements dans la microflore nasale par exemple soient à l'origine d'autres types de problèmes, incluant la propagation de pathogènes opportunistes dans la population. La présence de tels microorganismes dans la flore nasale des travailleurs pourrait ne pas les affecter mais représenter un risque d'infection pour leurs proches telles les personnes âgées et pour une certaine partie de la population au système immun déficient (diabète, personnes atteintes de maladies obstructives chroniques, etc.).

Le tableau suivant résume les connaissances relatives aux cas de problèmes de santé respiratoire dans les usines de tournage en relation avec l'utilisation des FC.

Tableau 1: Résumé des études relatant des cas de maladies respiratoires dans les usines où des FC sont utilisés

Source	Diagnostic*	Commentaires
MMWR, 1996	6 AAE (C) 14 AAE (P)	
Kreiss, 1997	98 AAE (C)	Étude de 8 usines, <i>Mycobacterium sp.</i> majoritairement retrouvé
Freeman, 1998	1 AAE (C)	
Fox, 1999	20 AAE (C) 14 AAE (P) 12 BO (C) 6 AO (C)	Une seule usine à l'étude, exposition à un agent microbien probablement responsable Précipitines positives en présence du FC problématique et négatives avec le fluide non utilisé
Hodgson, 2001	16 AAE (C) 19 AAE (P) 39 avec un désordre pulmonaire	Fluide soluble Difficulté à différencier AO de AAE
MMWR, 2002	2 AAE C 1 AO (C)	Fluide très contaminé par <i>Mycobacterium immunogenum</i>
O'Brien, 2003	30 AAE (C) 14 AO (C) 3BO (C)	Une seule usine avec un fluide contaminé par des mycobactéries
Rosenman, 1997	86 AO (C) 160 AO (P) 120 BO (P)	Sondage dans 45 usines, prévalence plus haute avec FC solubles
Robertson, 1998	20 AO (P)	Causé par un FC soluble
Zacharisen, 1998	7 AAE (C) 12 AO (C) 6 BO (C)	Haut niveau de contamination du FC et de l'air IgG positifs avec FC problématique et avec souches bactériennes isolées

* AAE = Alvéolite allergique, AO = Asthme occupationnel, BO = Bronchite occupationnelle, (C) = Confirmé, (P) = Possible

1.4 Maladies cutanées

Les problèmes cutanés les plus fréquents chez les travailleurs exposés aux huiles de coupe sont la folliculite et la dermatite de contact (Gordon, 2004). Les huiles insolubles sont responsables des folliculites ou « boutons d'huile », alors que les FC hydrosolubles ou synthétiques causent surtout des dermatites de contact (Alomar, 1994). La dermatite peut être irritative, causée par l'effet direct sur le tégument du pH alcalin de l'huile utilisée, ainsi que des agents saponifiants et émulsionnants qu'elle contient. Les parties découvertes sont atteintes, surtout les mains et les avant-bras, mais aussi le visage et le cou lors d'exposition prolongée à des brouillards denses (dermatite aéroportée). Plus rarement, les parties couvertes par des vêtements fortement imbibés de FC seront également affectées. On a longtemps affirmé que la dermatite de contact irritative représentait jusqu'à 80% des cas de dermatite de contact, mais des études plus récentes semblent indiquer que la dermatite allergique serait tout aussi fréquente (Durocher, 1986; Fisher, 1979; Grattan, 1989; Hodgson, 1976).

La dermatite de contact par irritation prédispose à la sensibilisation allergique parce qu'elle compromet la barrière épidermique et permet la pénétration des allergènes (Alomar, 1985). En raison d'un important chevauchement des manifestations cliniques, il est rare que le diagnostic puisse être établi avec certitude par le seul examen physique. À notre connaissance, aucune étude canadienne n'a évalué la prévalence des dermatites de contact causées par les FC chez les machinistes. Sur la base de résultats publiés antérieurement, l'incidence de dermatites de contact pourrait s'établir entre 10% et 30% des travailleurs (Geier, 2003; Goh, 1994).

Cette partie du projet a été rendue possible grâce à la collaboration du Dr Yves Poulin (CHUQ) et du Dr. Denis Sasseville (Hôpital Royal Victoria). En effet, ils ont participé à l'élaboration des questionnaires d'évaluation de la santé dermatologique des travailleurs, à la formation de l'infirmière qui devait rencontrer les travailleurs et à l'analyse des résultats.

1.5 Résultats préliminaires

Une activité exploratoire subventionnée par l'IRSST et menée en 2002 par notre équipe mettait en évidence la contamination microbienne des fluides de coupe de 3 usines du Québec à l'aide de nouveaux outils tels la microscopie à épifluorescence et la détection de mycobactéries par PCR. Des taux très élevés de contamination bactérienne, incluant plusieurs pathogènes, ont été retrouvés dans ces fluides et ce, malgré des systèmes de gestion très rigoureux et sévères.

Une autre étude subventionnée par le Metalworking Fluids Stewardship Group menée au Canada en 2001, entre autres par notre équipe, montrait qu'après vidange, nettoyage et recharge d'un système de FC ayant causé des problèmes de santé respiratoire, les mycobactéries (*Mycobacterium immunogenum*) recolonisaient rapidement le système en question et demeuraient le contaminant majoritaire du nouveau FC utilisé et ce, pendant la durée totale de l'étude. Encore une fois, la démonstration fut faite de l'inefficacité des protocoles de nettoyage et de décontamination et la nécessité de comprendre de façon précoce les facteurs permettant l'apparition et la croissance massive de mycobactéries dans les systèmes de FC dans le but d'empêcher la colonisation des FC par les mycobactéries (Veillette, 2004).

En 2004, grâce à une subvention de la Fondation JD Bégin de la Chaire de pneumologie de l'Hôpital Laval, nous avons mis au point les méthodes de quantification des mycobactéries dans les FC à l'aide de sondes doublement marquées et de PCR quantitative. Nous avons incidemment mis au point les protocoles d'extraction et de purification de l'ADN des échantillons des FC (Veillette, 2005, 2008). L'étude de différents échantillons usés provenant de différentes usines américaines est présentement effectuée puisque nous prenons part à un groupe d'étude (task force) piloté par l'American Standard for Testing and Material (ASTM), qui a pour but de comparer les diverses approches analytiques des mycobactéries dans les FC.

1.6 État des connaissances scientifiques ou techniques sur le sujet

L'exposition aux fluides de coupe de métaux peut causer plusieurs problèmes de santé respiratoire et cutanés. Très peu de données sont disponibles nous permettant de connaître les agents responsables des affections puisque les FC sont des mélanges possédant une écologie microbienne fort complexe mais surtout très peu étudiée. Parmi les FC utilisés couramment, les FC solubles représentent un fort potentiel de risque à la santé. Ces FC supportent une croissance abondante de microorganismes à cause du pourcentage élevé d'eau présente dans l'émulsion. En effet, l'eau étant nécessaire à la croissance microbienne, les huiles insolubles ne représentent pas des milieux aussi propices à la colonisation microbienne. La grande majorité des éclosions d'alvéolite allergique ont été décrites dans des usines utilisant des FC solubles.

1.7 Contamination microbienne et toxicité des FC

L'alvéolite allergique est une maladie allergique granulomateuse abondamment décrite chez les fermiers (Cormier, 1986) et, depuis quelques années, chez les travailleurs notamment ceux utilisant des FC solubles. (Kreiss, 1997; Bernstein, 1995; Hodgson, 2001; Shelton, 1999; Embil, 1997; Fox, 1999; Freeman, 1998). Au cours des 15 dernières années, on répertorie un nombre étonnamment élevé de cas d'alvéolite allergique (Bernstein 1995; Kreiss, 1997; Zacharisen 1998). Cette maladie est associée à une réponse immune à des antigènes environnementaux. Chez les travailleurs atteints, l'agent causal soupçonné est le groupe des mycobactéries. Dans les premières études relatant des cas d'alvéolite allergique dans des usines de tournage du métal, des IgG contre *Pseudomonas fluorescens* avaient été recherchés puisque ce taxon était fréquemment récupéré par culture. *Mycobacterium chelonae* (nommé plus tard *M. immunogenum*) a par la suite été récupéré dans certains fluides associés aux cas d'alvéolite allergique (Kreiss, 1997; Moore, 2000; MMWR, 1996; Shelton, 1999; MMWR, 2001). La présence de mycobactéries dans les FC s'explique par certains facteurs : 1) les mycobactéries sont plus résistantes au chlore que les coliformes et sont retrouvées dans 83-90% des échantillons d'eau potable domestique (Carson, 1988a, 1988b) et 2) *M. chelonae* est résistant à des solutions de 8% de formaldéhyde (Carson, 1978). La cultivabilité de *M. immunogenum* est instable et des résultats différents peuvent être obtenus des échantillons, ce qui laisse supposer que l'état cultivable des mycobactéries est transitoire et varie dans le temps, pour des raisons encore incomprises (Moore, 2000).

1.8 Analyse microbiologique des FC

Lors des premières éclosions, l'agent responsable des cas d'alvéolite allergique était alors inconnu. Les travaux ultérieurs ont démontré que *Mycobacterium immunogenum* (*M. chelonae*) était un agent présent en grande concentration dans les FC incriminés. Cette espèce n'avait jamais été décrite dans les FC, possiblement à cause de la difficulté de recouvrement en culture.

Il est bien connu que la culture microbienne sous-estime le nombre réel de microorganismes présents dans des échantillons environnementaux (Eduard, 1996, 1998). C'est encore plus vrai dans les FC où les mycobactéries peuvent être fortement représentées et où les conditions écologiques (source de carbone, pH, osmolarité) sont difficiles à reproduire en milieu de culture (Mattsby-Baltzer, 1989; Thorne, 1996; Lange, 1997). En fait, la culture permet le recouvrement de la portion cultivable dans les conditions imposées contrairement aux outils tels le compte direct utilisant la microscopie à épifluorescence qui permettent de compter toutes les bactéries présentes (Thorne, 1996; Hobbie, 1977; Lange, 1997; Veillette, 2004). La presque totalité des analyses de FC publiées à ce jour ont utilisé les techniques de culture pour évaluer la microflore des FC usés. Nous avons démontré qu'il existe un large écart entre les concentrations microbiennes récupérées par culture et les comptes en microscopie à épifluorescence (Veillette, 2004).

1.9 Méthodes alternatives à la culture pour l'étude des microorganismes des FC: écologie microbienne moléculaire

Les analyses basées sur l'étude de la biodiversité génétique permettent de décrire l'écologie microbienne présente dans ce genre d'environnement complexe. L'analyse de la diversité des séquences de gènes conservés tels l'ADNr 16S bactérien permet l'étude de la biodiversité sans avoir recours à la culture. Cette analyse de séquences peut être accomplie par différentes approches, notamment le clonage/séquençage post amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou par analyse sur gel de gradient dénaturant (DGGE). Il est aussi possible de quantifier la biomasse microbienne en utilisant la quantification des mêmes gènes (ADN16S/18S). Ces approches alternatives et complémentaires ont permis la description exhaustive de la biodiversité et la quantification de la biomasse dans d'innombrables environnements. À ce jour, ce genre d'analyses moléculaires n'avait jamais été utilisé pour l'étude des bioaérosols de FC ou des FC eux mêmes.

1.10 Fondements

Nous savons qu'une grande quantité d'aérosols est générée lors des opérations de tournage et que l'exposition à ces aérosols peut entraîner une diminution des fonctions respiratoires et, dans certaines conditions, la présence de mycobactéries peut induire des problèmes pulmonaires sérieux telle l'alvéolite allergique extrinsèque. Il est donc essentiel dans un premier temps d'étoffer les connaissances quant aux causes et aux contrôles de la croissance microbienne dans les systèmes qui utilisent des fluides de coupe.

En parallèle, l'étude des bioaérosols lors des différentes opérations de tournage permettra d'estimer l'exposition des travailleurs à ces derniers. D'autre part, l'évaluation de la santé des travailleurs exposés aux différents FC et l'analyse de leur état de colonisation par les bactéries

nous permettront d'obtenir des réponses concernant l'innocuité des pratiques industrielles actuelles.

Des pistes de solutions quant aux moyens à envisager dans un premier temps pourront aussi être élaborées pour contrôler avec plus d'efficacité la contamination des fluides pour, dans un second temps, évaluer des moyens de réduire l'exposition aux aérosols de FC.

De nombreuses publications ont clairement démontré le pouvoir irritant et allergisant des FC hydrosolubles et synthétiques (De Boer, 1989a, 1989b; Geier, 2003; Grattan, 1989; Gruvberger, 2003; Pryce, 1989a, 1989b; Zissu, 2002). La présence d'une dermatite de contact aura un impact direct sur la qualité de vie du travailleur (Hüner, 1994) en plus d'affecter sa productivité. Elle se traduira souvent par des retraits temporaires ou permanents du travail, avec des conséquences économiques non négligeables pour le travailleur affecté, l'employeur, le système de santé et la société en général.

1.11 Hypothèses

H1 : Les systèmes de FC sont universellement contaminés par de grandes concentrations de bactéries

H2 : Il est possible de détecter précocement l'apparition de mycobactéries dans les systèmes de FC à l'aide de la PCR quantitative et éviter la contamination massive des systèmes.

H3 : Sachant que des bioaérosols sont générés lors des opérations de tournage impliquant des FC :

H3a : Il est possible d'étudier les bioaérosols avec des méthodes alternatives à la culture (PCR quantitatif) et ainsi qualifier et quantifier les microorganismes.

H3b : La composition quantitative et qualitative des bioaérosols est tributaire de deux variables :

- La nature de la microflore présente dans les FC
- Le type d'opération de tournage effectuée et la ventilation locale ou générale

H4 : Les effets sur la santé respiratoire des travailleurs sont fonction des bioaérosols générés lors des opérations de tournage

H4a : Les travailleurs possèdent des IgG sériques dirigés contre les bactéries du FC (IgG comme mesure d'exposition).

H4c : Les travailleurs exposés à des systèmes de FC contaminés par des mycobactéries sont plus à risque de développer de l'alvéolite allergique.

H5 : Les opérations de tournage exposent les travailleurs au contact cutané direct et aéroporté de FC.

H6 : La dermatite de contact allergique chez les travailleurs exposés aux FC est probablement plus fréquente que ce que l'on soupçonne.

1.12 Objectifs

Comme très peu de données sont disponibles concernant la nature, la grosseur et la quantité des bioaérosols en relation avec les opérations de tournage utilisant des FC et que des problèmes de santé respiratoire liés à l'exposition de bioaérosols contenant des mycobactéries sont de plus en plus fréquents, il est primordial de vérifier les hypothèses à l'aide des objectifs suivants :

A. Analyse des fluides de coupe, des brouillards d'huile et des bioaérosols

- **Objectif A1** : Caractériser les FC en utilisant des méthodes modernes et des méthodes dites traditionnelles de culture sur gélose.
- **Objectif A2** : Caractériser la qualité et la concentration des brouillards d'huile et le nombre de changements d'air frais à l'heure (CAH) avec des méthodes traditionnelles d'hygiène industrielle et des bioaérosols générés lors des opérations de tournage utilisant des FC solubles en utilisant des méthodes non reliées à la culture (microscopie à épifluorescence, PCR-DGGE, biodiversité). Comparer la biodiversité des bioaérosols et des FC entre les usines et selon le type de système (fluide, entretien, biocide, CAH, etc.) et mesurer les endotoxines.
- **Objectif A3** : Identifier les opérations de tournage impliquées dans la génération de bioaérosols et la grosseur des aérosols générés. De plus, déterminer les tâches de travail et les configurations de postes de travail les plus susceptibles de générer des brouillards et des bioaérosols.
- **Objectif A4** : Poursuivre la validation d'une méthode de détection et de quantification précoce de mycobactéries dans les FC à l'aide du PCR quantitatif et des sondes moléculaires fluorescentes. Appliquer cette méthode aux bioaérosols.

B. Santé des travailleurs

- **Objectif B1** : Vérifier l'impact de différentes expositions aux bioaérosols générés lors des opérations de tournage sur la santé respiratoire des travailleurs ainsi que sur la réponse immune de ces derniers.
- **Objectif B2** : Documenter l'étendue de la présence ou l'absence de mycobactéries dans les fluides de coupe et dans les bioaérosols en industries et les taux d'AAE.

Il sera possible de vérifier les hypothèses H5 et H6 par la réalisation des objectifs suivants :

- **Objectif B3** : Identifier les sites, les opérations de tournage et les tâches connexes désignées aux travailleurs qui génèrent une plus grande exposition cutanée.
- **Objectif B4** : Documenter l'étendue de la problématique des dermatites de contact dans la population étudiée et, par extrapolation, dans toute la population des machinistes du Québec.

2. METHODOLOGIE

2.1 Visite des usines

Quarante-quatre sites de travail répartis dans 25 établissements différents furent visités. Les usines étaient établies dans 7 régions administratives différentes de la province de Québec. Les visites furent effectuées en période hivernale entre Octobre 2006 et Avril 2008.

2.2 Collecte des échantillons

2.2.1 Échantillons FCM

Un total de 200ml de FCM était prélevé à l'aide de tubes de type Falcon stériles de 50ml. L'échantillon était prélevé à même le système de distribution des appareils. Dans le but de dénombrer et d'isoler les bactéries mésophiles hétérotrophes, les mycobactéries et les moisissures, des dilutions sériées des FCM étaient étalées sur des milieux tryptic soy agar (TSA, Difco), Middlebrook 7H10 OADC (MBA, BBL) et rose bengal agar (RBA, Difco). Les plaques TSA furent incubées pendant 48 heures à 25°C, les RBA 7 jours et les plaques MBA furent incubées à 30°C dans une atmosphère de 5% CO₂ pendant 21 jours. Des aliquotes (2) de 1,5 ml de FCM furent centrifugés (21 000g, 10 min) et les culots placés à -20°C jusqu'à ce que l'ADN en soit extrait. L'extraction d'ADN fut réalisée à l'aide de colonnes QIAamp DNA minikit (Qiagen) selon les recommandations du manufacturier. L'élution a été faite dans un volume final de 50µl de tampon AE.

2.2.2 Échantillons d'eau

Un échantillon de 1L d'eau servant à réaliser la dilution des FCM était prélevé dans des bouteilles de 250ml stériles. Les bactéries cultivables présentes dans ces échantillons étaient dénombrées en triplicata à l'aide de membranes filtrantes sur lesquelles 100ml d'eau était filtré. Ces membranes étaient déposées sur des milieux tryptic soy agar (TSA, Difco), Middlebrook 7H10 OADC (MBA, BBL) et rose bengal agar (RBA, Difco). Les plaques TSA furent incubées pendant 48 heures à 25°C, les RBA 7 jours et les plaques MBA furent incubées à 30°C dans une atmosphère de 5% CO₂ pendant 21 jours.

2.2.3 Échantillons d'air

Les échantillons d'air furent prélevés à 1m du sol et entre 1 à 2 mètres de la machine à l'étude en poste fixe. Les bactéries aérobies hétérotrophes aéroportées viables furent capturées en duplicata en utilisant des impacteurs Andersen 6 étages et des milieux de culture TSA, alors que des milieux RBA furent utilisés en parallèle afin de quantifier et d'isoler les moisissures viables. L'échantillonnage était réalisé à un débit de 28,3L d'air/min. Les débits des pompes ont été mesurés avant et après les périodes d'échantillonnage. Lors du retour au laboratoire, les géloses TSA et RBA étaient incubées à 25°C pendant 48 heures et 7 jours respectivement. Entre 5 et 10 colonies étaient isolées pour caractérisation future.

2.2.4 Poussières inhalables

Les poussières inhalables étaient mesurées en triplicata en utilisant des cassettes IOM (SKC) pré-pesées munies de filtres en polyvinylcarbonate (PVC) de 25mm. L'IOM était relié à une pompe Gilair5 (Levitt-Sécurité Limitée) réglée à un débit de 2L d'air/min pendant 120 min. La calibration était effectuée à l'aide d'un débitmètre DryCal 2 (Bios International Corp.). Après l'échantillonnage, les cassettes étaient gardées sur glace jusqu'au retour au laboratoire. Après conditionnement, les cassettes étaient pesées sous atmosphère contrôlée pour éviter une réhydratation. Des cassettes contrôles furent apportées aux différents sites à l'étude sans être échantillonnées et pesées en suivant la même procédure.

2.2.5 Endotoxines

Des filtres de fibres de verres de 37mm (SKC) installés dans les cassettes fermées furent utilisés pour réaliser les mesures d'endotoxines dans l'air. Les cassettes étaient reliées à une pompe Gilair5 (Levitt-Sécurité Limitée) réglée à un débit de 2L d'air/min pendant 120 min. La calibration était effectuée à l'aide d'un débitmètre DryCal 2 (Bios International Corp.). La préparation consistait en l'extraction du contenu du filtre dans 20ml de solution saline (NaCl 0.9%) stérile apyrogène additionnée de 0,025% de tween 20 vortexé pendant 60 minutes. La suspension était alors centrifugée (500g, 10 min) pour retirer les débris de fibres de verre. Les endotoxines contenues dans le surnageant étaient quantifiées par l'utilisation du test LAL (limulus amebocyte lysate) chromogénique (Associates of Cape Cod, Woods Hole, MA). Des endotoxines d'*E. coli* O113 :H10 étaient utilisées comme standard. Des filtres contrôles furent apportés aux différents sites à l'étude sans être échantillonnés et traités en suivant la même procédure.

2.2.6 Brouillards d'huile

Les brouillards d'huile furent mesurés à l'aide de la méthode IRSST 365-1, en utilisant un filtre 37mm de Téflon® (SKS) pré-pesé avec une porosité de 2,0µm dans une cassette fermée. Les cassettes étaient reliées à une pompe Gilair5 (Levitt-Sécurité Limitée) réglée à un débit de 2L d'air/min pendant 8 heures. La calibration était effectuée à l'aide d'un débitmètre DryCal 2 (Bios International Corp.). Les brouillards d'huile étaient alors quantifiés par gravimétrie. La limite de détection était de 50µg. Des filtres contrôles ont également été apportés sur les sites et traités suivant les mêmes procédures.

2.2.7 Changements d'air

Pour chaque site échantillonné, une mesure des changements d'air intérieur a été effectuée. L'utilisation d'un gaz traceur (SF₆) couplée à la procédure proposée par l'ASTM (Concentration Decay Method) (ASTM, 1993). Quatre points d'échantillonnage par zone furent choisis et les concentrations de SF₆ furent évaluées à l'aide d'un chromatographe portatif model 101 (Lagus Applied Technology, San Diego, CA).

2.2.8 Particules aéroportées

Les particules aéroportées furent quantifiées par l'utilisation d'un APC (Aerodynamic Particle Counter) Met One 3313 (Met One Instrument) pour une journée complète. L'échantillonnage fut effectué en triplicata à raison de 30 minutes d'échantillonnage et 10 minutes de délai entre chaque prise.

2.3 Identification des isolats

Les souches bactériennes isolées à partir des FCM et des échantillons d'air furent mises en culture pendant 48 heures dans 5 ml de milieu de culture Tryptic soy broth (TSB, Difco) à 25°C. L'ADN de ces souches fut conservé sur des cartes Whatman FTA (Whatman) à température pièce en suivant les instructions du manufacturier, il en fut de même pour la purification de l'ADN à l'aide du tampon de purification FTA.

Le gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées fut amplifié par PCR à l'aide des amorces 63f et 1387r (tableau 2). Les conditions PCR utilisées étaient les mêmes que celles publiées par Marchesi et collaborateurs (Marchesi, 1998). Les produits d'amplification furent visualisés sur gel d'agarose 0,8%. Les amplicons furent séquencés par le service de séquençage du CHUL (Centre de recherche du CHUL, Québec, Canada) à l'aide de l'amorce 63f.

Les moisissures isolées sur Rose Bengal Agar (RBA) étaient identifiées directement au genre par observations microscopiques des caractères morphologiques.

Chaque séquence d'ADN fut comparée aux séquences disponibles dans la base de données Genbank à l'aide de l'outil de recherche BlastN (Altschul, 1990) de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). L'affiliation des isolats fut déterminée en lien avec la similarité des séquences.

Tableau 2: Amorces et sondes utilisées dans cette étude

Amorces	Cible	Séquence	Références
63f	Bactéries 16S ADNr	5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	(Marchesi, 1998)
1387r	Bactéries 16S ADNr	5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'	(Marchesi, 1998)
341fa	Bactéries 16S ADNr	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	(Muyzer, 2004)
518r	Bactéries 16S ADNr	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	(Muyzer, 2004)
907r	Bactéries 16S ADNr	5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'	(Yu, 2004)
pMycImmF	<i>M. immunogenum</i> 16S ADNr	5'-GGG GTA CTC GAG TGG CGA AC-3'	(Veillette, 2005)
pMycImmR	<i>M. immunogenum</i> 16S ADNr	5'-GGC CGG CTA CCC GTT GTC-3'	(Veillette, 2005)
pMycImmP	<i>M. immunogenum</i> 16S ADNr	5'-FAM-CCG CAT GCT TCA TGG TGT GTG GT-3'-BHQ-1	(Veillette, 2005)
EUBf	Bactéries 16S ADNr	5'-GGT AGT CYA YGC MST AAA CG-3'	(Bach, 2002)
EUBr	Bactéries 16S ADNr	5'-GAC ARC CAT GCA SCA CCT G-3'	(Bach, 2002)
EUBp	Bactéries 16S ADNr	5'-FAM-TKC GCG TTG CDT CGA ATT AAW CCA C-3'-IBTMFQ	(Bach, 2002)

^a A pince-GC attaché à l'extrémité 5' de l'amorce sens
5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG-3' (Muyzer, 1993)

FAM, 6-carboxyfluoresceïn
BHQ-1 et IBTMFQ, Black Hole Quencher-1 et Iowa Black Fret Quencher (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA).

^b Toutes les amorces utilisées dans cette étude provenaient du fournisseur IDT (Coralville, IA, USA).

2.4 Quantification des bactéries et *M. immunogenum*

La quantification par PCR en temps réel fut réalisée sur une plateforme MJR Option 2 (Bio-Rad). Les gènes codant pour l'ARNr 16S furent utilisés comme cibles en utilisant les amorces EUBf et EUBr ainsi que la sonde fluorescente EUBp (tableau 2). Les conditions PCR furent décrites par Bach et collaborateurs (Bach, 2002). Une courbe étalon construite à l'aide d'un vecteur plasmidique comportant un fragment (1320pb) du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli* ATCC 25922 était utilisée pour réaliser la quantification.

La quantification de *Mycobacterium immunogenum* fut réalisée en utilisant la même cible en utilisant les amorces pMycImmF, pMycImmR et la sonde pMycImmP (tableau 2). Selon les conditions publiées par Veillette et collaborateurs (2005). Une courbe étalon construite à l'aide d'un vecteur plasmidique comportant un fragment (1320pb) du gène de l'ARNr 16S de *Mycobacterium immunogenum* était utilisée pour réaliser la quantification.

2.5 Analyse DGGE de la biodiversité

Les régions variables V3 à V5 du gène codant pour l'ARNr 16S furent amplifiées par PCR (586pb) en utilisant les amorces GC-341f et 907r (tableau 2). Selon les conditions PCR publiées par Yu et Morrisson (2004). Après visualisation des amplicons sur gel d'agarose 1,5%, la quantité d'ADN générée était estimée à l'aide d'un standard moléculaire EZ Load Precision Molecular Mass Ruler (Bio-Rad) et du logiciel Gene Tools (SynGen).

Les profils DGGE furent produits selon la méthode décrite par Muyzer et collaborateurs (1993) en utilisant un appareil Dcode (Bio-Rad). 100ng de produit PCR furent déposés sur un gel de polyacrylamide, 0.5X TAE ayant un gradient dénaturant de 30-55% (100% étant 7 mol/L d'urée et 40% v/v formamide). L'électrophorèse fut réalisée dans un tampon TAE 0.5X à 60V pendant 16 heures à 60°C. Les fragments d'ADN furent colorés pendant 15 minutes avec le fluorochrome SybrGold (Invitrogen) et visualisés à l'aide d'un appareil Chemigenius 2Xe (SynGen). Les bandes d'ADN présentes furent prélevées et ré-amplifiées par PCR en utilisant les amorces 341f et 907r (tableau 2) avant d'être envoyées au séquençage.

Le logiciel Fingerprinting II Informatix Software ver 3.0 (Bio-Rad) fut utilisé pour normaliser et comparer tous les profils obtenus. Pour ce faire, un standard moléculaire fut utilisé en utilisant une tolérance de 1% relative à la position des bandes. La similitude entre les différents profils a été calculée en utilisant un coefficient de corrélation de Pearson et le regroupement a été fait en utilisant la méthode UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages).

La séquence de chaque bande DGGE prélevée dans les gels fut comparée aux séquences disponibles dans la base de données Genbank à l'aide de l'outil de recherche BlastN (Altschul, 1990) de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). L'affiliation des isolats fut déterminée en lien avec la similarité des séquences.

2.6 Analyse de la santé des travailleurs :

2.6.1 Santé respiratoire

Tous les travailleurs qui ont pris part à l'étude ont été invités à signer un formulaire de consentement. Afin de dresser un portrait adéquat de la santé de ces derniers, celle-ci a été évaluée selon plusieurs approches différentes.

Un questionnaire sur la santé a été administré à chacun des participants et incluait des questions sur leur profil, leur histoire tabagique, leurs antécédents ainsi que leurs différents symptômes

respiratoires. Pour l'évaluation de leurs fonctions pulmonaires, une spirométrie a été effectuée par chacun des participants. De plus, lors de leur rencontre avec l'infirmière de recherche, les travailleurs ont été examinés afin d'éliminer la présence de bruits pulmonaires adventices.

À partir du questionnaire, le calcul du risque relatif de bronchite chronique dû au tabagisme a été effectué. Ce dernier correspond à l'incidence chez les personnes exposées/l'incidence des personnes non exposées.

Finalement, une ponction veineuse a été effectuée afin de documenter l'inflammation par la mesure des anticorps (IgG). Les IgG sont considérées comme des marqueurs d'exposition et sont utilisées dans le diagnostic de l'alvéolite allergique. La mesure de ces immunoglobulines a été effectuée tel que décrit dans une étude précédente (Cormier, 1998). La mesure sérique des IgG a été testée contre 2 espèces de *Fusarium*, 2 espèces de mycobactéries et 1 espèce de *Pseudomonas* fréquemment retrouvées dans les fluides de coupe et l'environnement des travailleurs. D'autre part, afin d'établir une corrélation véritable entre la réponse immune et le milieu de travail, un groupe contrôle de participants non exposés aux fluides de coupe et vivant dans la même région fut évalué. La positivité de la réaction des travailleurs fut évaluée en comparaison avec la réponse des témoins non-exposés et la réaction d'un témoin positif en calculant le % de la réaction du travailleur et des témoins par rapport à la réaction de notre témoin positif. Ainsi, selon le % de réactivité par rapport au témoin positif, des cotes ont été attribuées (de 1 à 4). Les travailleurs cotés 1 furent regroupés avec les négatifs et seuls les travailleurs cotés de 2 à 4 furent retenus dans le groupe de positifs.

Selon les résultats obtenus aux différents examens, le travailleur pouvait être invité à rencontrer son médecin traitant ou à participer à un complément d'investigation à l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (UICPQ).

2.6.2 Santé cutanée

Le questionnaire-santé rempli par les travailleurs comprenait une deuxième section sur la santé cutanée. Les travailleurs ont également subi une évaluation cutanée, effectuée par l'infirmière de recherche, des parties du corps découvertes au travail (mains, avant-bras, visage, cou). Des photos des lésions suspectes ont été prises et communiquées aux dermatologues responsables de l'étude pour juger si ces lésions étaient susceptibles d'être attribuées au travail ou pas. Selon les résultats obtenus, le travailleur pouvait être invité à consulter son médecin pour un complément d'investigation.

2.7 Analyse statistique

La représentation des mesures centrales des données a été faite en utilisant la moyenne \pm l'écart-type. La comparaison entre les groupes a été faite par une analyse de la variance. La technique de Tukey a été utilisée pour les comparaisons a posteriori entre les groupes. Le niveau de significativité fut établi à $P < 0,05$. L'homogénéité des variances fut analysée à l'aide du test statistique de Levene. L'ajustement de Satterthwaite a été utilisé dans les cas où les variances étaient significativement inégales. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel JMP, version 7.0.1 (SAS Institute Inc. Cary, N.C.).

3. RÉSULTATS

3.1 Profil des usines

Les 25 usines sélectionnées étaient réparties dans 7 régions du Québec. La majorité était des PME sauf les usines 3, 6, 13,17 qui avaient plus de 100 travailleurs. Les détails des entreprises visitées sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Description des usines visitées lors de l'étude

Usine	Ville	MRC	Nombre d'employés évalués
1	Québec	Québec	2
2	Joliette	Lanaudière	7
3	Saguenay	Saguenay	2
4	Joliette	Lanaudière	16
5	Joliette	Lanaudière	9
6	Sorel	Montérégie	7
7	St-Jean-sur-Richelieu	Montérégie	3
8	Québec	Québec	3
9	Québec	Québec	2
10	Québec	Québec	2
11	Québec	Québec	4
12	Québec	Québec	5
13	Montréal	Montréal	71
14	Saguenay	Saguenay	3
15	St-Nicolas	Québec	0
16	Québec	Québec	3
17	Amos	Abitibi-T	1
18	Amos	Abitibi-T	7
19	Roberval	Saguenay	4
20	Lyster	Centre-du-Québec	10
21	Gatineau	Outaouais	13
22	Québec	Québec	21
23	Québec	Québec	3
24	Sorel	Montérégie	3
25	Québec	Québec	8

3.2 Types de fluides de coupe utilisés aux différents sites d'usinage à l'étude.

Les usines visitées utilisaient des types de fluides de coupe de métaux très variés. Parfois, lorsque plusieurs sites d'échantillonnages étaient sélectionnés dans une même usine, différents types de fluides étaient utilisés aux différents sites à l'étude. Le tableau 4 fait état de la liste des fluides rencontrés en cours d'étude, de leur provenance et de leur type.

Tableau 4: Identification des fluides utilisés aux différents sites à l'étude

Site	Fluide	Producteur	Type
1	Cimstar 60C	Milacron	Synthétique
2	Vegetoil	Vulcan Intermac	Minéral/Végétal
3	Blasocut 2000X	Blaser Swisslube	Minéral
4	Unicool	National Chemsearch	Minéral
5	Cimtech 410C	Milacron	Synthétique
6	Chromac 2215	Chromac inc.	Semi-Synthétique
7	Cimstar 60C	Milacron	Synthétique
8	Hocut 795 FD	Houghton	Minéral
9	Hocut 795 FD	Houghton	Minéral
10	Hocut 795 FD	Houghton	Minéral
11	Oracoup 252	Orapi	Semi-Synthétique
12	Oracoup 252	Orapi	Semi-Synthétique
13	Blasocut 2000X	Blaser Swisslube	Minéral
14	Valcool VP700	Valenite	Semi-Synthétique
15	Valcool VP700	Valenite	Semi-Synthétique
16	WS-5050	Rustlick	Minéral
17	Solumag 1000	Magnus	Minéral
18	Solumag 1000	Magnus	Minéral
19	Blasocut 2000X	Blaser Swisslube	Minéral
20	Blasocut 2000X	Blaser Swisslube	Minéral
21	Blasocut 2000X	Blaser Swisslube	Minéral
22	B-Cool 655	Blaser Swisslube	Minéral
23	B-Cool 655	Blaser Swisslube	Minéral
24	B-Cool 655	Blaser Swisslube	Minéral
25	Blasocut 2000X	Blaser Swisslube	Minéral
26	WS-5050	Rustlick	Minéral
27	Valcool VP700	Valenite	Semi- Synthétique
28	Valcool VP700	Valenite	Semi- Synthétique
29	Hocut 795 FD	Houghton	Minéral
30	Hocut 795 FD	Houghton	Minéral
31	Cimstar 700	Milacron	Semi- Synthétique
32	Cimstar 700	Milacron	Semi- Synthétique
33	Valcool VP700	Valenite	Semi- Synthétique
34	Valcool VP700	Valenite	Semi- Synthétique
35	Blasocut BC40NF	Blaser Swisslube	Minéral
36	Blasocut BC40NF	Blaser Swisslube	Minéral
37	Blasocut BC40NF	Blaser Swisslube	Minéral
38	Vasco 1000	Blaser Swisslube	Semi- Synthétique
39	Trim C270	Master Chemical Corporation	Synthétique
40	Blasocut 4000 strong	Blaser Swisslube	Minéral
41	Valcool VP700	Valenite	Semi- Synthétique
42	Chemcool 2000		Synthétique
43	Chemcool 2000		Synthétique
44	S500	Hangsterfer's	Minéral

3.3 Résultats des analyses microbiologiques et de la biodiversité des fluides

3.3.1 Concentrations de bactéries totales dans les fluides

La concentration de microorganismes a été évaluée dans 44 FCM différents provenant de 25 ateliers. La culture sur pétri fut utilisée afin de quantifier la charge cultivable de bactéries hétérotrophes aérobies ainsi que la mycobactérie *Mycobacterium immunogenum*. La PCR quantitative a été utilisée afin d'évaluer la quantité de mycobactéries et de bactéries totales. Les amorces et sondes utilisées en PCR quantitatives ont été utilisées avec succès pour quantifier les bactéries totales ($E = 100\%$, $R^2 = 0,990$) ainsi que *Mycobacterium immunogenum* ($E=104\%$, $R^2 = 0,983$). Pour réaliser la quantification, une courbe étalon a été utilisée. Cette dernière était linéaire pour des concentrations de copies du gène codant pour l'ARNr 16S des organismes cibles allant de 10^2 à 10^7 copies par réaction.

Les résultats obtenus en culture et en PCR quantitative sont présentés au tableau 5. Des concentrations importantes de microorganismes furent observées dans la plupart des échantillons avec des concentrations aussi élevées que 10^9 copies du gène ARNr 16S par millilitre de fluide. Les concentrations de bactéries totales variaient d'indétectables à $4,51 \times 10^9$ avec une valeur médiane de $9,23 \times 10^7$ copies du gène ARNr 16S/ml de fluides. Les bactéries cultivables hétérotrophes aérobies obtenues sur milieux TSA montraient les mêmes écarts de concentrations allant d'indétectables à $2,36 \times 10^9$ UFC ml⁻¹, avec une valeur médiane de $3,05 \times 10^7$ UFC ml⁻¹. À l'exception de 3 échantillons, aucune bactérie mésophile n'a pu être mise en culture lorsque les concentrations de bactéries totales étaient sous la barre des 10^5 copies du gène ARNr 16S/ml. Les concentrations de *Mycobacterium immunogenum* étaient significatives seulement dans 2 échantillons récoltés aux sites 6 et 7 provenant du même atelier. Pour ces 2 sites, *M. immunogenum* était le représentant principal de la communauté microbienne présente dans les échantillons.

Tableau 5 : Concentrations de bactéries obtenues en PCR quantitative et en culture pour les fluides de coupe échantillonnés à chacun des sites à l'étude. La concentration de moisissures de type *Fusarium* est aussi notée lorsque cette espèce était présente. L'identification par affiliation au microorganisme le plus proche est notée de même que le nombre de paires de bases utilisées pour réaliser l'identification et le pourcentage de similarité.

Sites	EUB (16S copies ml ⁻¹)	Cultivable (UFC ml ⁻¹)	<i>Fusarium</i> sp. (UFC ml ⁻¹)	DGGE	Affiliation la plus proche	pb	% similarité	
1 1	4,93E+04	2,30E+01		+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> AB194327	931	99,4	
					<i>Microbacterium arborescens</i> AM711565	749	99,7	
2 2	< 167	< 10						
3 3	5,17E+08	2,47E+08		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	699	100	
4 4	9,23E+07	1,65E+07	1,00E+03		<i>Pseudomonas mendocina</i> EU395787	709	99,3	
					<i>Pseudomonas putida</i> FJ472859	699	99,7	
5 5	4,99E+07	1,66E+06		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	699	99,7	
					<i>Acinetobacter woffii</i> FJ544339	591	99,8	
					<i>Pseudomonas mendocina</i> EU395787	699	100	
5 6	1,14E+08 (1,55E+07) ^a	2,27E+06	1,87E+02	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	699	100	
				+	<i>Ochrobactrum</i> sp. DQ486949	719	100	
					<i>Myroides odoratus</i> M58777	699	98,1	
7 7	5,67E+05 (3,49E+05)	< 10	3,00E+00	+	<i>Mycobacterium immunogenum</i> AJ812215	723	100	
				+	<i>Ochrobactrum anthropi</i> FJ374126	690	99,7	
6 8	1,59E+05	1,00E+01		+	<i>Bacillus pumilus</i> FJ549019	699	100	
						<i>Ochrobactrum</i> sp. DQ486949	763	94,4
						<i>Bacillus</i> sp. AY030333	639	99,2
10	2,55E+05	1,33E+01		+	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> DQ870759	699	99,4	
7 11	7,53E+06	8,00E+05		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	699	100	
				+	<i>Bacillus pumilus</i> FJ549019	699	99,9	
12	1,77E+08	9,05E+06		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	729	99,6	
8 13	6,95E+07	3,87E+07	2,00E+01	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	709	99,9	
					<i>Shewanella putrefaciens</i> CP000681	699	99,0	

9	14	1,42E+08	9,30E+06	2,50E+02		<i>Pseudomonas stutzeri</i> AF237677 <i>Pseudomonas putida</i> EU439423	713 699	99,3 99,9					
	15	9,56E+03	< 10										
10	16	2,50E+08	4,07E+06	1,00E+03		<i>Shewanella putrefaciens</i> DQ986382	667	100					
					+	<i>Comamonas aquatica</i> FJ544370	700	99,7					
						<i>Pseudomonas mendocina</i> DQ178225	709	98,9					
					+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771 <i>Acidovorax</i> sp. AJ277707	689 743	99,4 97,9					
11	17	1,07E+08	5,17E+08	3,00E+03		<i>Citrobacter freundii</i> FJ544405	709	99,6					
						<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EU034540	729	99,2					
						<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	699	99,0					
						<i>Shewanella putrefaciens</i> CP000681	940	98,2					
	18	6,89E+06	2,23E+03	2,00E+02	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	699	99,7					
12	19	4,24E+08	3,90E+08	3,00E+00	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	713	99,9					
						<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	737	99,7					
					+	<i>Pseudomonas stutzeri</i> EU883663	689	99,9					
	21	4,77E+07	1,33E+08	3,70E+01	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771 <i>Rheinheimera perlucida</i> AM183347	643 726	99,2 98,2					
13	22	2,14E+06	1,83E+02			<i>Corynebacterium</i> sp. FM173119	901	99,8					
					23	5,04E+05	< 10						
					24	1,69E+05	< 10						
14	25	1,88E+08	1,17E+08		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EU239104 <i>Citrobacter farmeri</i> DQ187383	649 678 893	99,8 94,1 99,2					
					15	26	7,47E+08	3,57E+07	9,70E+01		<i>Shewanella putrefaciens</i> CP000681	856	94,5
										+	<i>Morganella morganii</i> FJ418576 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	873 848	99,5 97,9
16	27	2,06E+09	2,83E+05	9,67E+02		<i>Pseudomonas putida</i> EU439423	589	100					
						28	2,43E+09	8,60E+07	1,90E+04		<i>Citrobacter freundii</i> FJ542329	669	99
		<i>Pseudomonas putida</i> EU439423	686	100									
		<i>Shewanella putrefaciens</i> CP000681	810	98,9									
	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	722	99,6									
17	29	1,09E+09	5,40E+07	4,33E+02	+	<i>Brevundimonas diminuta</i> FJ266339 <i>Acinetobacter</i> sp. AM412163	840 800	100 100					

18	30	1,24E+05	< 10						
19	31	4,51E+09	9,40E+07	2,50E+02	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	732	100	
					+	<i>Ochrobactrum</i> sp. DQ486949	819	99,6	
	32	6,95E+04	< 10						
20	33	4,11E+07	1,70E+07		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	826	95,5	
					+	<i>Ochrobactrum</i> sp. DQ486949	575	99,7	
	34	1,59E+09	1,95E+09	2,30E+01		<i>Morganella morganii</i> DQ358144	758	99,3	
21	35	6,71E+08	2,36E+09	1,17E+02	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	674	99,9	
	36	6,19E+08	1,72E+08	1,27E+03	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	801	100	
	37	4,09E+09	7,25E+08	1,00E+03	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	845	99,9	
22	38	8,81E+06	6,43E+05	6,00E+02		<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FJ493170	902	97,3	
						<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> FJ390141	518	98,5	
	39	1,12E+07	2,29E+05		+	<i>Janthinobacterium lividum</i> EU652474	422	99,5	
						<i>Comamonas testosteroni</i> AM184216	668	100	
						<i>Psychrobacter pulmonis</i> . FJ546069	621	99,8	
	40	4,03E+08	2,34E+09	7,00E+00	+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	920	98,6	
23	41	2,20E+08	3,05E+07	5,00E+02		<i>Pseudomonas fluorescens</i> AF094729	832	100	
					+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	829	99,6	
24	42	3,21E+04	< 10						
	43	8,25E+04	< 10	4,00E+01					
25	44	2,56E+08	2,00E+08		+	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	858	99,9	
						<i>Shewanella putrefaciens</i> X81623	852	100	

^a Les chiffres entre parenthèses représentent la concentration de *Mycobacterium immunogenum* dans les échantillons évaluée par qPCR. Lorsqu'il n'y a pas de parenthèses, les concentrations de *Mycobacterium immunogenum* étaient sous la limite de détection concentration (<167 copies du gène d'ARNr 16S/ml)

3.3.2 Identification des isolats

Pour chaque échantillon de FCM, les microorganismes les plus abondants retrouvés sur les milieux de culture furent isolés. L'ARN ribosomal 16S fut séquencé pour identifier les isolats. Ces séquences furent comparées à la base de données Genbank afin de déterminer l'affiliation la plus proche (tableau 5). Des isolats très proches de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ont été observés dans 23 des 44 fluides analysés et dans 78% de ces cas, ils représentaient l'espèce majoritairement retrouvée. Plusieurs isolats appartenaient à la classe des gammaproteobacteriaceae avec des affiliations proches des espèces *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Conamonas testosteroni*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Morganella moganii*, *Citrobacter freundii* et *Acinetobacter* sp. Quelques fluides contenaient aussi des bactéries appartenant à la classe des alphaproteobacteriaceae comme *Orchrobactrum* sp. et *Brevundimonas diminuta*. Certains fluides contenaient aussi des isolats appartenant au genre *Bacillus* sp.

Une souche fortement apparentée à *Mycobacterium immunogenum* a été isolée au site 7, confirmant les résultats obtenus en qPCR. Cependant, même si la qPCR indiquait une concentration élevée de *M. immunogenum* au site 6, aucun isolat n'a pu être obtenu. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la croissance a été supplantée par d'autres bactéries à croissance rapide comme *Pseudomonas pseudoalcaligenes* qui est capable de croître sur milieu Middlebrook 7H10 OADC.

Les moisissures obtenues sur milieu Rose Bengal Agar furent identifiées par l'observation microscopique des caractères morphologiques. Vingt-quatre échantillons de fluide sur les 44 analysés étaient colonisés par *Fusarium* sp. et la concentration de ce microorganisme variait quant à elle de $3,0 \times 10^0$ à $1,9 \times 10^4$ Unités formatrices de colonies (UFC)/ml. Avec une valeur médiane de $2,25 \times 10^2$ UFC/ml. *Acremonium* sp. a aussi été isolée dans 2 fluides alors que *Exophiala* sp., *Trichoderma* sp. et *Penicillium* sp. furent retrouvés à une seule reprise.

3.3.3 Analyse des profils DGGE

La diversité de la population microbienne colonisant les fluides de coupe fut déterminée par PCR DGGE en ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S. Des gels avec un gradient dénaturant de 30% à 55% furent réalisés pour chaque échantillon (Figure 1). Les bandes majeures furent récupérées et ré-amplifiées préalablement à leur séquençage (~500pb).

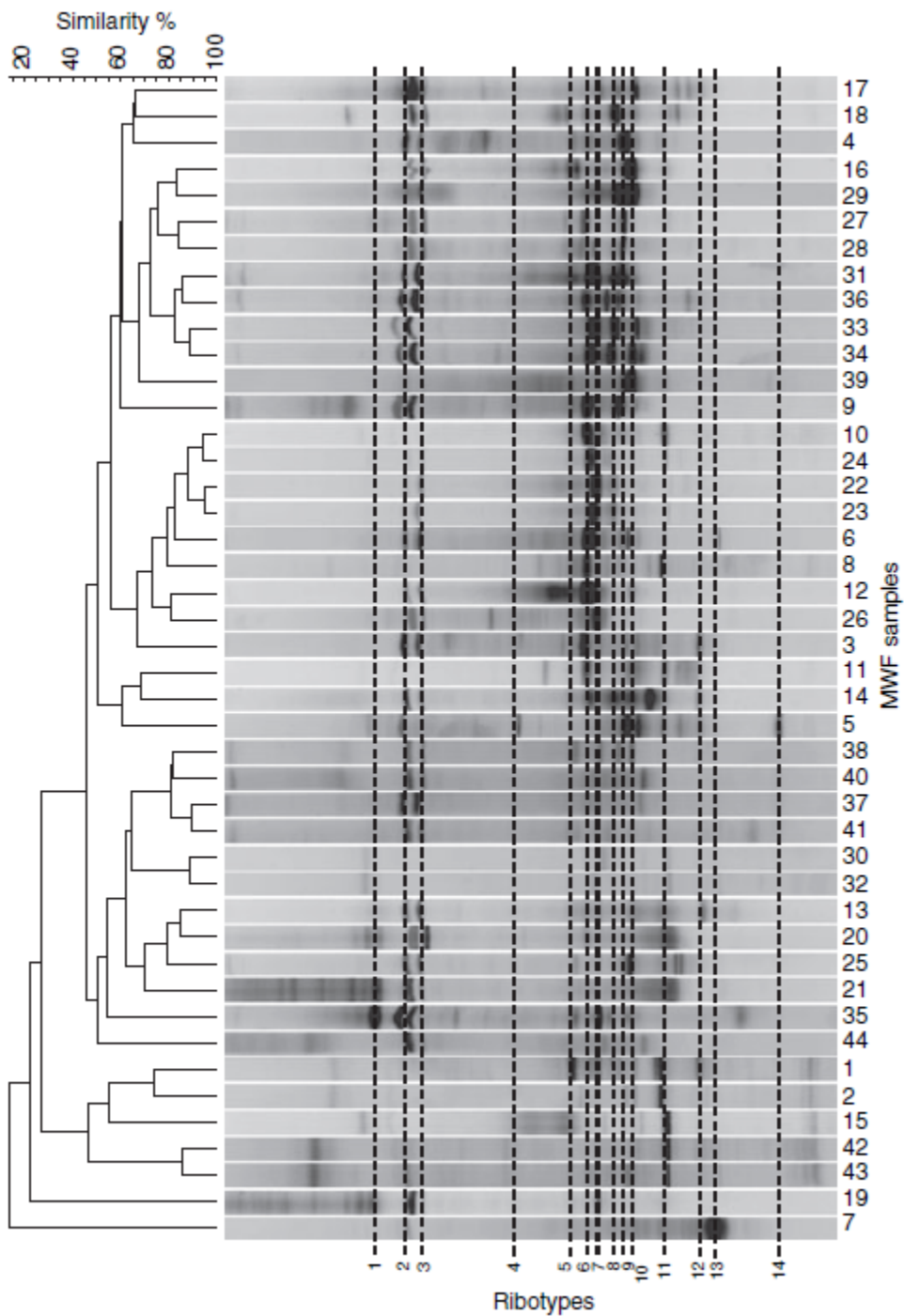


Figure 1 : Dendrogramme généré à partir de profils DGGE des échantillons de fluide de coupe de métaux, basé sur un index de corrélation de Pearson et UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages).

Quelques bandes présentes dans plusieurs échantillons furent séquencées plus d'une fois dans le but de confirmer qu'elles appartenaient au même ribotype. Les bandes les plus intenses correspondant à 14 ribotypes différents (tableau 6) ont été utilisées pour réaliser une analyse par segment des gels DGGE. Cependant, aucune relation n'a été observée entre les regroupements obtenus et les différents types de fluides de notre échantillonnage, leur contenu ou le type d'équipement sur lesquels ils étaient utilisés. À l'instar du ribotype 12, toutes les bandes démontraient une similarité supérieure à 97% avec le microorganisme auquel ils étaient affiliés.

Tableau 6: Affiliation des différents ribotypes retrouvés dans les profils DGGE réalisés avec les échantillons de fluides de coupe.

Ribotypes	Fréquence (sur 44)	Identité des bandes DGGE	pb	% similarité
1	3	<i>Chryseobacterium</i> sp. EF540483	526	97,0
2	33	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> EU815635	522	100
3	32	<i>Ochrobactrum anthropi</i> FJ374126	496	98,6
4	1	<i>Cupriavidus gilardii</i> AY860227	508	99,4
5	4	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EU931555	519	99,6
6	17	<i>Ochrobactrum</i> sp. DQ486949	508	99,8
7	4	<i>Acidovorax</i> sp. AJ277707	518	97,9
8	8	<i>Clostridium sticklandii</i> M26494	485	97,1
9	4	<i>Brevundimonas diminuta</i> FJ266339	508	99,6
10	14	<i>Comamonas terrigena</i> AJ430343	516	100
11	15	<i>Bacillus</i> sp. EU004568	520	99,8
12	5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EU239195	533	93,0
13	2	<i>Mycobacterium immunogenum</i> AJ812215	518	100
14	1	<i>Methylobacterium extorquens</i> EU855844	506	99,8

La présence des ribotypes 2 et 3 respectivement affiliés à *Pseudomonas pseudoalcaligenes* et *Ochrobactrum anthropi* dans la presque totalité des échantillons démontre que ces microorganismes ont la possibilité de croître peu importe le type de fluide et sa composition. D'autres ribotypes importants trouvés dans les échantillons de fluide étaient affiliés à *Ochrobactrum* sp., *Comamonas* sp., *Brevundimonas diminuta*, *Mycobacterium immunogenum* et *Bacillus* sp. Toutes ces espèces furent isolées par culture pendant cette étude.

3.4 Caractérisation de l'air ambiant

Les concentrations de bactéries mésophiles hétérotrophes aéroportées dans les établissements visités étaient relativement basses, variant entre $1,2 \times 10^1$ et $5,2 \times 10^3$ UFC/m³ (tableau 7) et ce, même si les concentrations de bactéries retrouvées dans les fluides étaient élevées. Seulement deux sites (#6 et #29) situés dans deux usines différentes montraient des concentrations de bactéries dans l'air supérieures à 10^4 bactéries/m³. L'un d'eux (#29) était situé dans une scierie et a démontré des concentrations supérieures dans presque tous les autres critères utilisés pour

évaluer la qualité de l'air. Les aérosols trouvés dans cette usine provenaient fort probablement des activités de transformation du bois.

Tableau 7: Caractérisation des aérosols aux différents sites d'usinage

Usines	Sites	Bactéries (UFC m ⁻³)	Moisissures (UFC m ⁻³)	Endotoxines (UE m ⁻³)	Poussières inhalables (mg m ⁻³)	Brouillards d'huile (mg m ⁻³)	Taux de changements d'air (h ⁻¹)
1	1	1,68E+02	4,81E+02	10,56	2,62	0,67	0,6
2	2	7,05E+02	4,24E+02	13,06	0,58	0,59	6,4
3	3	1,33E+03	2,47E+01	15,67	0,47	0,24	1,1
4	4	4,53E+02	2,18E+03	44,44	N.D.	0,09	2,6
	5	1,61E+03	1,74E+04	0,00	N.D.	0,78	0,9
5	6	6,94E+02	9,95E+01	0,00	0,10	0,13	2,8
	7	4,32E+02	2,99E+02	21,39	1,22	0,08	1,7
6	8	8,65E+01	3,60E+01	38,33	0,99	0,19	3,2
	9	9,67E+02	2,37E+02	17,50	0,74	0,19	4,3
	10	2,90E+02	3,29E+02	87,74	0,30	0,25	4,3
7	11	8,60E+02	1,08E+01	61,67	0,22	0,12	1,8
	12	8,51E+02	7,95E+00	0,00	0,51	0,12	1,8
8	13	1,31E+02	8,84E+00	148,61	0,17	0,28	1,6
9	14	1,17E+02	3,18E+01	48,61	1,17	0,15	4,4
	15	3,01E+01	5,39E+01	2,78	0,37	0,04	14,2
10	16	8,13E+01	5,20E+01	31,94	0,52	0,15	3,8
11	17	6,29E+02	3,11E+02	0,00	0,69	0,18	2,5
	18	4,84E+02	2,34E+02	61,11	0,50	0,18	1,6
12	19	8,40E+02	1,27E+02	2,08	0,73	0,32	4,1
	20	5,34E+02	2,05E+02	56,25	0,73	0,39	2,9
	21	1,38E+02	2,30E+02	4,17	2,06	0,24	2,6
13	22	2,55E+01	3,64E+02	122,92	0,64	0,25	10,5
	23	3,44E+01	3,11E+02	0,00	0,30	0,24	13,6
	24	6,89E+01	6,33E+02	0,00	0,13	0,27	5,7
14	25	1,11E+02	> 495	47,22	1,36	0,11	2,9
15	26	1,13E+03	4,49E+02	41,67	2,59	0,16	2,5
16	27	>553 ^a	2,58E+02	29,17	0,49	0,08	0,9
	28	> 18811	5,66E+01	29,17	0,74	0,09	0,9
17	29	> 18860	CC ^c	150,00	1,73	0,72	8,4
18	30	2,39E+01	2,62E+02	0,00	0,31	0,13	2,3
19	31	5,15E+03	1,27E+02	55,56	<0,10	0,18	3
	32	3,65E+02	5,97E+02	2,78	0,96	0,27	3
20	33	1,94E+03	1,31E+02	141,67	<0,10	0,25	0,6
	34	4,59E+03	9,18E+01	77,78	0,90	0,27	0,6
21	35	7,23E+02	7,00E+00	0,00	0,10	0,03	1,5
	36	4,81E+02	7,10E+00	0,00	0,10	0,03	1,5
	37	7,61E+02	4,59E+01	20,83	0,10	0,03	1,5
22	38	4,75E+01	4,95E+01	183,33	0,36	0,15	2,8
	39	1,35E+02	1,40E+01	20,83	1,22	0,21	2,8
	40	1,15E+03	1,06E+02	29,17	0,47	0,19	2,8
23	41	2,62E+02	6,35E+01	102,78	1,65	0,11	1,4
24	42	2,65E+01	1,06E+01	83,33	1,10	0,05	2
	43	2,57E+01	5,30E+01	11,11	0,49	0,19	2
25	44	1,58E+02	1,03E+02	11,11	0,25	0,08	3,4

^a La croissance sur un ou plusieurs étages de l'Andersen était confluite (> 400 colonies)

^b N.D. Non déterminé

^c Colonies confluentes

3.4.1 Bactéries dans l'air

Les concentrations de microorganismes dans l'air étant très basses, les méthodes de caractérisation moléculaire n'ont pas été utilisées comme dans le cas de la caractérisation de l'écologie de fluides. En effet, ces méthodes ont un seuil de détection d'environ 10^3 copie/m³ d'air.

L'affiliation des bactéries isolées et leur fréquence sont présentées au tableau 8. Les microorganismes affiliés à *Pseudomonas pseudoalcaligenes* furent les plus souvent retrouvés dans les échantillons d'air (13/44 sites).

Tableau 8: Fréquence et affiliation des isolats de bactéries aéroportées issues des échantillons d'air des ateliers d'usinage

Affiliation de l'isolat	pb	% Identité	Fréquence (sur 44)	Exemples d'habitats cités dans la littérature
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> FJ418771	517-811	94,2-100	13	Sinus humains, piscines, eau, sol, FC
<i>Arthrobacter</i> sp. DQ667118	465-927	85,0-100	10	Sol
<i>Rhodococcus</i> sp. EU016150	584-829	95,5-100	10	Sol, FC
<i>Brevundimonas diminuta</i> FJ266339	687-881	99,9-100	9	Eau, FC
<i>Psychrobacter</i> sp. FJ546058	609-831	97,4-100	9	Eau de mer, sol, poissons
<i>Ochrobactrum</i> sp. DQ486949	679-801	99,2-100	7	Sol, FC
<i>Citrobacter freundii</i> FJ542329	503-699	93,7-99,9	6	Eau, Égouts, Sol, FC
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EU239210	499-751	93,1-100	6	Sol, flore humaine, FC
<i>Micrococcus luteus</i> EU418716	451-831	94,2-99,8	5	Peau mammifères, FC
<i>Kocuria</i> sp. AM990819	501-668	99,2-99,7	4	Sol, nourriture, FC
<i>Pseudomonas mendocina</i> EU395787	579-699	99,0-100	3	Sol, eau
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> AB073192	645-715	96,3-99,7	3	Sol
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EU931555	583-709	99,3-100	3	Ubiquitaire, FC
<i>Microbacterium</i> sp. AB330407	609-726	88,0-100	3	Ubiquitaire
<i>Pseudomonas fluorescens</i> FJ147200	651-758	86,0-100	2	Ubiquitaire, bioaérosols d'ateliers d'usinage, FC
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FJ613577	276-526	94,9-100	2	Peau humaine

<i>Xanthomonas campestris</i> AE008922	500-750	91,6-98,6	2	Plantes
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> FJ178215	598-708	100	2	Sol, plantes
<i>Bacillus pumilus</i> FJ686823	695-699	99,7-99,9	2	Sol, FC
<i>Bacillus megaterium</i> FJ685764	780-839	99,7-100	2	Sol
<i>Pseudomonas libanensis</i> EU434380	644-709	99,9-100	2	Eau de source
<i>Acinetobacter lwoffii</i> FJ609690	503	99,0	1	Nourriture, peau humaine, FC
<i>Pseudomonas stutzeri</i> EU603456	699	99,9	1	Ubiquitaire, FC
<i>Comamonas testosteronii</i> FJ544385	523	98,5	1	Ubiquitaire, FC
<i>Chryseobacterium</i> sp. AM988900	721	99,4	1	Sol, Eau, Nourriture, FC
<i>Shewanella putrefaciens</i> CP000681	583	98,5	1	Ubiquitaire, FC
<i>Acidovorax</i> sp. AJ277707	867	97,8	1	Eau, sol, Pathogène de plantes

3.4.2 Moisissures dans l'air

À l'exception de l'usine #4 (tableau 7), qui démontrait des concentrations de moisissures allant de $2,2 \times 10^3$ à $1,7 \times 10^4$ UFC/m³, les concentrations de moisissures dans l'air des sites échantillonnés étaient basses, allant de 7,0 à $6,3 \times 10^2$ UFC/m³.

3.4.3 Changements d'air

Les taux de changements d'air des bâtiments visités étaient pour la plupart sous le standard recommandé (ACGIH) de quatre changements d'air par heure. Les valeurs obtenues se situaient entre 0,6 et 14,2 changements d'air/heure. Seulement neuf sites respectaient la valeur minimum suggérée. Cependant, aucune corrélation significative n'a pu être réalisée entre les changements d'air et un autre paramètre de qualité de l'air à l'étude ($p \geq 0,05$).

3.4.4 Poussières inhalables

Les poussières inhalables variaient entre indétectables et 2,6 mg/m³, soit sous les limites d'expositions suggérées par le RSST du Québec de 10 mg/m³ pour des poussières non classifiées autrement (RSST, 2008).

3.4.5 Diamètre aérodynamique des particules

La concentration de particules en fonction de leur diamètre aérodynamique a été étudiée et est présentée à la figure 2. Les résultats démontrent que les aérosols à proximité des sites d'usinage sont principalement situés dans un intervalle allant de 0,3 à 3,0 µm avec une concentration médiane de $1,0 \times 10^7$ particules/m³.

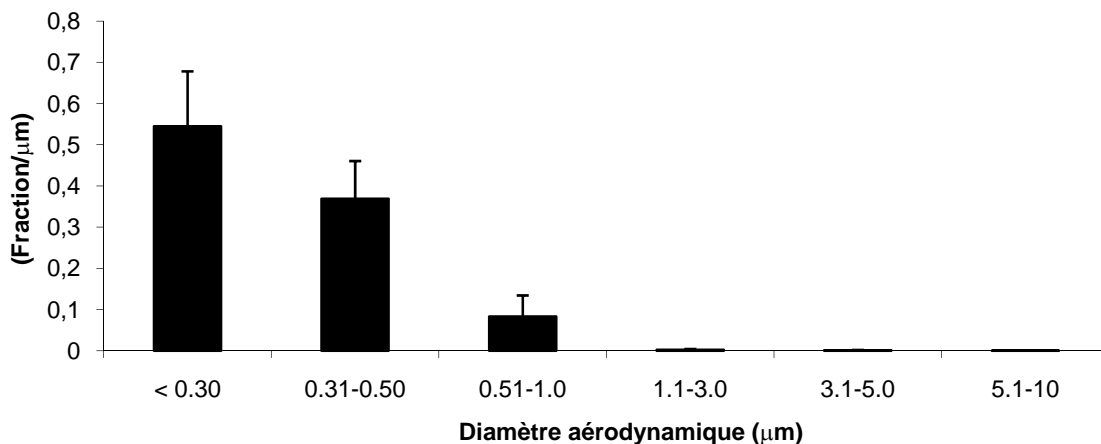


Figure 2: Fractions des concentrations de particules totales dans l'air pour chaque intervalle de grosseurs aérodynamiques mesurées à l'aide du compteur de particules MetOne.

3.4.6 Quantification des endotoxines

Les endotoxines dans l'air ont été quantifiées avec la méthode LAL, les concentrations obtenues peuvent être observées au tableau 7. Les concentrations se répartissent dans un intervalle allant d'indétectable à 183 UE (unités endotoxines)/m³ avec une valeur médiane de 25,3 UE/m³.

3.4.7 Brouillards d'huile

Les concentrations de brouillards d'huile s'échelonnent de 0,02 à 0,89 mg/m³, soit bien en dessous des limites d'expositions de 5 mg/m³ suggérées par le RSST (2008). Ces résultats sont présentés au tableau 7.

3.5 Analyse de la santé des travailleurs

3.5.1 Profil des travailleurs

Des 209 travailleurs recrutés, on dénombre 207 hommes et 2 femmes dont la majorité occupait un emploi de machiniste au moment du questionnaire. Tous affirmaient se trouver en présence de FC au travail, hormis 4 d'entre eux qui n'ont pas répondu à la question. Le nombre d'heures totales travaillées par chaque employé était très variable, allant d'approximativement 58 à 72 000 heures, pour une moyenne de 23 769 heures.

Les 209 travailleurs étaient répartis dans 25 usines différentes. De ce nombre, 205 étaient directement exposés aux FC. L'âge moyen des participants était de 38 ans avec un âge minimum de 18 ans et maximum de 61 ans. Les postes occupés par les participants étaient répartis de la façon suivante : machinistes = 195, opérateur = 1, huileur = 1 soudeur = 1, étudiants = 6 et techniciens = 5. Le nombre d'heures moyen d'exposition aux FC/semaine était de 37,58h et le nombre d'heures total d'exposition aux FC (pour 48 semaines/an) était de 23 769 heures.

Pour ce qui est des facteurs confondants à l'évaluation des symptômes, une histoire de tabagisme ancien ou actif était présente chez 48% des répondants, soit 100 travailleurs sur 209, alors que les huiles utilisées comme fluides de coupe étaient très variables d'une usine à l'autre et pouvaient même varier dans une même usine.

Fumeurs : 53/209

Anciens fumeurs : 47/209

Total : 100/209 (48%)

Non-répondant : 1/209

3.5.2 Questionnaire

3.5.2.1 Impact respiratoire

Au moment de remplir les questionnaires, 27 travailleurs sur 209 se plaignaient de symptômes respiratoires, dont 16 affirmaient s'améliorer à l'arrêt du travail (tableau 9). Lorsque questionnés plus spécifiquement sur la présence de différents symptômes respiratoires, actuelle ou non: 8 personnes sur 209 ressentait de la dyspnée et 21 des sibilances qu'elles croyaient reliées à leur travail (tableau 10).

Tableau 9: Symptômes respiratoires actuels chez les travailleurs

		tabac	pas de tabac
Symptômes respiratoires actuels	27/209	15	12
Symptômes s'améliorent après le travail	16/27		

Tableau 10: Symptômes reliés au travail chez les travailleurs

		tabac	pas de tabac
dyspnée reliée au travail	8/209	6	2
	1 non-répondant		
sibilance reliée au travail	21/209	12	9
	1 non-répondant		
fièvre ou frissons	24/209	9	15
	1 non-répondant		

Sur les 209 travailleurs évalués, 59 éprouvaient des problèmes de toux au moins 1 fois dans l'année, le matin ou le jour, en été ou en hiver, alors que 18 d'entre eux remplissaient des critères qui se rapprochaient de la bronchite chronique (toux et expectorations au moins 3 mois/an), dont 17 avaient une histoire tabagique (tableau 11).

Tableau 11: Toux chez les travailleurs

		tabac	(%)	pas de tabac	(%)	total	risque relatif
toux le matin l'hiver	41/209	27	12,92	14	6,70	19,62	2,10
toux le matin l'été	22/209	17	8,13	5	2,39	10,53	3,71
toux le jour l'hiver	41/209	30	14,35	11	5,26	19,62	2,97
toux le jour l'été	23/209	17	8,13	6	2,87	11,00	3,69
bronchite chronique	18/209	16	7,66	2	1,96	8,61	8,72

3.5.2.2 Impact dermatologique

**Tableau 12: Impact dermatologique chez les travailleurs
(Problèmes aux doigts, mains, poignets avant-bras ou visage)**

Rougeur ou enflure	58/209
Fissure ou gerçure	89/209
Dessèchement, cloches d'eau, peau pèle	68/209
Démangeaisons	78/209
Douleur	22/209
Total de personnes avec problèmes cutanés	137/209
Problèmes s'améliorent lors d'arrêt de travail	88/209

Tableau 13: Protections cutanées utilisées

Total de personnes avec problèmes cutanés	137/209	
Utilisation de gants imperméables	OUI	42
	NON	95
	non répondant	2
Utilisation de crème protectrice	OUI	53
	NON	74
	non répondant	1

Un total de 137 des 209 travailleurs témoignaient avoir souffert de problèmes cutanés divers soit au niveau des doigts, mains, poignets avant-bras ou visage, dont 88 voyaient leurs problèmes s'estomper à l'arrêt du travail (tableau 12). De ces 137 travailleurs, notons que seulement 42 d'entre eux faisaient usage de gants imperméables (30%) et 53 de crème protectrice (39%) (tableau 13).

Lors de l'évaluation avec l'infirmière de recherche, 13 d'entre eux présentaient des lésions justifiant une prise de photo. Suite à l'examen de ces photos, 1 seul travailleur s'est vu diagnostiquer par le dermatologue une pathologie cutanée possiblement reliée au travail (dermatite de contact, irritative ou allergique).

3.5.3 MESURE D'ANTICORPS

Selon le système de gradation de cotes, un pourcentage considérable de travailleurs présentait une réponse immune significative de niveau 2-3-4 aux différents pathogènes (tableau 14). Par contre, des cotes d'anticorps similaires ont été retrouvés dans le groupe contrôle pour tous les pathogènes, hormis le *Pseudomonas* où une réponse immune plus importante 2-3-4 a été plus fréquente de façon statistiquement significative dans le groupe travailleurs que dans le groupe témoin ($p=0,0259$).

Tableau 14 : Cotes d'anticorps pour les différents pathogènes, travailleurs vs témoins

Groupe	Cotes d'anticorps pour <i>F. moniliforme</i>			Groupe	Cotes d'anticorps pour <i>F. solani</i>		
	0-1	2-3-4	Total		0-1	2-3-4	Total
Témoins (%)	47 (72,3)	18 (27,7)	65	Témoins (%)	52 (80,0)	13 (20,0)	65
Travailleurs (%)	148 (75,5)	48 (24,5)	196	Travailleurs (%)	162 (82,6)	34 (17,4)	196
Total	195	66	261	Total	214	47	261

Cotes manquantes : 13

Cotes manquantes : 13

p = 0,6031

p = 0,6302

Groupe	Cotes d'anticorps pour mycobactérie souche 1			Groupe	Cotes d'anticorps pour mycobactérie souche 2		
	0-1	2-3-4	Total		0-1	2-3-4	Total
Témoins (%)	56 (86,2)	9 (13,8)	65	Témoins (%)	56 (86,2)	9 (13,8)	65
Travailleurs (%)	164 (83,7)	32 (16,3)	196	Travailleurs (%)	167 (85,2)	29 (14,8)	196
Total	220	41	261	Total	223	38	261

Cotes manquantes : 13

Cotes manquantes : 13

p = 0,5646

p = 0,7332

Groupe	Cotes d'anticorps pour <i>Pseudomonas</i>		
	0-1	2-3-4	Total
Témoins (%)	62 (95,4)	3 (4,6)	65
Travailleurs (%)	164 (83,7)	32 (16,3)	196
Total	226	35	261

Cotes manquantes : 13

p = 0,0259

3.5.4 SPIROMÉTRIE

En examinant les valeurs de spirométrie des travailleurs, soit leur capacité vitale forcée (CVF), leur volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) ainsi que leur valeur de Tiffeneau (VEMS/CVF), 7 travailleurs correspondaient à des valeurs de MPOC, dont 2 légères, 4 modérées et une sévère. Aucune spirométrie ne rencontrait les critères de syndrome restrictif.

Aucune corrélation significative n'est ressortie de la comparaison des valeurs de spirométrie aux mesures d'anticorps, aux décomptes de pathogènes dans l'air et dans les fluides ainsi qu'aux valeurs de brouillards d'huile. Les valeurs de brouillards d'huile ont d'ailleurs été divisées selon les normes ($<$ ou $\geq 0,4 \text{ mg/m}^3$). Quelques usines se sont avérées avoir des valeurs au-dessus des normes mais encore là, aucune différence statistiquement significative lorsque comparées aux spirométries.

De plus, aucune différence statistiquement significative n'a été obtenue en comparant les usines entre elles, bien que pour illustrer ce point, la taille de notre échantillon aurait dû être plus importante (tableau 15).

Tableau 15 : Valeurs de spirométrie selon les divisions territoriales effectuées

Analysis Variable : CVFPct CVFPct						FEV1Pct FEV1Pct				TiffPct TiffPct			
cUsine	N	Mean	Std Dev	Min	Max	Mean	Std Dev	Min	Max	Mean	Std Dev	Mini	Max
Amos(17,18)	8	98.8	10.8	81.2	112.5	95.4	9.2	79.3	105.2	80.8	5.0	72.5	88.0
Chicoutimi(14)	3	100.5	4.4	96.8	105.4	102.4	3.0	99.9	105.8	84.0	5.3	78.4	88.9
Gatineau(21)	13	91.9	15.3	71.5	114.4	89.1	14.8	65.1	114.0	81.7	5.1	72.9	88.7
Joliette(2)	5	94.9	13.8	83.5	110.2	95.1	12.7	80.4	110.3	82.5	2.6	79.5	86.2
Joliette(4)	14	90.3	12.6	67.3	110.5	85.4	16.7	40.0	106.1	78.3	10.2	48.3	87.7
Joliette(5)	9	96.3	18.0	57.0	121.7	93.5	17.7	57.7	116.5	80.8	5.1	70.5	87.4
Lister(20)	10	98.3	12.4	72.6	112.0	94.8	14.1	63.7	108.0	81.2	4.8	73.2	88.1
Longueuil(13)	70	95.5	11.5	76.3	119.9	91.7	12.1	64.4	118.7	78.6	6.1	60.3	96.6
QuÃ©bec	53	97.2	11.8	69.6	120.5	93.4	11.4	65.4	116.6	80.0	5.4	67.2	96.3
Roberval(19)	4	95.4	14.6	76.8	112.4	95.9	12.7	81.1	111.9	83.6	2.5	81.0	86.7
Saguenay(3)	2	90.5	14.1	80.5	100.4	87.9	8.3	82.0	93.8	81.9	5.5	78.0	85.8
Sorel(24)	3	95.2	11.5	88.0	108.5	94.2	12.5	81.9	106.9	81.0	4.4	76.1	84.7
Sorel(6)	7	93.4	9.8	77.5	108.4	88.5	8.9	76.6	100.9	79.9	6.2	72.4	86.7
St-J-sur-R (7)	2	94.7	1.7	93.5	95.9	94.5	5.6	90.6	98.5	83.4	4.2	80.4	86.3

p = 0,9065

p = 0,6878

p = 0,5983

Une corrélation statistiquement significative a été démontrée entre la quantité de moisissures dans les fluides et une diminution de la valeur de Tiffeneau (tableau 16).

Des corrélations significatives inattendues se sont également produites lorsque comparées aux valeurs de poussières inhalées. Effectivement, selon les données obtenues, une augmentation de poussières inhalées augmenterait de façon statistiquement significative les valeurs de CVF et de VEMS.

Tableau 16 : Corrélation de Spearman entre les valeurs de spirométrie et les décomptes des bioaérosols

Spirométrie		Décomptes						
		bactéries totales dans l'air (culture)	Moisissures dans l'air (culture)	Bactéries totales dans les fluides		Moisissures dans les fluides (culture)	Poussières inhalées	Brouillard d'huile
				(culture)	(PCR)			
CVF	corrélation	-0,29217	0,18874	-0,09176	-0,11739	-0,14526	0,48617	0,11785
	p	0,1659	0,3884	0,6698	0,5849	0,4983	0,0187	0,5834
VEMS	corrélation	-0,19565	0,19862	-0,08698	-0,09478	-0,22097	0,50395	0,17743
	p	0,3595	0,3636	0,6861	0,6595	0,2994	0,0142	0,4069
TIFF	corrélation	0,09478	0,00395	0,17526	0,04261	-0,42961	-0,03063	-0,02653
	p	0,6595	0,9857	0,4127	0,8433	0,0362	0,8896	0,9021

4. DISCUSSION

4.1 Biodiversité des fluides

Afin de répondre à l'objectif A1 et, contrairement aux études précédentes décrivant la biodiversité des fluides de coupe mettant l'emphase sur les méthodes de culture traditionnelles appliquées sur une petite quantité d'échantillons, une quantification des bactéries totales ainsi que des mycobactéries par qPCR et une étude de la biodiversité en combinant une approche de culture ainsi qu'une approche moléculaire en utilisant la PCR DGGE ont été réalisées. Toutefois, malgré de nombreuses tentatives, il n'a pas été possible de quantifier les bactéries totales par microscopie à épifluorescence due à la trop grande proportion de contaminants dans plusieurs échantillons qui rendait l'imagerie impossible.

Plusieurs types de FC (minéral, végétal, synthétique, semi-synthétique) provenant de plusieurs ateliers d'usinage différents ont été étudiés en utilisant des méthodes variées. Les concentrations de microorganismes cultivables étaient dans le même ordre de grandeur que les concentrations citées dans la littérature, avec des concentrations aussi élevées que 10^9 UFC/ml. Cependant, pour la plupart des échantillons, le qPCR a mis en évidence des concentrations de microorganismes plus élevées que les méthodes de culture. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des échantillons ayant des concentrations de bactéries cultivables faibles. Dans ce cas, le qPCR pouvait donner des concentrations jusqu'à 5 logarithmes plus élevés.

Les bactéries affiliées à *Pseudomonas pseudoalcaligenes* sont les microorganismes qui ont été retrouvés le plus fréquemment dans les échantillons de FC. Toutefois, aucune relation n'a pu être trouvée avec le type de FC utilisé et/ou le type de machine. Ces résultats sont confirmés tant en culture avec 52% d'échantillons positifs qu'en PCR DGGE avec 70% d'échantillons positifs. Cette espèce n'est pas reconnue comme étant pathogène pour l'humain, à l'exception des endotoxines qui composent sa membrane. Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont été isolées à partir de FC en utilisation; *P. putida*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. strutzeri* et *P. fluorescens* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées (Kreiss, 1997, NIOSH, 1998, Lonon, 1999). Il semble que ces bactéries peuvent proliférer dans des environnements hostiles contenant des biocides. En effet, Mattsby-Baltzer (1989) a mis en évidence qu'une population de *P. pseudoalcaligenes* pouvait croître pendant plus d'une année dans un même FC et ce, même avec l'ajout fréquent de biocides. Aucune de ces espèces de *Pseudomonas* n'est reconnue comme étant pathogène pour l'humain. Ces espèces de *Pseudomonas* possèdent toutes des gènes impliqués dans l'utilisation des composés hydrocarbonés et des alcanes, suggérant qu'ils sont en partie responsables de la détérioration des FC.

Toutes les autres espèces bactériennes isolées dans cette étude ont été décrites préalablement dans la littérature. Par exemple, Lonon (1999) a suivi la progression de la colonisation d'un FC semi-synthétique et avait observé la présence des espèces *O. anthropi*, *P. pseudoalcaligenes*, *B. dimituda*, *Corynebacterium halophila*, *C. freudii* et *Conamonas* spp. Zacharisen (1998) a étudié la colonisation de FC minéral et synthétique et avait trouvé des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* sp., *Shewanella* sp., *Ochrobactrum* sp., *Conamonas* sp., ainsi que *Mycobacterium chelonae* et *Acinetobacter lwoffii*.

Mycobacterium immunogenum a été trouvé dans 2 FC semi-synthétiques différents provenant d'un même atelier d'usinage. Cette bactérie est maintenant reconnue comme agent causal d'écllosion d'alvéolite allergique extrinsèque (AAE) dans les ateliers d'usinage (Wilson, 2001) et a aussi été cultivée à partir de FC minéral, synthétique et semi-synthétique où des cas d'AAE ont été décrits (Kreiss, 1997). La poursuite de la validation des méthodes de détection correspondant à l'objectif A4 a permis de mettre en lumière la présence de *M. immunogenum* dans un des deux échantillons positifs. En effet, un seul des deux échantillons donnait des résultats positifs suite à la mise en culture. Dans une étude récente, il est rapporté que *M. immunogenum* n'est pas toujours isolé des FC associés à des cas d'AAE. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la croissance de *M. immunogenum* est inhibée par la croissance plus rapide des autres microorganismes présents dans l'échantillon (comme ce fut notre cas pour le site 6) ou que l'AAE peut aussi être causée par un autre agent encore inconnu (Khalil, 2007). Dans notre cas, il est plausible que *M. immunogenum* ait été présent dans d'autres échantillons de FC, mais que les techniques utilisées n'aient pas permis sa détection.

4.2 Caractérisation de la qualité de l'air

Une analyse exhaustive des divers critères à l'étude a été réalisée dans le but de répondre à l'objectif A2.

4.2.1 Bactéries dans l'air

Bien que les concentrations de bactéries cultivables dans l'air étaient relativement basses, d'autres études portant sur la caractérisation des bioaérosols dans les usines utilisant des FC obtenaient des concentrations de bactéries aéroportées comparables (Gorny, 2004, Thorne, 1996, Woskie, 1996 et Burge, 1995). Thorne et collaborateurs ont utilisés la microscopie à épifluorescence pour évaluer du même coup les microorganismes cultivables et non-cultivables et ont trouvé des concentrations allant jusqu'à $4,68 \times 10^5$ cellules/m³. Toutefois, l'applicabilité de cette méthode lors de notre étude ne fut pas probante étant donné la grande quantité de poussières et gouttelettes d'huile, ne permettant pas un dénombrement adéquat des cellules et biaisant les comptes.

Les microorganismes affiliés à *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ont été le plus souvent retrouvés dans les échantillons d'air (13/44 sites). Lorsque *P. pseudoalcaligenes* fut observé, cette espèce était dans tous les cas l'espèce majoritaire retrouvée dans le fluide. Cette espèce est très proche génétiquement de *P. oleovorans* qui est communément retrouvée dans les FC (Burge, 1995, Lonon, 1995,1999 et Passman, 2002). Thorne et collaborateurs ont aussi rapporté la prédominance du genre *Pseudomonas* dans les aérosols de FCM. La présence de *P. pseudoalcaligenes* dans l'air des sites d'usinage suggère que son aérosolisation pendant les activités d'usinage est significative.

Plusieurs autres espèces bactériennes sont fréquemment retrouvées dans les aérosols de FC. Certaines (*P. mendocina*, *P. labanensis*, *Ochrobactrum* sp., *Paenibacillus illinoiensis*, *Citrobacter freundii*, *Shewanella putrefaciens*, *Psychrobacter* sp., et *Comamonas testosteronii*) furent retrouvées dans les FCM associés au site d'échantillonnage où elles furent isolées dans

l'air. Laitinen et collaborateurs (1999) ont aussi observé que *Comamonas*, *Ochrobactrum* et *Pseudomonas* étaient les genres microbiens les plus souvent retrouvés dans les bioaérosols à proximité d'outils utilisant des FCM. Ils ont aussi observé les genres *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Pantoea* et *Klebsiella*. Woskie et collaborateurs (1994) ont mis en évidence des concentrations significatives d'*Enterobacter* et de *Bacillus* dans les aérosols de FCM.

Une corrélation faible mais statistiquement significative ($p < 0,001$, $R^2 = 0,46$) fut observée entre les concentrations de bactéries totales présentes dans les fluides et les bactéries cultivables dans l'air présentées à la figure 3. Ceci suggère que la concentration de bactéries dans les FC peut influencer le degré d'exposition des travailleurs.

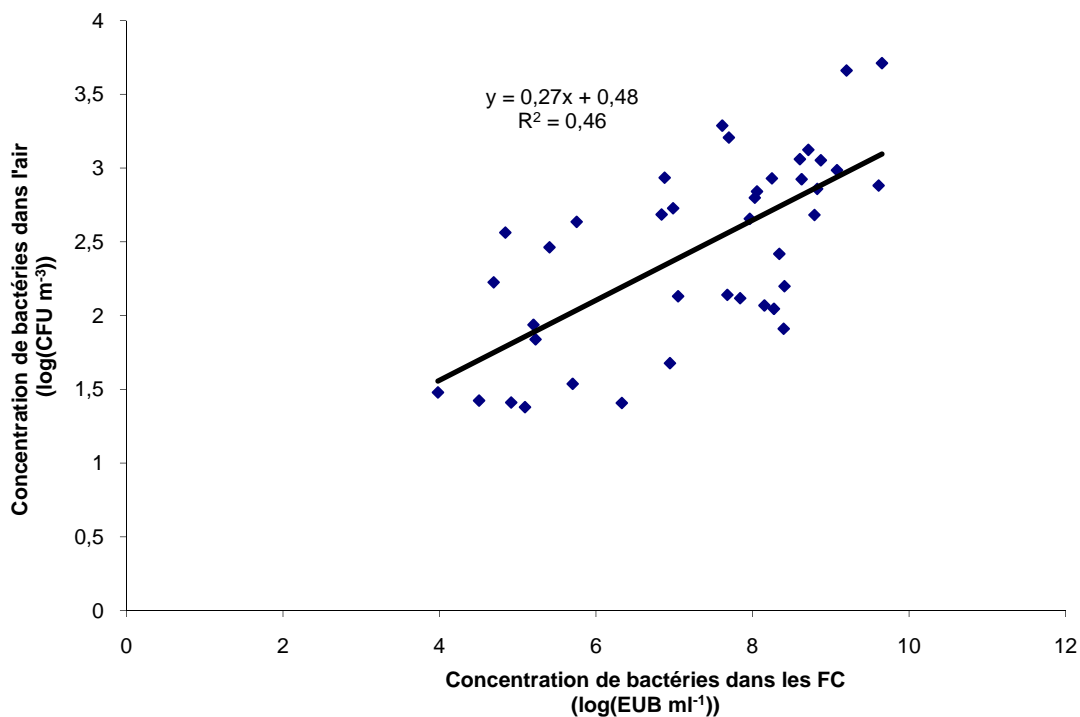


Figure 3 : Relation entre la concentration de bactéries cultivables trouvées dans l'air et les bactéries totales dans les FC quantifiées par PCR quantitative

4.2.2 Moisissures dans l'air

Malgré les basses concentrations de moisissures retrouvées lors de cette étude (moyenne 630 UFC/m³), ces niveaux de contamination ont aussi été rapportés dans d'autres études où *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus* étaient de loin les genres les plus fréquemment retrouvés (Laitinen, 1999). Les autres moisissures retrouvées sporadiquement appartenaient aux genres *Alternaria*, *Mucor* et *Acremonium*.

4.2.3 Poussières inhalables

Les mesures de poussières inhalables, à l'instar des concentrations de bactéries et de moisissures, étaient faibles (moyenne $0,75 \text{ mg/m}^3$). Toutefois, ces concentrations étaient comparables aux valeurs trouvées dans la littérature pour les poussières dans des environnements similaires: thoraciques (Eisen, 2001, Abrams, 2000), inhalables (Kennedy, 1989, Woskie, 1996 et Lillienberg, 2008) et totales (Fox, 1999, Kennedy, 1999).

Les poussières inhalables étaient significativement plus élevées en présence des tours d'usinage conventionnel lorsque comparées aux autres types d'équipements (figure 4). Cette observation est probablement due au manque de confinement de ces appareillages. On remarque aussi que les équipements les mieux confinés (tours numériques et centre d'usinage) génèrent moins de poussières inhalables. Il semble donc qu'un meilleur confinement et l'élimination de l'utilisation de l'air comprimé pourraient être des mesures pour réduire les concentrations de poussières inhalables.

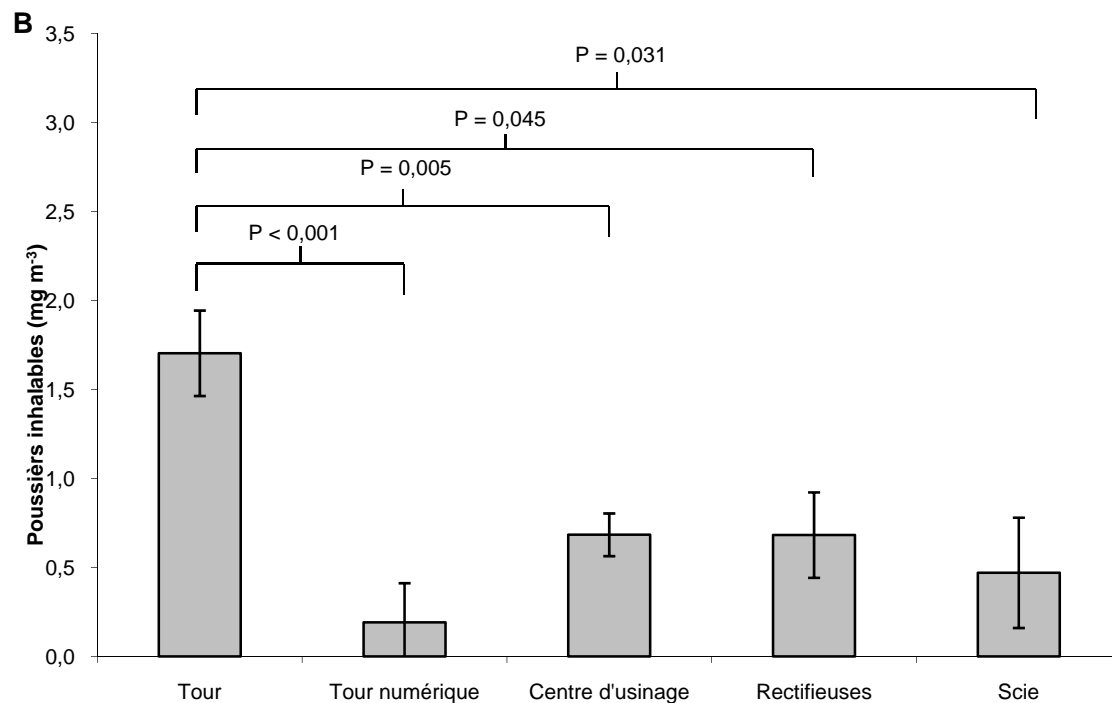


Figure 4 : Comparaison entre les concentrations de poussières inhalables en fonction des différents types d'équipements utilisés pour la transformation du métal (Tour n=6; Tour numérique n=6; Centre d'usinage n=21; Rectifieuse n=6, Scie n=3).

4.2.4 Diamètre aérodynamique des particules

L'information retrouvée dans la littérature scientifique concernant la concentration des particules de divers diamètres aérodynamiques dans l'environnement immédiat des outils de machinage

supporte les résultats obtenus lors de cette étude. En effet, Woskie et collaborateurs (1994) ont démontré qu'à une distance de 4 à 9 pieds de l'équipement, plus de 80% des particules avaient un diamètre aérodynamique inférieur à 3.5 μm (base massique). Comme il a déjà été rapporté, les très petites particules contenant des endotoxines ont la capacité de pénétrer profondément dans les poumons (Chan, 1990, Thornburg, 2000).

4.2.5 Mesures d'endotoxines dans l'air

Compte tenu des concentrations de bactéries aéroportées obtenues, les basses concentrations d'endotoxines observées étaient attendues. Toutefois, des valeurs similaires ont été obtenues dans de semblables environnements. Abrams et collaborateurs (2000) ont trouvé des concentrations variant de 14 à 990 UE / m^3 , alors que Laitinen et collaborateurs (1999) ont mesuré jusqu'à 3600 UE/ m^3 dans 18 sites d'usinage. Une comparaison des résultats obtenus lors de cette étude avec les données trouvées dans la littérature montre que de faibles concentrations d'endotoxines ont été mesurées dans l'air (moyenne 44,54 UE/ m^3). Les résultats ne démontrent pas de corrélation ($P>0,05$) entre les concentrations de microorganismes dans l'air et les concentrations en endotoxines. Ces résultats sont conséquents avec ceux de Thorne et collaborateurs (1996) qui ont observé peu de corrélation entre ces deux paramètres. Par contre, ils ont obtenu des corrélations significatives entre les concentrations d'endotoxines dans l'air et les mesures gravimétriques d'aérosols. Ce ne fut pas le cas lors de notre étude. En effet, aucune corrélation ne fut observée entre les concentrations d'endotoxines et les concentrations de poussières inhalables ($P>0,05$).

Les résultats illustrés à la figure 5 semblent montrer que les tours à contrôle numérique produisent une plus grande quantité d'endotoxines que les autres types d'équipements servant à la transformation du métal. Par contre, la différence est seulement significative lorsque comparée aux centres d'usinage numériques et aux rectifieuses.

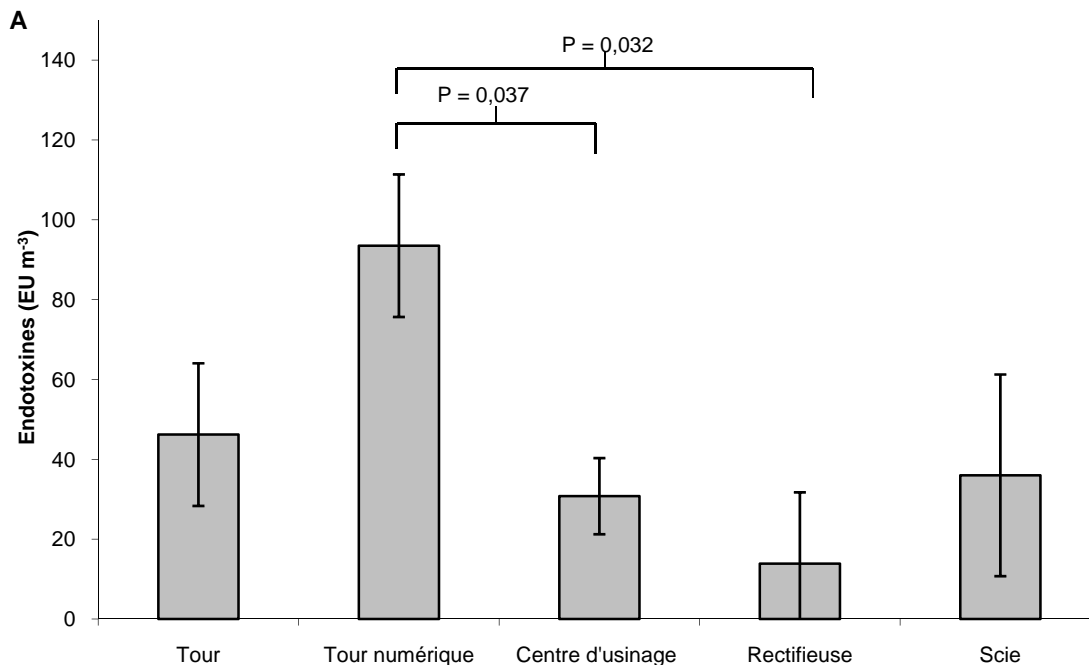


Figure 5 : Comparaison entre les concentrations d'endotoxines en fonction des différents types d'équipements utilisés pour la transformation du métal (Tour n=6; Tour numérique n=6; Centre d'usinage n=21; Rectifieuses n=6, Scie n=3).

4.2.6 Brouillards d'huiles

Dans le but de répondre à l'objectif A3, les concentrations d'huile dans l'air provenant de l'aérosolisation des fluides de coupe ont été étudiées. Une certaine consistance avec la littérature a été observée, avec une valeur moyenne de 0,22 mg/m³. En effet, Hands et collaborateurs (1996), lors d'une comparaison entre les concentrations de brouillards d'huile émis par différents équipements d'usinage, ont réalisé que 100% des 455 échantillons collectés démontraient des concentrations inférieures à 1 mg/m³ et que 90% de ces échantillons étaient sous 0,5 mg/m³, ce qui concorde avec nos résultats.

Contrairement à ce qui était observé dans le cas des poussières inhalables, le niveau de confinement des appareils ne semble pas avoir d'influence sur la génération de brouillards d'huile. À la figure 6, il est possible d'observer une différence significative entre la production de brouillards d'huile par les rectifieuses et les appareils numériques tels les tours et centres d'usinage.

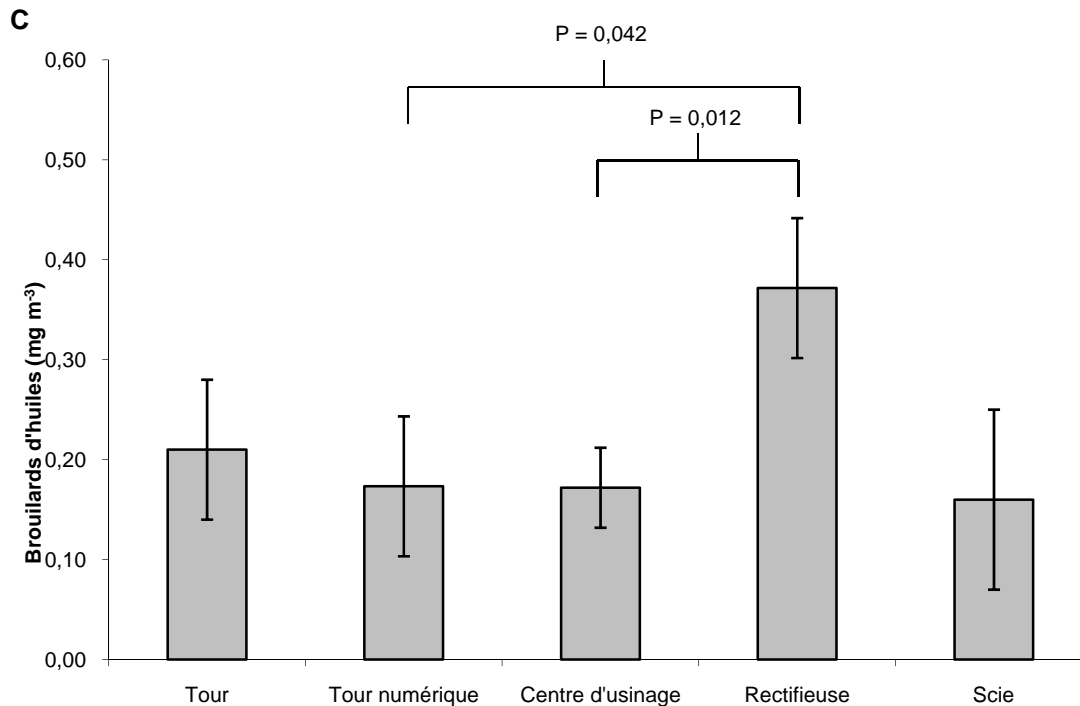


Figure 6 : Comparaison entre les concentrations de brouillards d'huile en fonction des différents types d'équipements utilisés pour la transformation du métal (Tour n=6; Tour numérique n=6; Centre d'usinage n=21; Rectifieuse n=6, Scie n=3).

4.3 Santé respiratoire des travailleurs

Il est déjà établi que dans certaines parties du monde, des employés œuvrant dans les usines de transformation de métaux et exposés aux fluides de coupe ont souffert de problèmes respiratoires et cutanés. En 2000, cette même industrie employait plus de 8000 personnes uniquement au Québec. Cette étude se voulait donc être un comparatif de l'état de santé des travailleurs au Québec.

Nous jugeons que cette étude affiche un portrait représentatif des travailleurs québécois exposés aux fluides de coupe, ayant analysé un total de 209 travailleurs, répartis dans 7 des 17 régions administratives du Québec. De plus, les travailleurs investigués œuvraient pour la plupart dans des PME, ce qui correspond bien à la réalité actuelle de cette province.

Les différentes données obtenues démontrent qu'il n'y a pas d'évidence de pathologie respiratoire attribuable à l'environnement de travail des travailleurs de l'étude. Tel qu'illustré au Tableau 10, les valeurs de spirométrie par secteurs sont toutes dans les limites de la normale. Il n'y avait, lorsque évalués individuellement, que sept patients avec des critères de MPOC, dont les plus sévères avaient une histoire tabagique positive, alors qu'il n'y avait pas de syndrome restrictif. Aucun cas d'alvéolite allergique extrinsèque n'a été décelé.

4.4 Questionnaire

En ce qui a trait au questionnaire respiratoire auquel les travailleurs ont répondu, deux faits importants en ressortent. Premièrement, les symptômes de toux étaient beaucoup plus fréquents en période hivernale (19,62% vs 10,76%), élément possiblement attribuable au manque d'aération des espaces de travail, augmentant ainsi les concentrations de poussières, de bioaérosols, de brouillards d'huile. Par contre, plusieurs facteurs confondants sont possibles lors de cette période, dont la prévalence augmentée de surinfections et le manque d'humidité secondaire au chauffage des bâtiments. Lorsque questionnés sur leurs symptômes respiratoires, environ 13% des travailleurs éprouvaient des symptômes respiratoires actuels (27/209) dont 60% (16/27) semblaient s'améliorer à l'arrêt du travail. En combinant ces chiffres aux travailleurs se plaignant de dyspnée (8/209) ou de sibilances (21/209) reliées au travail, un total de 34 personnes sur 209 (16%) affirmant avoir souffert de troubles respiratoires à un moment ou à un autre qu'ils corrélaient à leur travail.

Il est important de noter que les participants à l'étude ont une histoire tabagique supérieure à ce qui est retrouvé dans la population québécoise actuelle. En effet, 48% affirmaient avoir une histoire tabagique ancienne (22,5%) ou active (25,3%), alors que la population du Québec comptait seulement 19% de fumeurs âgés de 15 ans et plus en 2008 (ESUTC, 2008). Ce facteur entraînait d'ailleurs un risque relatif de 8,72 en ce qui a trait aux critères cliniques de bronchite chronique. Donc, en tenant compte de l'importante exposition primaire et secondaire des travailleurs de l'étude au tabac, il n'est pas possible d'expliquer en totalité les symptômes reliés au travail ressentis par ceux-ci, mais à tout le moins en ressortir un biais potentiel à ces résultats.

4.5 Spirométrie et exposition

Les valeurs de spirométrie de la grande majorité des participants étaient normales. Dans les valeurs statistiquement significatives attendues, une corrélation négative statistiquement significative est ressortie entre la quantité de moisissures dans les fluides et les valeurs de Tiffeneau, mais non les valeurs de VEMS. Cette corrélation n'a cependant pu être établie avec la quantité de moisissures contenues dans l'air. De plus, une réponse immune significativement plus grande chez les travailleurs témoins par rapport aux contrôles a été notée avec l'antigène *Pseudomonas*, réaction également démontrée dans d'autres études (Fishwick, 2005). Un lien n'a pas pu par contre être établi avec le décompte des bactéries ni avec les performances à la spirométrie. Un tel résultat peut soulever des questions, notamment à savoir si les travailleurs québécois sont davantage exposés à ce pathogène dans leur milieu de travail comparativement aux autres études concernant les fluides de coupe où les mycobactéries sont davantage mises en cause. Une étude portant sur la quantification de ce groupe de bactéries en particulier dans les usines de fluides de coupe québécoises et leur provenance pourrait être menée.

4.6 Santé cutanée

Finalement, des données intéressantes concernant la santé cutanée des travailleurs sont également ressorties. Cent trente-sept travailleurs sur 209 (65%) affirmaient avoir divers

problèmes cutanés, dont 65% d'entre eux voyaient une amélioration à l'arrêt du travail. Dans le même ordre d'idées, 8 personnes ayant nécessité une visite chez un dermatologue dont un seul s'est vu diagnostiquer une pathologie cutanée possiblement secondaire au travail, consistant principalement en des dermatites de contact, qui pouvaient être d'origine irritative ou allergique. Une corrélation avec la flore retrouvée dans les fluides et les bioaérosols est possible, mais non confirmée à partir des données recueillies. Une dermatite irritative secondaire aux nombreux agents utilisés dans les fluides de coupe (huile, anti-microbiens, anti-corrosifs) ou encore secondaire aux savons utilisés est également possible, mais vue la grande variété de produits utilisés d'une usine à l'autre, aucun lien clair n'a pu être établi. Il est important de souligner que des 137 personnes ayant des problèmes dermatologiques, il n'y avait que 30% d'entre elles qui utilisaient des gants imperméables et 38% des crèmes protectrices.

Une telle affirmation permet de remettre à l'avant-plan la nécessité de mesures de prévention efficaces, mesures aussi simples que le port de gants et l'usage de crème protectrice. Selon Burgess (Burgess, 1995), les programmes de contrôles exceptionnels de contamination microbiennes maintiennent des concentrations inférieures à 5×10^4 unités formatrices de colonies/ml, ceux de contrôles raisonnables, de l'ordre de 10^6 UFC/ml. Dans l'étude actuelle, uniquement pour le décompte de bactéries dans les fluides, 20 usines sur 25 ont un décompte se chiffrant à plus de 10^6 UFC/ml, ce qui sous-entend que malgré l'absence de pathologies respiratoires évidentes secondaires au travail, des améliorations de l'environnement de travail méritent d'être posées. Un nettoyage des systèmes de FC, tel que démontré par notre équipe dans une étude antérieure (Veillette, 2004), semble peu efficace pour contrer le problème de contamination bactérienne. Des modifications sur le contenu des fluides de coupe pourraient être bénéfiques, bien que l'ajout de biocides et autres ou encore la cessation d'utilisation de FC hydrosolubles ne sont pas sans conséquences sur la qualité des fluides ou même sur l'impact dermatologique. Pour ce qui est des bioaérosols, la recrudescence des symptômes chez les travailleurs en hiver tend à démontrer que des systèmes de ventilation efficace demeurent toujours essentiels. De plus, surtout aux endroits situés à proximité des machines de coupe, l'automatisation de certaines manipulations, l'isolement du matériel ainsi que l'usage de masques de protection respiratoire de façon rigoureuse ne sont que quelques pistes de solutions.

5. CONCLUSION

La caractérisation de la biodiversité des FC à l'aide de la culture et du PCR DGGE confirme les observations présentées dans la littérature alléguant que la diversité des microorganismes dans ce type d'échantillons est relativement limitée (Mattsby-Baltzer, 1989, Van der Gast, 2003). Il est intéressant de noter que quelques espèces bactériennes identifiées par le séquençage des bandes DGGE n'ont pas été isolées par culture et que plusieurs des isolats bactériens ne sont pas toujours présents dans les gels DGGE. Il est connu que la culture sous-estime la quantité et la diversité de microorganismes dans les échantillons environnementaux (Amann, 1995). Cependant, nous croyons que la culture demeure complémentaire aux approches moléculaires de biodiversité étant donné qu'elle permet parfois la récupération d'espèces présentes en quantité trop faible pour être détectées par les méthodes moléculaires.

Aucune relation significative n'a pu être déterminée entre la biodiversité des échantillons de FC et le type de FC et/ou le type d'équipement. Il semble que *P. pseudoalcaligenes* et *O. anthropi* sont possiblement présents dans la majorité des fluides, mais il est impossible à ce stade de prédire quels microorganismes coloniseront certains types de FC particuliers. Les espèces majoritairement retrouvées lors de cette étude étaient présentes en grandes concentrations, soit 10^4 à 10^9 copies de 16S/ml. Des études plus poussées seraient nécessaires afin de décrire si l'addition de *M. immunogenum* est susceptible d'engendrer des maladies respiratoires tel l'alvéolite allergique extrinsèque.

Les bioaérosols à proximité des équipements d'usinage utilisant des FC solubles ont été caractérisés. De faibles concentrations d'endotoxines, de poussières inhalables et de brouillards d'huile ont été observées dans la majorité des sites à l'étude et ce, même si les taux de changements d'air sont inférieurs aux seuils suggérés. De plus, aucune corrélation n'a été trouvée entre les paramètres de qualité de l'air, les types de FC et les équipements sur lesquels ils sont utilisés. Cependant, les résultats suggèrent que le type d'équipement utilisé ainsi que le confinement peut avoir une influence sur la qualité de l'air.

La présence de *M. immunogenum* dans les échantillons d'air n'a pas pu être décelée. Par contre, *P. pseudoalcaligenes* a été trouvé dans l'air de plusieurs sites et ce, en concentrations significatives. Les risques de maladies pulmonaires dues à ces microorganismes ne sont pas clairs, à l'exception du risque associé aux endotoxines. L'évaluation du risque associé à une exposition prolongée à des concentrations importantes de *P. pseudoalcaligenes* dans l'air pourrait être approfondie.

Le message majeur de cette étude est que les travailleurs en contact avec les fluides de coupe de métaux présentent une santé respiratoire et cutanée très bonne et que les problèmes, si présents, sont des événements ponctuels, et non généralisés.

6. APPLICABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats de cette étude pan-qubécoise et leur applicabilité se résument comme suit :

- Des concentrations importantes de microorganismes furent observées dans la plupart des échantillons de fluide (jusqu'à 10^9 totales et cultivables).
 - Un entretien des systèmes et des changements dans les types de fluides sont essentiels. Le suivi régulier de la contamination microbienne demeure une action très importante.
- Les concentrations de *Mycobacterium immunogenum* étaient significatives seulement dans 2 échantillons.
 - Il est très important d'effectuer le dépistage précoce de *M. immunogenum*, car lorsque cette bactérie est présente, elle domine la microflore.
- *Pseudomonas pseudoalcaligenes* et ses proches parents ont été observés dans une grande proportion de fluides.
 - Les bactéries à gram négatif sont les colonisateurs principaux des fluides. L'exposition aux endotoxines et aux pathogènes opportunistes est à surveiller chez les travailleurs.
- Malgré des fluides fortement colonisés, la qualité microbiologique de l'air était très bonne (max de 5 000 UFC bactéries /m³ d'air et très peu de moisissures).
 - Les conditions de ventilation et de machinage ne semblent pas générer beaucoup de bioaérosols.
- Les taux de changements d'air des bâtiments visités étaient pour la plupart sous le standard recommandé (RSST, 2008) de quatre changements d'air par heure.
 - Un suivi rigoureux des normes de ventilation est recommandé ainsi l'utilisation de systèmes de ventilation locale d'aspiration à la source.
- Les poussières inhalables étaient sous les limites d'expositions suggérées par l'ACGIH.
 - Les usines de machinage ne présentent pas de problématique de poussières.
- Les poussières inhalables étaient significativement plus élevées en présence des tours d'usinage conventionnels lorsque comparées aux autres types d'équipements.
 - Cette observation est probablement due au manque de confinement de ces appareillages. On remarque aussi que les équipements les mieux confinés (tours numériques et centre d'usinage) génèrent moins de poussières inhalables. Il semble donc qu'un meilleur confinement et l'élimination de l'utilisation de l'air comprimé pourraient être des mesures pour réduire les concentrations de poussières inhalables.
- La taille des aérosols générés se situe dans l'intervalle des particules respirables.
 - Sachant que les particules générées sont très petites, il est important de maintenir des taux d'exposition bas.

- Les concentrations en endotoxines et en brouillards d'huile étaient plus faibles que ce qui a été décrit dans la littérature pour ce genre d'environnement.
 - Le maintien des bonnes conditions de ventilation et de confinement des appareils assure la faible contamination par les endotoxines et les huiles.
- Des 137 travailleurs ayant déclaré des problèmes cutanés au questionnaire, seulement 42 d'entre eux faisaient usage de gants imperméables (30%) et 53 de crème protectrice (38%).
 - Il est très important d'appliquer les méthodes de protection cutanée de base (gants et crème protectrice).
- Un seul travailleur s'est vu diagnostiquer par le dermatologue une pathologie cutanée possiblement reliée au travail (dermatite de contact irritative ou allergique).
 - Ce nombre est très encourageant et suggère que les travailleurs du Québec ne présentent pas de lésions importantes liées au travail avec les fluides de coupe.
- Sept travailleurs correspondaient à des valeurs de MPOC, dont 2 légères, 4 modérées et une sévère. Aucune spirométrie ne rencontrait les critères de syndrome restrictif.
 - Le tabagisme important chez cette population de travailleurs explique ces observations.
- Une corrélation faible mais statistiquement significative ($p < 0,001$, $R^2 = 0,46$) fut observée entre les concentrations de bactéries présentes dans les fluides et dans l'air.
 - Ceci suggère que la concentration de bactéries dans les FC peut influencer le degré d'exposition des travailleurs.
- Il semble que les tours à contrôles numériques produisent une plus grande quantité d'endotoxines que les autres types d'équipements servant à la transformation du métal. Par contre, la différence est seulement significative lorsque comparée aux centres d'usinage numérique et aux rectifieuses.
- Des corrélations significatives inattendues se sont également produites lorsque les CVF et VEMS ont été associés aux valeurs de poussières inhalées. Effectivement, selon les données obtenues, une augmentation de poussières inhalées augmenterait de façon statistiquement significative les valeurs de CVF et de VEMS.

7. RETOMBÉES ÉVENTUELLES

Cette étude permet de faire la lumière sur la santé respiratoire, cutanée et l'exposition des travailleurs en contact avec les fluides de coupe de métaux au Québec. Bien que non exhaustive, cette étude se voulait une première et a permis de cibler les forces et les faiblesses de cette industrie très importante. Les résultats pourront servir de base de comparaison de la salubrité des fluides et du suivi de l'hygiène du travail.

8. LISTE DES ARTICLES ET DES COMMUNICATIONS

Gilbert Y, Veillette M, Duchaine C. (2009) Metalworking fluids biodiversity characterization. J Appl Microbiol. 2010 Feb;108(2):437-49. Epub 2009 Jul 15

Gilbert Y, Veillette M, Mériaux A, Lavoie J, Cormier Y, Duchaine C. (2010) Metalworking Fluids Related Aerosols in Machining Plants. J Occup Environ Hyg. 2010 May;7(5):280-9.

Gilbert Y, Veillette M, Lavoie J, Cormier Y, Duchaine C (2009). Workers' Exposure to Bioaerosols from Soluble Metalworking Fluids. American Thoracic Society San Diego, May 2009.

Veillette M, Gilbert Y, Touzel C, Mériaux A, Lavoie J, Cormier Y, Duchaine C (2009). Exposition des travailleurs Québécois aux Fluides de coupes de métaux. Réunion annuelle conjointe Association des pneumologues de la province de Québec et Réseau en santé respiratoire du FRSQ, Montréal, novembre 2009.

Duchaine C, Veillette M and Gilbert Y (2008). Comparison of Molecular Biodiversity approaches and Culture for Microbial Characterization of Metalworking Fluids. 3rd Symposium on the Assessment and Control of Metal Removal Fluids, Dearborn, MI October 5-8 2008

Gilbert Y, Veillette M, Duchaine C (2008). Metalworking Fluid Biodiversity Comparison by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. American Society for Microbiology 108th General Meeting, Boston, MA June 1-5 2008.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrams, L., Seixas, N., Robins, T., Burge, H., Muilenberg, M., & Franzblau, A. (2000). Characterization of metalworking fluid exposure indices for a study of acute respiratory effects. *Appl Occup Environ Hyg*, 15(6), 492-502.
- ACGIH (2008). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- Alomar, A. (1994). Occupational skin disease from cutting fluids. *Dermatol Clin* 12(3) : 537-546.
- Alomar, A., Conde-salazar, L., Romaguera, C. (1985). Occupational dermatoses from cutting oils. *Contact Dermatitis* 12 : 129-138.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143–169.
- Ameille, J., Wild, P., Choudat, D., Ohl, G., Vaucouleur, J. F., Chanut, J. C., & Brochard, P. (1995). Respiratory symptoms, ventilatory impairment, and bronchial reactivity in oil mist-exposed automobile workers. *Am J Ind Med*, 27(2), 247-256.
- American Society for testing and materials (ASTM) (1993). Standard Test Methods for Determining Air Change in a Single Zone by Mean of Tracer Gas Dilution. Designation E741-93. Philadelphia, PA, pp: 1-16.
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M., & Munch, J. C. (2002). "Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification." *J Microbiol Methods* 49(3): 235-45.
- Bernstein, D. I., Lummus, Z. L., Santilli, G., Siskosky, J., & Bernstein, I. L. (1995). Machine operator's lung. A hypersensitivity pneumonitis disorder associated with exposure to metalworking fluid aerosols. *Chest*, 108(3), 636-641.
- Bukowski JA.(2003) Review of respiratory morbidity from occupational exposure to oil mists. *Appl Occup Environ Hyg*. 2003 Nov;18(11):828-37.
- Burgess (1995), W.A. Recognition of Health hazards in Industry. A Wiley-Interscience publication, second ed., New- York, p 538.
- Carson, L. A., Petersen, N. J., Favero, M. S. & Agüero, S. M. (1978). "Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants." *Appl Environ Microbiol* 36(6): 839-46
- Carson, L. A., Cusick, L. B., Bland, L. A. & Favero, M. S. (1988). "Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers." *Appl Environ Microbiol* 54(7): 1756-60.

- Carson, L.A., Bland, L. A., Cusick, L. B., Good, R. C., Favero, M. S., Bolan, G. A. & Reingol, A. L. (1988). "Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers." *Appl Environ Microbiol* 54(12): 3122-5.
- Chan. (1990). Size Characteristics of Machining Fluids Aerosols in an Industrial Metalworking Environment. *Appl Occup Environ Hyg*(5), 162-170.
- Cormier, Y., Gagnon, L., Berube-Genest, F. & Fournier, M. (1988). "Sequential bronchoalveolar lavage in experimental extrinsic allergic alveolitis. The influence of cigarette smoking." *Am Rev Respir Dis* 137(5): 1104-9
- Cormier, Y., Belanger, J., LeBlanc, P. & Laviolette, M (1986). "Bronchoalveolar lavage in farmers' lung disease: diagnostic and physiological significance." *Br J Ind Med* 43(6): 401-5.
- Cormier Y, Israël-Assayag E, Duchaine C (1998). Hypersensitivity pneumonitis in peat moss processing plant workers. *Am J Respir Crit Care Med* 158 : 412-417
- Cormier, Y., Laviolette, M., Cantin, A., Tremblay, G. M. & Begin, R. (1993). "Fibrogenic activities in bronchoalveolar lavage fluid of farmer's lung." *Chest* 104(4): 1038-42.
- De Boer, E.M., van Ketel, W.G., Bruynzeel, D.P. (1989). Dermatoses in metal workers. I. Irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 20 : 212-218.
- De Boer, E.M., van Ketel, W.G., Bruynzeel, D.P. (1989). Dermatoses in metal workers. II. Allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 20 : 280-286.
- Detwiler-Okabayashi, K. A., & Schaper, M. M. (1996). Respiratory effects of a synthetic metalworking fluid and its components. *Arch Toxicol*, 70(3-4), 195-201.
- Duchaine, C, Veillette M, Cormier, Y, Lavoie, J, Desjardins F & Bouzid, H. (2003). Analyse microbiologique des fluides de coupe de métaux. Étude exploratoire. Rapport de l'IRSST R-341, 34 pages.
- Duchaine, C., Meriaux, A., Brochu, G. & Cormier, Y. (1999a). "Airborne microflora in Quebec dairy farms: lack of effect of bacterial hay preservatives." *Am Ind Hyg Assoc J* 60(1): 89-95.
- Duchaine, C., Meriaux, A., Brochu, G., Bernard, K. & Cormier, Y. (1999b). "Saccharopolyspora rectivirgula from Quebec dairy barns: application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease." *J Med Microbiol* 48(2): 173-80.
- Duchaine, C., Meriaux, A., Thorne, P. S. & Cormier, Y. (2000a). "Assessment of particulates and bioaerosols in eastern Canadian sawmills." *Aihaj* 61(5): 727-32.
- Duchaine, C., Grimard, Y. & Cormier, Y. (2000b). "Influence of building maintenance, environmental factors, and seasons on airborne contaminants of swine confinement buildings." *Aihaj* 61(1): 56-63.
- Duchaine, C., Thorne, P. S., Grimard, Y., Whitten, P. & Cormier, Y. (2001). "Comparison of endotoxin exposure assessment by bioaerosol impinger and filter-sampling methods." *Appl Environ Microbiol* 67(6): 2775-80.

- Duroche, L.P., Paquette, N. (1986). Huile de coupe et dermatoses cutanées. *Union Med can* 115 : 730-733.
- Dutkiewicz, J., Skorska, C., Dutkiewicz, E., Matuszyk, A., Sitkowska, J., & Krysinska-Traczyk, E. (2001). Response of sawmill workers to work-related airborne allergens. *Ann Agric Environ Med*, 8(1), 81-90.
- Eduard, W. (1996). "Measurement methods and strategies for non-infectious microbial components in bioaerosols at the workplace." *Analyst* 121(9): 1197-201.
- Eduard, W. and D. Heederik (1998). "Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments." *Am Ind Hyg Assoc J* 59(2): 113-27.
- Eisen, E. A., Smith, T. J., Kriebel, D., Woskie, S. R., Myers, D. J., Kennedy, S. M., Shalat, S., & Monson, R. R. (2001). Respiratory health of automobile workers and exposures to metal-working fluid aerosols: lung spirometry. *Am J Ind Med*, 39(5), 443-453.
- Embil, J., Warren, P., Yakrus, M., Stark, R., Corne, S., Forrest, D., & Hershfield, E. (1997). Pulmonary illness associated with exposure to *Mycobacterium-avium* complex in hot tub water. Hypersensitivity pneumonitis or infection? *Chest*, 111(3), 813-816.
- ESUTC «Enquête de surveillance de l'usage du tabac au Canada 2008» {En ligne} http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/tobac-tabac/research-recherche/stat/ctums-esutc_2008-fra.php
- Fisher, A. A. (1979). Allergic contact dermatitis of the hands due to industrial oils and fluids. *Cutis* 23: 131, 134, 136, passim.
- Fishwick D, Tate P and all. (2005) Respiratory symptoms, immunology and organism identification in contaminated metalworking fluid workers. What you see is not what you get. *Occupational Medicine*, 55:238–241
- Forest, P., Mériaux, A., Barbeau, J., & Duchaine C. (2001) Bioaerosol exposure in dental offices: usefulness of culture methods in comparison with fluorescence microscopy for assessment of exposure. in American Society for Microbiology 101st General Meeting. Orlando, FL, USA.
- Fox, J., Anderson, H., Whitten, P., Gruetzmacher, G., Hanrahan, L. & Fink, J. (1999). "Metal working fluid-associated hypersensitivity pneumonitis: an outbreak investigation and case-control study." *Am J Ind Med* 35(1): 58-67
- Freeman, A., Lockey, J., Hawley, P., Biddinger, P. & Trout, D. (1998). "Hypersensitivity pneumonitis in a machinist." *Am J Ind Med* 34(4): 387-92.
- Geier, J., Lessmann, H., Frosch, P.J., et al. (2003). Patch testing with components of water-based metalworking fluids. *Contact Dermatitis* 49 : 85-90.
- Goh, C. L., & Gan, S. L. (1994). The incidence of cutting fluid dermatitis among metalworkers in a metal fabrication factory: a prospective study. *Contact Dermatitis*, 31(2), 111-115.

- Gordon, T (2004). MetalWorking Fluid--The Toxicity of a Complex Mixture. *J Toxicol Environ Health A*. 67(3): 209-19.
- Gordon, T., & Galdanes, K. (1999). Factors contributing to the acute and subchronic adverse respiratory effects of machining fluid aerosols in guinea pigs. *Toxicol Sci*, 49(1), 86-92.
- Gorny, R.L., Szponar, B., Larsson, L., Pehrson, C., Prazmo, Z. and Dutkiewicz, J. (2004) Metalworking fluid bioaerosols at selected workplaces in a steelworks. *Am J Ind Med* 46, 400–403.
- Grattan, C. E., English, J. S., Foulds, I. S., & Rycroft, R. J. (1989). Cutting fluid dermatitis. *Contact Dermatitis*, 20(5), 372-376.
- Greaves, I. A., Eisen, E. A., Smith, T. J., Pothier, L. J., Kriebel, D., Woskie, S. R., Kennedy, S. M., Shalat, S., & Monson, R. R. (1997). Respiratory health of automobile workers exposed to metal-working fluid aerosols: respiratory symptoms. *Am J Ind Med*, 32(5), 450-459.
- Gruvberger, B., Isaksson, M., Frick, M., et al. (2003). Occupational dermatoses in a metalworking plant. *Contact Dermatitis* 48 : 80-86.
- Hands, D., Sheehan, M.J., Wong, B. & Lick, H.B. (1996) Comparison of Metalworking Fluid Mist Exposures from Machining with Different Levels of Machine Enclosure. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 57 (12): 1173 – 1178.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. & Jasper, S. (1977). "Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy." *Appl Environ Microbiol* 33(5): 1225-8.
- Hodgson, G. (1976). Eczemas associated with lubricants and metal working fluids. *Dermatology Digest* October : 11-15.
- Hodgson, M. J., Bracker, A., Yang, C., Storey, E., Jarvis, B. J., Milton, D., Lummus, Z., Bernstein, D., & Cole, S. (2001). Hypersensitivity pneumonitis in a metal-working environment. *Am J Ind Med*, 39(6), 616-628.
- Hüner, A., Fartasch, M., Hornstein, O.P., Diepgen, T.L. (1994) The irritant effect of different metalworking fluids. *Contact Dermatitis* 31 : 220-225.
- Kadyck, D.L., McCarter, K., Achen, F., Belsito, D.V. (2003). Quality of life in patients with allergic contact dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 49 : 1037-1048.
- Kahana, L. M., Kay, J. M., Yakrus, M. A., & Wasserman, S. (1997). Mycobacterium avium complex infection in an immunocompetent young adult related to hot tub exposure. *Chest*, 111(1), 242-245.
- Kennedy, S. M., Greaves, I. A., Kriebel, D., Eisen, E. A., Smith, T. J., & Woskie, S. R. (1989). Acute pulmonary responses among automobile workers exposed to aerosols of machining fluids. *Am J Ind Med*, 15(6), 627-641.
- Kennedy, S. M., Chan-Yeung, M., Teschke, K. & Karlen, B. (1999). "Change in airway responsiveness among apprentices exposed to metalworking fluids." *Am J Respir Crit Care Med* 159(1): 87-93.

- Khalil, N., Churg, A., Muller, N. and O'Connor, R. (2007) Environmental, inhaled and ingested causes of pulmonary fibrosis. *Toxicol Pathol* 35, 86–96.
- Kox, L. F., van Leeuwen, J., Knijper, S., Jansen, H. M. & Kolk, A. H. (1995). "PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples." *J Clin Microbiol* 33(12): 3225-33.
- Kreiss, K., & Cox-Ganser, J. (1997). Metalworking fluid-associated hypersensitivity pneumonitis: a workshop summary. *Am J Ind Med*, 32(4), 423-432.
- Lillienberg, L., Burdorf, A., Mathiasson, L. & Thorneby, L. (2008) Exposure to Metalworking Fluid Aerosols and Determinants of Exposure. *Ann Occup Hyg*.
- Laitinen, S. et al. (1999) Endotoxins and IgG antibodies as indicators of occupational exposure to the microbial contaminants of metal-working fluids. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 72 (7): 443-450.
- Lalancette, M., Carrier, G., Laviolette, M., Ferland, S., Rodrigue, J., Begin, R., Cantin, A. & Cormier Y. (1993) Farmer's lung. Long-term outcome and lack of predictive value of bronchoalveolar lavage fibrosing factors. *Am Rev Respir Dis*. Jul;148(1):216-21.
- Lange, J. L., Thorne, P. S. & Lynch, N. (1997). "Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria." *Appl Environ Microbiol* 63(4): 1557-63.
- Lavoie, J. (2000). Évaluation de l'exposition aux bioaérosols dans les stations de traitement des eaux usées. *Vecteur environnement* 33(3) :43-50.
- Lonon, M.K., Abanto, M. and Findlay, R.H. (1999) A pilot study for monitoring changes in the microbiological component of metalworking fluids as a function of time and use in the system. *Am Ind Hyg Assoc J* 60, 480.
- Lonon, M.K. (1995) Bacteria in metalworking fluid. In: *The industrial metalworking environment - assesment & control*, Dearborn, Michigan, pp. 231-233.
- Mattsby-Baltzer, I., Edebo, L., Jarvholm, B., & Lavenius, B. (1989). Serum antibodies to *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in metal workers exposed to infected metal-working fluids. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 88(3), 304-311.
- Mattsby-Baltzer, I., Sandin, M., Ahlstrom, B., Allenmark, S., Edebo, M., Falsen, E., Pedersen, K., Rodin, N., Thompson, R. A., & Edebo, L. (1989). Microbial growth and accumulation in industrial metal-working fluids. *Appl Environ Microbiol*, 55(10), 2681-2689.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. and Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 795–799.
- Meding, B. (1996). Occupational contact dermatitis from tertiary-butylhydroquinone (TBHQ) in a cutting fluid. *Contact Dermatitis*, 34(3), 224.

- MMWR. (1996) Biopsy-Confirmed Hypersensitivity Pneumonitis in Automobile Production Workers Exposed to Metalworking Fluids - Michigan, 1994-1995. *MMWR*, 45(28), 606-610.
- MMWR. (2002) Respiratory illness in workers exposed to metalworking fluid contaminated with nontuberculous mycobacteria--Ohio, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 51(16), 349-352.
- Moore, J. S., Christensen, M., Wilson, R. W., Wallace, R. J., Jr., Zhang, Y., Nash, D. R. & Shelton, B. (2000). "Mycobacterial contamination of metalworking fluids: involvement of a possible new taxon of rapidly growing mycobacteria." *Aihaj* 61(2): 205-13.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Appl Environ Microbiol* 59(3): 695-700.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nu`bel, U., Santegoeds, C., Schafer, H. and Wawer, C. (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In *Molecular Microbial Ecology Manual* ed. Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. and van Elsas, J.D. pp.743–770. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers.
- NIOSH (1998) Criteria for a recommended standard: Occupationnal exposure to metalworking fluids. DHHS (NIOSH) Publications, 1998.
- Oudyk J, Haines AT, D'Arcy J (2005). Investigating respiratory responses to metalworking fluid exposure. *Appl Occup Environ Hyg* 2003 Nov;18(11):939-46.
- O'Brien DM.(2003) Aerosol mapping of a facility with multiple cases of hypersensitivity pneumonitis: demonstration of mist reduction and a possible dose/response relationship. *Appl Occup Environ Hyg* ;18(11):947-52.
- Passman, F.J. & Rossmoore, H. (2002) Reassessing the health risks associated with employee exposure to metalworking microbes. *Lub. Eng.* 58 (7): 30-38.
- Pryce, D.W., Irvine, D., English, J.S.C., Rycroft, R.J.G (1989). Soluble oil dermatitis : a review. *J Soc Occup Med* 39 : 93-98.
- Pryce, D.W., Irvine, D., English, J.S.C., Rycroft, R.J.G (1989). Soluble oil dermatitis : a follow-up study. *Contact Dermatitis* 21 :28-35.
- Règlement sur la santé et la sécurité du travail. (CSST) (2008), S2.1, r.19.01. Éditeur officiel du Québec, 220. p.
- Robertson, A.S., Weir, D.C., Burge, P.S. (1998). "Occupational Asthma Due to Oil Mists". *Thorax* 43:200-205.
- Robins, T., Seixas, N., Franzblau, A., Abrams, L., Minick, S., Burge, H., & Schork, M. A. (1997). Acute respiratory effects on workers exposed to metalworking fluid aerosols in an automotive transmission plant. *Am J Ind Med*, 31(5), 510-524.

- Rosenman, K. D., Reilly, M. J. & Kalinowski, D (1997). "Work-related asthma and respiratory symptoms among workers exposed to metal-working fluids." *Am J Ind Med* 32(4): 325-31.
- Rycroft, R. J. (1980). Bacteria and soluble oil dermatitis. *Contact Dermatitis*, 6(1), 7-9.
- Sabina, L. R., and H. Pivnick. (1956). Oxidation of solubles oil emulsions and emulsifiers by *Pseudomonas oleovorans* and *Pseudomonas formicans*. *Appl. Microbiol.*(4), 171-175.
- Shelton, B. G., Flanders, W. D., & Morris, G. K. (1999). *Mycobacterium* sp. as a possible cause of hypersensitivity pneumonitis in machine workers. *Emerg Infect Dis*, 5(2), 270-273.
- Shvedova, A. A., Kisin, E., Kisin, J., Castranova, V., & Kommineni, C. (2001). Elevated oxidative stress in skin of B6C3F1 mice affects dermal exposure to metal working fluid. *Toxicol Ind Health*, 16(7-8), 267-276.
- Tant, C. O., and E. O. Benett. (1956). The isolation of pathogenic bacteria from used emulsion oils. *Appl. Microbiol.*(4), 332-338.
- Thornburg, J., & Leith, D. (2000). Size distribution of mist generated during metal machining. *Appl Occup Environ Hyg*, 15(8), 618-628.
- Thorne, P. S. (1996). Environmental Assessment of Aerosols, Bioaerosols, and Airborne Endotoxins in a Machinning Plant. *Aihaj*, 57, 1163-1167.
- van der Gast, C.J., Whiteley, A.S., Lilley, A.K., Knowles, C.J. and Thompson, I.P. (2003) Bacterial community structure and function in a metal-working fluid. *Environ Microbiol* 5, 453-461.
- Veillette, M., Thorne, P.S., Gordon, T., & Duchaine, C. (2004) Six Month Tracking of Microbial Growth in a Metalworking Fluid After System Cleaning and Recharging. *Ann Occup Hyg*. 2004 Aug;48(6):541-6
- Veillette, M., Mériaux, A., Dutil, S., & Duchaine, C. (2004) Improved Air Sampling for Molecular Biology Analysis. In American Society for Microbiology 104th general Meeting. New Orleans, LS, USA
- Veillette, M., Pagé, G., Thorne, P. S., & Duchaine, C (2005) Recovery and Quantification of *Mycobacterium Immunogenum* DNA from Metalworking Fluids Using Dual-Labeled Probes. *Journal of ASTM International (JAI)*, 2(4), ONLINE.
- Veillette, M., Pagé, G., Thorne, P. S. and Duchaine, C. (2008) Real-time PCR quantification of *Mycobacterium immunogenum* in used metalworking fluids. *J Occup Envir Hyg*.5(12):755-60.
- Wallace Jr, R. J., Jr., Zhang, Y., Wilson, R. W., Mann, L., & Rossmore, H. (2002). Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5580-5584.
- Wilson, R. W., Steingrube, V. A., Bottger, E. C., Springer, B., Brown-Elliott, B. A., Vincent, V., Jost, K. C., Jr., Zhang, Y., Garcia, M. J., Chiu, S. H., Onyi, G. O., Rossmore,

- H., Nash, D. R., & Wallace, R. J., Jr. (2001). *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 5), 1751-1764.
- Woskie, S. R., Smith, T. J., Hallock, M. F., Hammond, S. K., Rosenthal, F., Eisen, E. A., Kriebel, D., & Greaves, I. A. (1994). Size-selective pulmonary dose indices for metalworking fluid aerosols in machining and grinding operations in the automobile manufacturing industry. *Am Ind Hyg Assoc J*, 55(1), 20-29.
 - Yu, Z. and Morrison, M. (2004) Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 70, 4800–4806.
 - Zacharisen, M. C., Kadambi, A. R., Schlueter, D. P., Kurup, V. P., Shack, J. B., Fox, J. L., Anderson, H. A. & Fink, J. N. (1998). "The spectrum of respiratory disease associated with exposure to metal working fluids." *J Occup Environ Med* 40(7): 640-7.
 - Zeka A., Kriebel D., Kennedy S. M. & Wegman D. H. (2003) Role of underlying pulmonary obstruction in short-term airway response to metal working fluid exposure: a reanalysis. *Am J Ind Med*. 2003 Oct;44(4):447-8.
 - Zissu, D. (2002). The sensitizing potential of various biocides in the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis* 46 : 224-227.