

Données de validation

Numéro de fiche	Titre
METROPOL_454	Endotoxines M-454

Données de validation principales

Généralités

Substance _____ Endotoxines

Choix du domaine de validation :

La norme concernant les endotoxines [1] ne donnant pas de recommandations particulières quant à l'obtention de données de validation, une méthodologie interne a été utilisée. Celle-ci consiste en une approche globalisant la variabilité induite par l'ensemble des facteurs analytiques (prélèvement et analyse), en s'inspirant des préconisations des documents FD T 90-465-1 et NF T90-210. [2-3]

L'incertitude globale associée à l'ensemble de la méthode de mesure (prélèvement et analyse) a été réalisée pour trois natures de filtres (FV mais aussi PC et PTFE) et pour trois niveaux de concentrations en endotoxines ciblées : ~20 ; 1000 et >10000 UE/m³. Ces valeurs ont été choisies car représentant 0,1 ; 1 et > 10 fois les 1^{er} et 2^e niveaux des valeurs guides qui sont respectivement de 200 UE/m³ et 1000 UE/m³, voir **HST 239**¹. La méthode a été validée bien au-delà des 1000 UE/m³ au vu de la réalité des concentrations parfois retrouvées en atmosphère professionnelle.

¹<https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=NT%2025>

Dispositif de prélèvement :

La validation de méthode a été réalisée avec des cassettes fermées de 37 mm de diamètre, constituées de 3 pièces (pièce d'entrée, pièce intermédiaire et pièce de sortie), en polystyrène transparent.

3 natures de supports de collecte ont été étudiés : filtres en fibres de verre apyrogène (FV, Whatman GF/B 1,0 µm), polycarbonate (PC, Whatman Nuclepore 0,8 µm), PTFE (Millipore Fluoropore 1,0 µm)

Remarque : Les filtres en fibres de verre doivent préalablement être dépyrogénéisés dans une étuve à 250°C pendant 2h.

Aucun traitement n'est par contre à effectuer pour les membranes de collecte PC ou PTFE. L'ensemble de nos expérimentations (en laboratoire et sur le terrain) ont en effet permis de vérifier l'absence de contamination (< à la LQ de la méthode d'analyse) des membranes PC et PTFE sans avoir à procéder à un prétraitement de dépyrogénéisation comme c'est le cas pour les filtres FV.

Pour les membranes de collecte PC et PTFE, l'assemblage des cassettes comprenait systématiquement un filtre en fibres de verre apyrogène en tant que support tampon. La présence de ce filtre permet d'éviter la déformation de la membrane de collecte (PC ou PTFE) et d'assurer une étanchéité satisfaisante dans la cassette lors du prélèvement. Toutes les dispositions concernant l'assemblage et l'étanchéité des cassettes ont été, par ailleurs, respectées et vérifiées.

L'étude de l'influence du type de support de collecte sur la concentration en endotoxines a été évaluée dans 11 environnements professionnels différents. Les supports FV, PC et PTFE ont été comparés. Les essais de terrain ont permis d'obtenir des concentrations en endotoxines variant de 0,5 à environ 540 000 UE.m⁻³, tous supports confondus. Les résultats montrent que le type de filtre n'influe pas sur la concentration en endotoxines quel que soit l'environnement investigué (Figure 1). Ces résultats confirment les conclusions d'essais de laboratoire complémentaires menés avec un bioaérosol expérimental constitué d'un mélange de trois bactéries Gram négatif modèles : *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*.

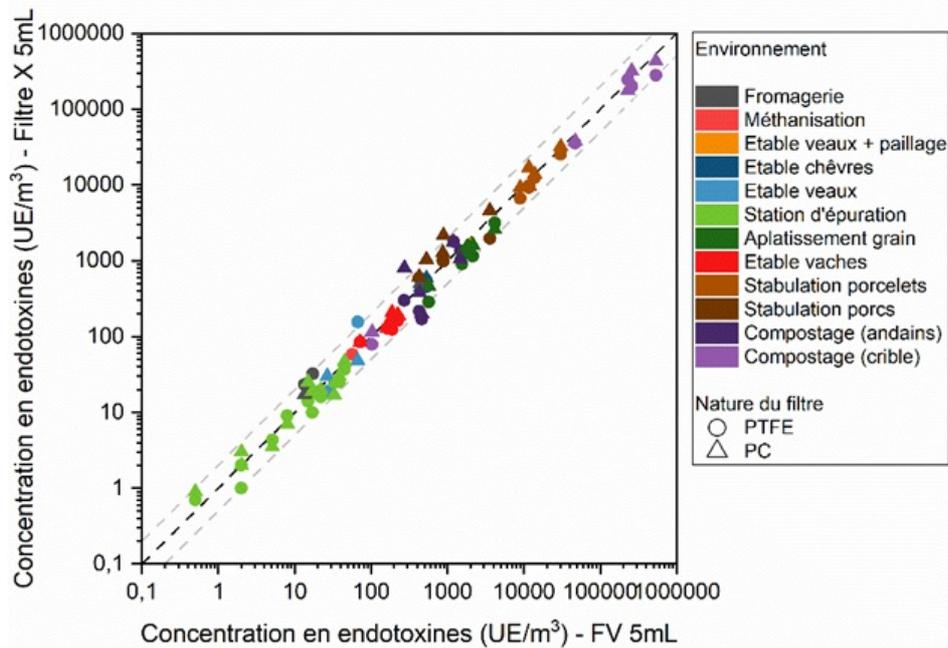


Figure 1. Influence du type de membrane (PC ou PTFE) sur la concentration en endotoxines en comparaison du filtre FV dans différents secteurs d'activités. Les courbes en pointillées représentent les limites de variabilité inhérente à la méthode analytique de 50-200 %.

L'utilisateur a désormais plus de flexibilité concernant le filtre à employer : PC ou PTFE en plus du filtre FV, qui était le seul à être proposé précédemment.

Débit prélèvement _____ 2 L/min

Conditions analytiques

1 détecteur :

SPECTROPHOTOMETRE

Longueur d'onde 1 (ou excitation) en nm _____ 405

Commentaires _____ ELX808 pour plaques 96 puits Lonza (Constructeur Biotek).

Recommandations particulières :

L'ensemble des données de validation a été obtenu en utilisant les kits Kinetic-QCL (Lonza Group Ltd) et en diminuant de moitié le volume de toutes les solutions utilisées pour le dosage (extraits de cassette, gamme étalon, ajouts dosés, réactif LAL, etc.). Cette modification de volume a été validée au laboratoire (voir partie Infos supplémentaires en page 4).

Remarque : L'utilisation de tubes en verre pour l'ensemble des étapes analytiques est fortement recommandée. Des expérimentations menées au laboratoire à partir d'un bioaérosol (composé des 3 espèces bactériennes Gram négatif modèles) ont montré une plus faible concentration en endotoxines mesurée quasi systématique lors de l'utilisation de tubes en polypropylène, sans doute due à une adsorption des endotoxines sur ce matériau (Figure 2).

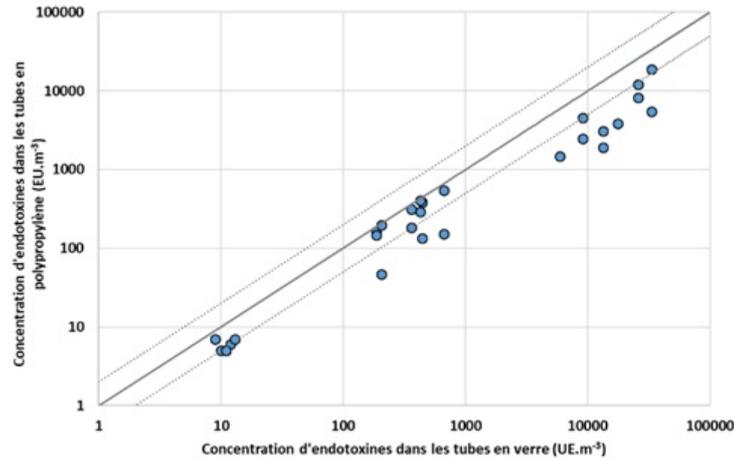


Figure 2 : Comparaison de la concentration d'endotoxines mesurée en utilisant des tubes en verre pour l'ensemble des étapes analytiques en comparaison des tubes en polypropylène. Les courbes en pointillées représentent les limites de variabilité inhérente à la méthode analytique de 50-200 %.

Validation Méthode Analytique**Répétabilité :**

La répétabilité de l'analyse a été évaluée pour chaque type de filtre (FV, PTFE et PC). Pour cela, un coefficient de variation a été calculé à partir des résultats de 10 dosages d'un même éluat obtenu à partir d'un bioaérosol expérimental (composé des trois bactéries Gram négatif modèles) à la concentration cible de 1000 UE/m³.

Type de filtre	CV %
FV	7
PTFE	13
PC	8

Limite de quantification (LQa) :

La limite de quantification (LQ) est calculée à partir de la concentration minimale de la droite d'étalonnage de la méthode LAL définie à 0,005 UE/mL.

Cette limite de quantification analytique peut être utilisée pour déterminer une limite de quantification sur l'ensemble de la méthode de mesure (prélèvement + analyse). Ainsi pour un prélèvement de 4h à 2 L/min, la LQ de l'ensemble de la méthode est de 0,05 UE/m³ d'air.

Taux de récupération

Une efficacité de récupération a été estimée à partir du prélèvement d'un bioaérosol expérimental à trois concentrations cibles de 200 ; 1000 et 10000 UE/m³ et pour trois natures de filtre.

A chaque concentration cible, 3 cassettes pour chaque nature de filtres ont été prélevées. Sur chacune de ces cassettes : une première extraction avec 5 mL d'eau apyrogène a été réalisée en récupérant l'ensemble du liquide d'extraction ; suivie d'une deuxième extraction réalisée de manière identique et consécutive. L'analyse a ensuite été réalisée sur un aliquot de chaque extrait, pour chaque nature de filtre. *Cette méthodologie comporte un possible biais lié à l'impossibilité de récupérer la totalité de la solution après la première extraction ainsi qu'à l'absorption de la solution d'extraction par le filtre lui-même.*

L'efficacité de récupération moyenne pour chaque nature de filtre a ensuite été obtenue par le calcul suivant :

$$Ex_i(\%) = \left(\frac{C1}{C1 + C2} \right)_i \times 100$$

Avec Ex_i : Efficacité du filtre x calculée sur la cassette i et C1 et C2 concentrations obtenues dans le 1^{er} et 2^e extrait de la cassette i respectivement

$$Emx (\%) = \text{Moyenne}(Ex_i)$$

Avec Emx : Efficacité moyenne du filtre x (calculée à partir des 3 cassettes prélevées)

Type de filtre	Concentration cible UE/m ³	Em %
FV	200	73,3
FV	1000	80,1
FV	10 000	87,7
PTFE	200	68,6
PTFE	1000	91,0
PTFE	10 000	85,6
PC	200	89,9
PC	1000	92,4
PC	10 000	88,9

Conservation après prélèvement

Méthode appliquée / conditions de prélèvement :

L'influence de la conservation des cassettes de prélèvement à température ambiante pendant 8 jours sur la concentration en endotoxines a été étudiée dans 11 environnements professionnels différents pour les filtres PC, PTFE et FV. Les essais de terrain ont permis d'obtenir des concentrations en endotoxines variant de 0,5 à environ 540 000 UE/m³, tous supports confondus. La conservation des échantillons pendant 8 jours à température ambiante n'influe pas sur la concentration en endotoxines quel que soit le filtre utilisé ou le secteur d'activité étudié (Figure 3).

Ces résultats confortent ceux obtenus lors des essais de laboratoire à partir d'un bioaérosol expérimental et permettent de valider la conservation des échantillons (cassettes de prélèvements sans extraction) jusqu'à 8 jours avant leur analyse.

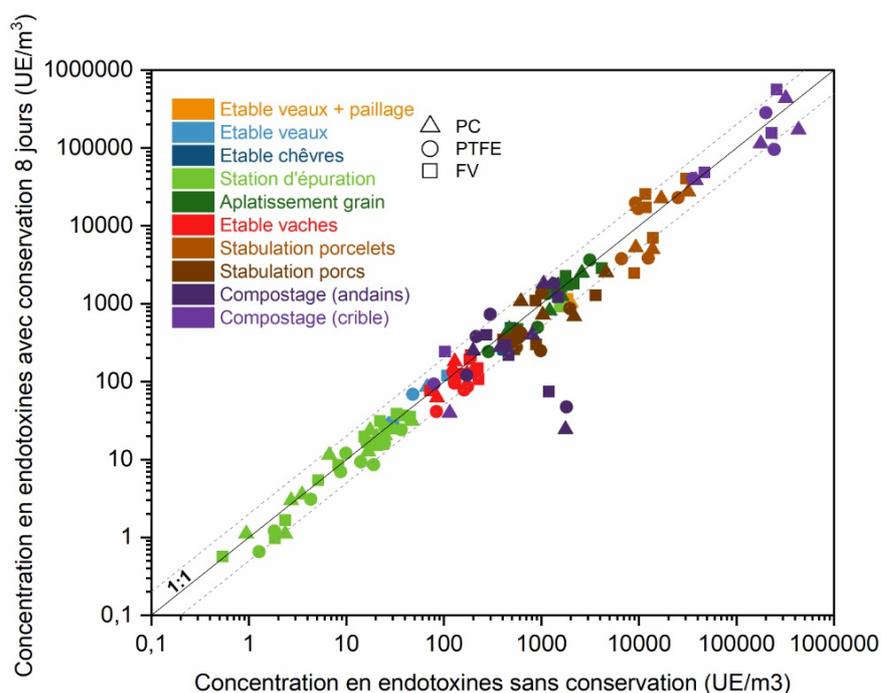


Figure 3 : Influence de la conservation des échantillons pendant 8 jours sur la concentration en endotoxines dans différents secteurs d'activité.

Calcul du coefficient de variation de la méthode de mesure

L'incertitude globale associée à l'ensemble de la méthode de mesure (prélèvement et analyse) a été réalisée pour trois natures de filtres (FV, PC et PTFE) et pour trois niveaux de concentrations en endotoxines ciblés : ~20 ; 1000 et >10000 UE/m³. Ces concentrations en endotoxines ont été obtenues à partir d'un bioaérosol expérimental constitué d'un mélange de trois bactéries Gram négatif modèles : *E. coli*, *Serratia marcescens* et *Ps. aeruginosa*. Le coefficient de variation a été calculé à partir de l'analyse des résultats de dosage issus de 10 cassettes de prélèvements différentes (à chaque concentration ciblée).

Type de filtre	Concentration moyenne des 10 échantillons UE/m ³	CV %
FV	31	16,9
FV	1078	10,0
FV	12 163	14,1
PTFE	25	21,3
PTFE	1024	14,6
PTFE	16 913	18,6
PC	47	13,9
PC	2831	11,6
PC	19 548	20,7

Calcul d'incertitude

Informations complémentaires

Le kit Kinetic-QCL du groupe Lonza, utilisé pour le dosage des endotoxines, préconise de déposer 100 µL des différentes solutions utilisées pour le dosage (gamme étalon, extraits de cassette, réactif LAL, etc.). Pour autant, d'autres fournisseurs utilisent des volumes de 50 µL. L'impact d'une diminution de moitié des volumes utilisés pour le dosage, comme indiqué dans le tableau ci-dessous, a été évalué. Les deux modes opératoires ont été comparés sur une plaque de 96 puits, en réalisant notamment deux gammes de concentration identiques (Figure 4). Il est à noter qu'une modification des paramètres du logiciel pilotant le spectrophotomètre concernant le nombre de lecture lors de l'analyse peut être nécessaire afin que le premier point de la gamme (le plus dilué) puisse être analysé.

Echantillons	Volume déposé par puits
Gamme étalon	50 µL
Extrait de cassette	50 µL
Extrait de cassette dopée	50 µL + 5µL d'ajout dosé
Contrôle négatif	50 µL
Contrôle positif	50 µL
Réactif LAL	50µL

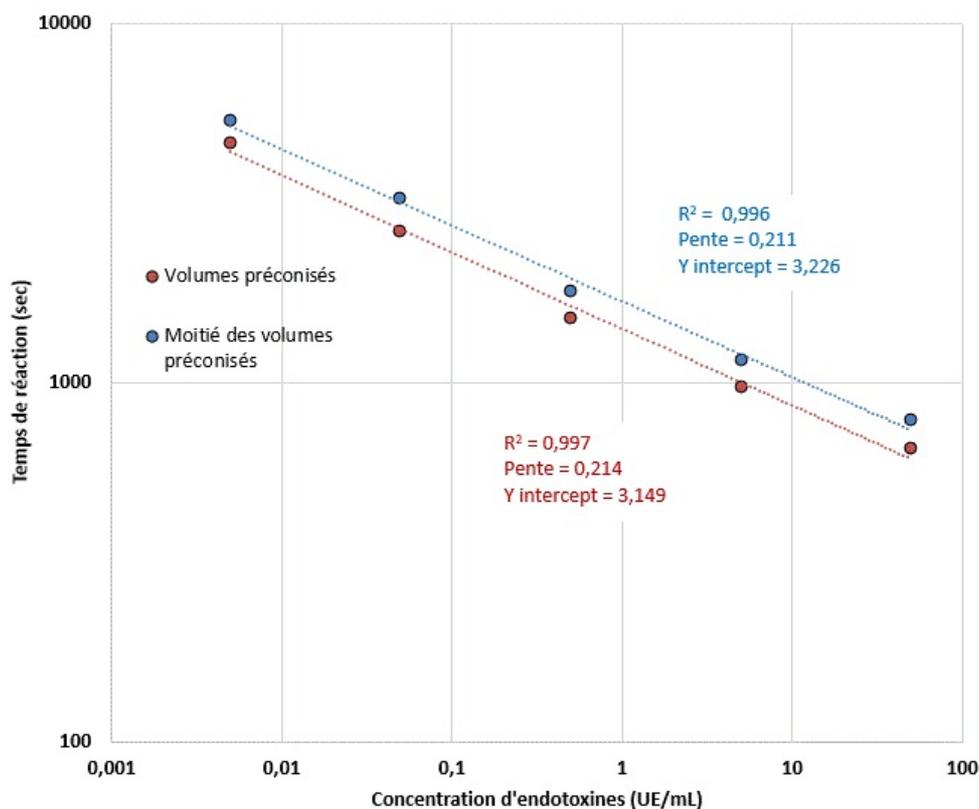


Figure 4 : Comparaison des temps de réaction obtenus lors du dosage de gammes de concentrations en endotoxines en utilisant les volumes recommandés par le fournisseur (en rouge) ou en les diminuant de moitié (en bleu).

On constate que les deux gammes de concentrations sont linéaires et ont des caractéristiques très comparables. La diminution de moitié des volumes n'affecte donc pas la qualité du dosage, n'entraîne pas de difficultés techniques notoires ce qui permet d'abaisser le coût du dosage.

Solutions écartées

L'utilisation de membranes en PVC n'est pas recommandée. En effet, lors des essais de laboratoire (et quelques essais de terrain), le PVC occasionnait une sous-estimation quasi-systématique des concentrations en endotoxines mesurées par rapport aux trois autres supports de collecte étudiés (FV, PC et PTFE). Une analyse des rangs a été réalisée sur les valeurs de concentration en endotoxines obtenues sur 16 générations de laboratoire (quelle que soit la durée ou le volume d'élution) afin de classer les filtres les uns par rapport aux autres. A chaque génération, le rang 1 était attribué au filtre permettant d'obtenir la concentration la plus importante et le rang 4 au filtre donnant la concentration la moins élevée. Un rang moyen a ensuite été calculé pour chaque nature de filtre. Cette analyse valide ce constat puisqu'en moyenne le PVC est le filtre étant le plus souvent en rang 4 (Tableau ci-dessous). Il est à noter que les essais de laboratoire ont également permis de constater que les membranes PVC conduisent à une variabilité plus importante des concentrations, notamment pour les essais de conservation.

Filtere	Rang moyen
PC	1,7
FV	2
PTFE	2,2
PVC	3,8

Il est possible que l'adsorption sur les filtres en PVC soit plus importante ou qu'il y ait présence ou libération d'interférents dans ces filtres. Dans certains environnements professionnels (maternité porcine et stations d'épurations), la membrane PVC avait déjà été décrite comme donnant des concentrations plus faibles en comparaison du PTFE [4], du PC et du FV [5] par exemple

Bibliographie

- [1] AFNOR. NF EN 14031 Exposition sur les lieux de travail — Mesure quantitative des endotoxines aéroportées. 2021:21.
- [2] AFNOR. FD T 90-465-1 Qualité de l'eau — Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques — Partie 1 : Références, définitions et généralités. 2014:32.
- [3] AFNOR. NF T90-210 Qualité de l'eau — Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire. 2018:60.
- [4] Anthony TR, Cai C, Mehaffy J, Sleeth D, Volckens J. Performance of prototype high-flow inhalable dust sampler in a livestock production facility. *J Occup Environ Hyg.* 2017 ;14(5) :313-22.
- [5] Laitinen SK. Importance of sampling, extraction and preservation for quantification of biologically active endotoxin. *Ann Agric Environ Med.* 1999 ;6 (1) :33-8.