

Endotoxines M-454

Cette méthode décrit le prélèvement Actif sur cassette et l'analyse par spectrophotométrie de la (des) substance(s) : **Endotoxines**

Données de validation _____ Validation complète

Numéro de la méthode _____ M-454

Substances

Informations générales

Nom	
Endotoxines	
Substance	données de validation
Endotoxines	Validation_359

Famille de substances

- AGENTS BIOLOGIQUES
- BIOAEROSOLS

Principe et informations

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ce sont des molécules complexes, de poids moléculaire élevé (2 000 à 20 000 daltons), constituées à la fois d'une partie polysaccharidique et d'une partie lipidique. La partie lipidique, appelée "le lipide A", est responsable des activités toxiques du LPS. La partie polysaccharidique est composée de deux éléments, une partie appelée le "polysaccharide central" (noyau interne et externe) et une partie appelée "chaîne latérale O". La composition chimique du polysaccharide central varie d'une espèce bactérienne à une autre. La "chaîne latérale O" ou "antigène O" est une chaîne polysaccharidique courte directement liée au polysaccharide central. Sa composition varie d'une espèce à une autre mais également au sein d'une même espèce. Le polysaccharide central est responsable des activités antigéniques du LPS.

Les endotoxines peuvent être libérées lors de la croissance et de la lyse cellulaire et être présentes dans les bioaérosols. A l'heure actuelle, il n'existe ni VLEP-8h ni VLEP-CT pour les endotoxines en milieu professionnel. Toutefois, deux valeurs guides ont été établies en 2015 à partir de mesures réalisées dans l'atmosphère de nombreux secteurs professionnels. Les deux valeurs guides retenues sont 200 UE/m³ (valeur au-dessus de laquelle les situations de travail font partie des 20 % les plus exposantes) et 1000 UE/m³ (valeur au-dessus de laquelle les situations de travail font partie des 10 % les plus exposantes) voir **HST n°239**¹.

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

La méthode de mesure proposée suit en partie les recommandations de la norme NF EN 14031 [1]. Pour mesurer les endotoxines, l'échantillonnage de l'air est effectué par filtration sur filtre en fibres de verre ou sur membrane de collecte en polycarbonate (PC) ou en PTFE à l'aide de cassettes fermées 37mm. Les endotoxines sont extraites dans la cassette par agitation avec de l'eau purifiée stérile et apyrogène, et le dosage des endotoxines dans les extraits est effectué par la méthode au lysat d'amœbocytes de limule (LAL).

Principe de prélèvement et d'analyse

Etat physique _____ Particules en suspension (liquides ou/et solides)

Type de prélèvements _____ Actif

Mesure de la fraction inhalable par cassette fermée²

²<https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=NT%2078>

Nom du dispositif _____ cassette

Technique analytique _____ SPECTROPHOTOMETRIE

Domaine d'application

Substance	Concentration minimum	Concentration maximum
Endotoxines	0,05 UE/m ³ en conditions de laboratoire	10 000 UE/m ³ en conditions de laboratoire

Liste des réactifs

- Eau apyrogène pour LAL (eau LAL)
- Eau purifiée stérile apyrogène (EPSA)
- Endotoxines de référence associées au réactif LAL (ESCHERICHIA COLI 055:B5)
- Réactif LAL lyophilisé

Dossier les risques biologiques au travail. ³

³ <https://www.inrs.fr/risques/biologiques/ce-qu-il-faut-retenir.html>

Méthode de prélèvement

Prélèvement des aérosols par cassette fermée ⁴

⁴ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-prelevement-cassette/metropol-prelevement-cassette.pdf>

Dispositif de prélèvement

- Type de dispositif _____
- CASSETTE 37 mm 3 pièces
- Support ou substrat de collecte _____
- 1 FILTRE EN FIBRES DE VERRE APYROGENE

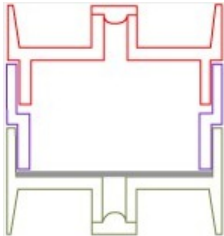
Préparation du substrat :

Le filtre en fibres de verre (support de collecte) doit être préalablement dépyrogénéisé dans une étuve à 250°C pendant 2h.

Commentaires, conseils, consignes :

Dans le cadre de la détermination des concentrations en endotoxines dans l'air, le filtre de collecte en fibres de verre (FV) peut être remplacé par une membrane de collecte en polycarbonate (PC) Nuclepore (0,8 µm de diamètre de pore) ou une membrane de collecte en PTFE Fluoropore (1,0 µm de diamètre de pore). Aucun traitement n'est à effectuer pour les membranes de collecte PC ou PTFE. Le recours à l'une ou l'autre de ces membranes devra impérativement s'accompagner d'un filtre en fibres de verre apyrogène en tant que support tampon. La présence de ce filtre support en fibres de verre apyrogène 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 devront être, par ailleurs, respectées et vérifiées.

Le montage de la cassette fermée se fait sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Le filtre en fibres de verre est déposé dans la pièce de sortie de la cassette à l'aide d'une pince préalablement désinfectée. Lorsqu'une membrane PC ou PTFE est utilisée, ce filtre FV servira de support tampon. La cassette est ensuite correctement assemblée de préférence à l'aide d'une presse pneumatique pour assurer l'étanchéité (pression à 2 bars) puis fermée avec des bouchons. Il est recommandé d'utiliser un lot de cassettes dédiées, stockées à température ambiante, à l'abri de la lumière et de la poussière dans un endroit sec.



Conditions de prélèvement

- Débit (L/min) _____ 2
- Temps de prélèvement maximum _____ 8 heures

Particularités, commentaires, conseils :

Le prélèvement peut aller de 60 minutes à 8 heures.

Pompe de prélèvement

- Pompe à débit de 1 à 5 L/min compensant les fortes pertes de charges (sup, à 20 pouces d'eau)

Préparation des dispositifs en vue d'une intervention ⁵

⁵ <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-intervention-preparation/metropol-intervention-preparation.pdf>

Méthode d'analyse

Préparation de l'analyse

Durée de conservation testée et validée pour les prélèvements _____ 8 jours

Conditions de conservation testée et validée pour les prélèvements :

Les cassettes prélevées peuvent être conservées 8 jours à température ambiante.

Nombre d'étapes de préparation _____ 2

Commentaires sur les étapes :

Toutes les étapes sont réalisées en conditions aseptiques sous un poste de sécurité microbiologiques (PSM) en évitant toute contamination. Tous les consommables (tubes en verre, embouts de micropipettes, pipettes, seringues) doivent être stériles et apyrogènes. L'usage de tubes en plastique (notamment polypropylène) est fortement déconseillé car ce matériau adsorbe les endotoxines.

2 étapes de préparation :

Etape de préparation n° 1

Solvant ou solution _____ ■ EPSA

Type de préparation _____ ■ Extraction

Volume _____ 5 mL

Temps d'agitation _____ 20 min

Commentaires :

Les 5 mL d'EPSA sont introduits par l'orifice supérieur de la cassette à l'aide d'un dispositif à usage unique comme une pipette par exemple. L'agitation de 20 minutes doit être forte, de type agitation orbitale à 2000 rpm.

L'extrait doit être récupéré de manière à éviter toute contamination par exemple en utilisant une seringue à embout Luer Lock (compatible avec l'orifice de la cassette). Pour cela, enlever le bouchon de l'orifice supérieur de la cassette et introduire la seringue (de capacité 5 ou 10 mL). Retourner la cassette, retirer le deuxième bouchon pour faire pénétrer de l'air et aspirer l'extrait. Retirer la seringue et transférer son contenu dans un tube en verre.

Etape de préparation n° 2

Solvant ou solution _____ ■ EPSA

Type de préparation _____ ■ Dilution

Temps d'agitation _____ 1 min

Commentaires :

Dilutions en cascade au 1/10^{ème}, et agitation forte pendant 1 minute avec par exemple, un vortex réglé à 2000 rpm. Si la vitesse d'agitation est plus faible il conviendra d'agiter pendant 2 minutes.

Les extraits des cassettes doivent être dilués avec de l'EPSA, hormis pour les très faibles concentrations. Les dilutions sont à adapter en fonction de la concentration d'endotoxines contenue dans l'extrait et il est préférable, quand c'est possible, d'analyser deux dilutions successives (par exemple 1/10^e et 1/100^e).

1 condition analytique :

Condition analytique n° 1

Les conditions analytiques utilisées lors du développement de la méthode sont fournies avec les données de validation.

Technique analytique _____ ■ SPECTROPHOTOMETRIE

Commentaires, conseils ou conditions particulières :

Longueur d'onde : 405 nm

Le dosage des endotoxines est effectué avec la méthode cinétique et chromogénique au réactif LAL. Le mode opératoire décrit dans cette fiche reprend les préconisations de la méthode Kinetic-QCL™ (Lonza). D'autres fabricants commercialisent des réactifs similaires. Dans ce cas, il convient d'adapter le protocole car les recommandations peuvent être quelque peu différentes de celles-ci.

Le dosage est réalisé avec un spectrophotomètre thermostaté à 37 °C et adapté pour la lecture des plaques de titration de 96 puits. Ce spectrophotomètre est préférentiellement piloté par un logiciel dédié commercialisé par un fournisseur de réactifs pour le dosage des endotoxines.

Etalonnage et expression des résultats

La réalisation de la courbe d'étalonnage est obligatoire.

Principe d'étalonnage _____ externe

Solvant de l'étalon _____ ■ Eau apyrogène pour dosage LAL commercialisée par le fournisseur de réactif LAL (eau LAL)

Commentaires :

Le dosage des endotoxines est effectué selon le mode opératoire conseillé par le fabricant de réactif LAL.

Il est effectué sur deux réplicats des échantillons décrits dans le tableau ci-dessous. Dans la majorité des cas, les extraits des cassettes doivent être dilués avec de l'EPSA. Chaque extrait (pur ou dilué) est analysé seul ou en présence d'un ajout dosé (solution d'endotoxines standard) afin de détecter la présence potentielle d'interférents.

Echantillons	Description	Volume déposé par puits	
Gamme étalon	Eau LAL	0 UE/mL	100 µL
	Solution d'endotoxines standard à	0,005 UE/mL	100 µL
		0,05 UE/mL	100 µL
		0,5 UE/mL	100 µL
		5 UE/mL	100 µL
		50 UE/mL	100 µL
Extrait de cassette	Extrait pur ou dilué	100 µL	
Extrait de cassette dopé	Extrait pur ou dilué + ajout dosé (1/10 ^e du volume d'extrait) d'une solution d'endotoxines standard (généralement 5 EU/mL mais à adapter en fonction de la concentration d'endotoxines contenue dans l'extrait).	100 µL + 10 µL	
Contrôle négatif	EPSA (eau apyrogène utilisée pour extraire et diluer les extraits de cassettes)	100 µL	
Contrôle positif	Solution d'endotoxines standard à 0,05 EU/mL ou 0,5 EU/mL ou 5 EU/mL	100 µL	

UE : Unité d'Endotoxines

1 | Etablir le plan de distribution des échantillons dans la plaque de 96 puits et paramétrer le dosage des endotoxines à l'aide d'un logiciel dédié. Un exemple de plan de plaque pour 4 extraits de cassette passés purs et dilués au 1/10^e est donné ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eau LAL	Eau LAL	Extrait 1	Extrait 1	Extrait 3	Extrait 3	Contrôle positif 0,5 EU/mL	Contrôle positif 0,5 EU/mL				
B	0,005 EU/mL	0,005 EU/mL	Extrait 1 + ajout dosé	Extrait 1 + ajout dosé	Extrait 3 + ajout dosé	Extrait 3 + ajout dosé	Contrôle positif 5 EU/mL	Contrôle positif 5 EU/mL				
C	0,05 EU/mL	0,05 EU/mL	Extrait 1 au 1/10 ^e	Extrait 1 au 1/10 ^e	Extrait 3 au 1/10 ^e	Extrait 3 au 1/10 ^e						
D	0,5 EU/mL	0,5 EU/mL	Extrait 1 au 1/10 ^e + ajout dosé	Extrait 1 au 1/10 ^e + ajout dosé	Extrait 3 au 1/10 ^e + ajout dosé	Extrait 3 au 1/10 ^e + ajout dosé						
E	5 EU/mL	5 EU/mL	Extrait 2	Extrait 2	Extrait 4	Extrait 4						
F	50 EU/mL	50 EU/mL	Extrait 2 + ajout dosé	Extrait 2 + ajout dosé	Extrait 4 + ajout dosé	Extrait 4 + ajout dosé						
G	Contrôle négatif	Contrôle négatif	Extrait 2 au 1/10 ^e	Extrait 2 au 1/10 ^e	Extrait 4 au 1/10 ^e	Extrait 4 au 1/10 ^e						
H	Contrôle négatif + ajout dosé	Contrôle négatif + ajout dosé	Extrait 2 au 1/10 ^e + ajout dosé	Extrait 2 au 1/10 ^e + ajout dosé	Extrait 4 au 1/10 ^e + ajout dosé	Extrait 4 au 1/10 ^e + ajout dosé						

2 | Préparer la gamme étalon à partir d'un flacon d'endotoxines lyophilisées associé au réactif LAL.

Reconstituer le lyophilisat selon les informations figurant sur le certificat d'analyse pour avoir une concentration finale de 50 UE/mL. Puis, procéder par dilutions successives au 1/10^e dans de l'eau LAL pour préparer les autres solutions d'endotoxines par exemple :

- 100 µL à 50 UE/mL + 900 µL eau LAL → 5 UE/mL
- 100 µL à 5 UE/mL + 900 µL eau LAL → 0,5 UE/mL
- 100 µL à 0,5 UE/mL + 900 µL eau LAL → 0,05 UE/mL
- 100 µL à 0,05 UE/mL + 900 µL eau LAL → 0,005 UE/mL

- 3 | Diluer les extraits des cassettes, si nécessaire, par dilutions successives au 1/10^e dans de l'EPSA.
- 4 | Distribuer les échantillons avec une micropipette et les ajouts dosés avec une pipette à répétition dans une plaque de 96 puits selon le plan de plaque préalablement défini.
- 5 | Pré-incuber la plaque, avec son couvercle, dans le spectrophotomètre thermostaté à 37 °C pendant 10 minutes (facultatif).
- 6 | Préparer le réactif LAL en reconstituant le lyophilisat avec l'eau pour dosage LAL selon les instructions du fabricant. S'il y a lieu, reconstituer plusieurs flacons de réactif et les regrouper dans un seul contenant.
- 7 | Le réactif LAL est distribué dans les puits de la plaque à l'aide d'une pipette à répétition ou d'une pipette multicanaux, à raison de 100 µL par puits. La distribution doit être aussi rapide et régulière que possible.
- 8 | Incuber la plaque, sans son couvercle, dans le spectrophotomètre. Démarrer immédiatement le pilotage du spectrophotomètre à partir du logiciel.
- 9 | Quand le dosage est terminé, le logiciel stoppe l'analyse et calcule la concentration d'endotoxines contenue dans les échantillons.

Calcul de la quantité de substance sur le dispositif :

Le logiciel de pilotage du spectrophotomètre détermine le temps de réaction de chaque échantillon qui correspond au temps nécessaire pour que la densité optique à 405 nm augmente de 0,2 unité.

Interprétation des résultats

- 1 | Pour que le test soit valide, la concentration d'endotoxines des contrôles négatifs (eau LAL et EPSA) doit être significativement inférieure à la plus faible concentration d'étalon.
- 2 | La droite de régression caractérise la gamme étalon. Le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage incluse dans le test doit avoir une valeur absolue supérieure ou égale à 0,980 pour que l'essai soit validé. Ces calculs sont effectués par le logiciel dédié.
- 3 | La concentration moyenne d'endotoxines mesurée pour les contrôles positifs doit se situer à +/- 25 % de la concentration nominale. Par conséquent, si le contrôle positif contient 0,05 UE/mL, la concentration mesurée doit se situer entre 0,0375 et 0,0625 UE/mL.
- 4 | Les concentrations d'endotoxines contenues dans les extraits des cassettes doivent être comprises dans les limites de la gamme étalon (soit entre 0,005 et 50 UE/mL). Les échantillons ayant des concentrations en dehors de la limite basse de la gamme étalon seront rapportés comme inférieurs à 0,005 UE/mL. Si la concentration est trop importante (c'est-à-dire > à 50 UE/mL), il conviendra de repasser l'échantillon en réalisant au moins une dilution supplémentaire au 1/10^e.
- 5 | Le coefficient de variation calculé pour deux répliquats d'un même échantillon doit être inférieur ou égal à 10 %.
- 6 | Dans les échantillons dopés, le recouvrement de l'ajout dosé doit être compris entre 50 et 200 % de la concentration nominale selon le fabricant. Un recouvrement non compris dans ces limites met en évidence une interférence avec le dosage LAL (une inhibition pour un recouvrement inférieur à 50 % et une potentialisation pour un recouvrement supérieur à 200 %).

Pour lever ces interférences, le dosage doit être refait en diluant l'échantillon. Si, malgré tout, l'interférence ne peut être levée, le résultat de l'analyse doit s'accompagner d'un commentaire mentionnant l'interférence.

Calcul de la concentration d'endotoxines dans l'échantillon d'air prélevé

Les résultats sont exprimés en Unités d'Endotoxines par m³ d'air, UE/m³ et calculés de la façon suivante :

$$E = (e \times V_0) / V$$

Avec :

- E : concentration d'endotoxines dans l'échantillon d'air prélevé (UE/ m³)
- e : concentration d'endotoxines dans l'extrait de la cassette (UE/mL)
- V₀ : volume de solution d'extraction (mL)
- V : volume d'air prélevé (m³)

$$V = (Q / 1\ 000) \times T$$

Et :

- Q : débit moyen de la pompe de prélèvement (L/min)
- T : durée du prélèvement (min)

Contacts

metropol@inrs.fr

Bibliographie

[1] AFNOR. NF EN 14031 Exposition sur les lieux de travail — Mesure quantitative des endotoxines aéroportées. 2021:21.

Historique

Version	Date	Modification(s) faisant l'objet de la nouvelle version
M-454/V01	Novembre 2023	Nouvelle méthode remplaçant la M-154