

JOURNÉE
TECHNIQUE

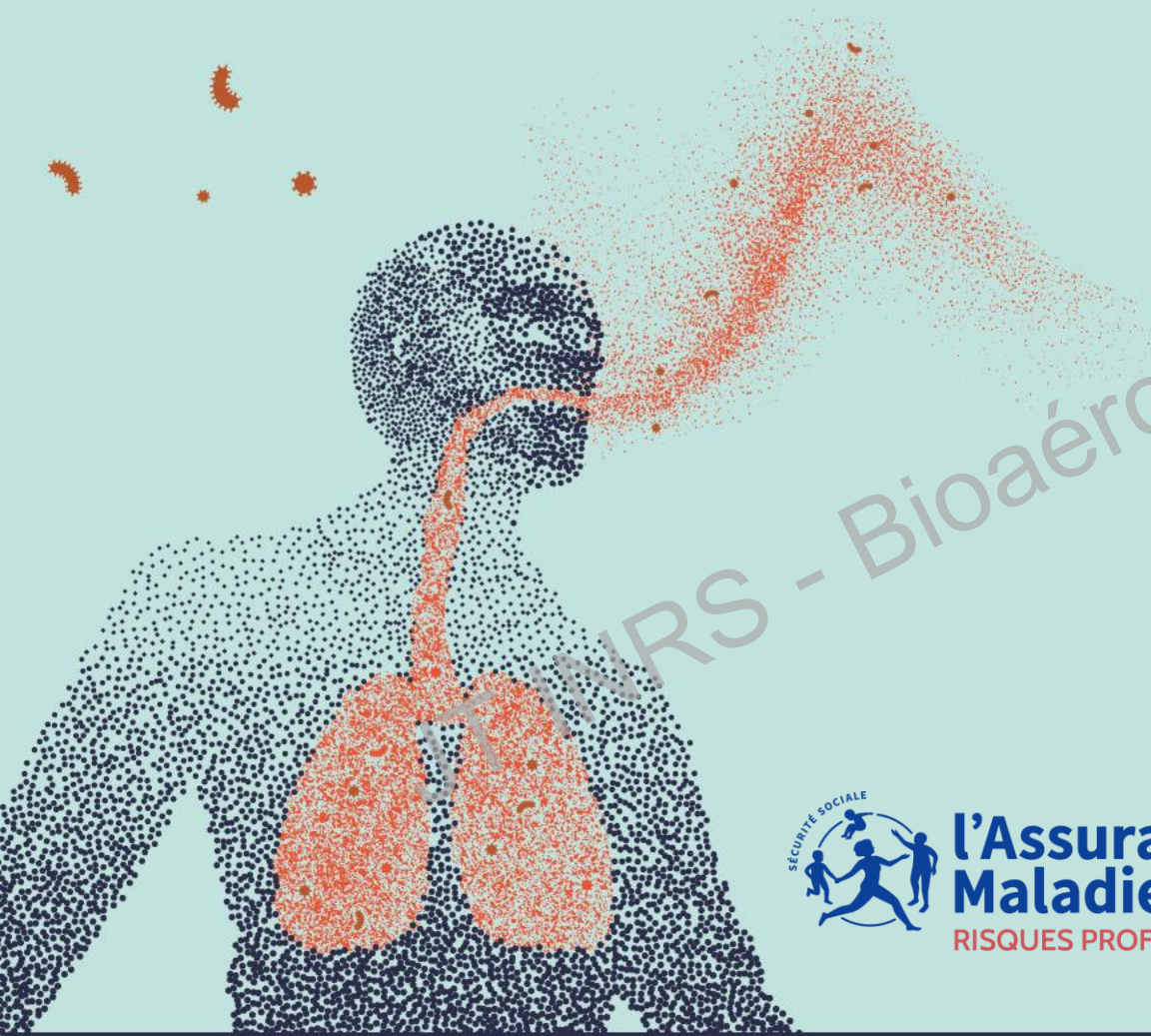


Méthode de mesure des endotoxines

Prélèvement et Analyse

Alexandra PEDROS

CRAMIF - Laboratoire des Biocontaminants



Bioaérosols au travail 26/11/24

BIOAÉROSOLS AU TRAVAIL

Mieux les comprendre pour les prévenir

26 NOVEMBRE 2024



Caisse régionale
Île-de-France

Méthode de mesure des endotoxines

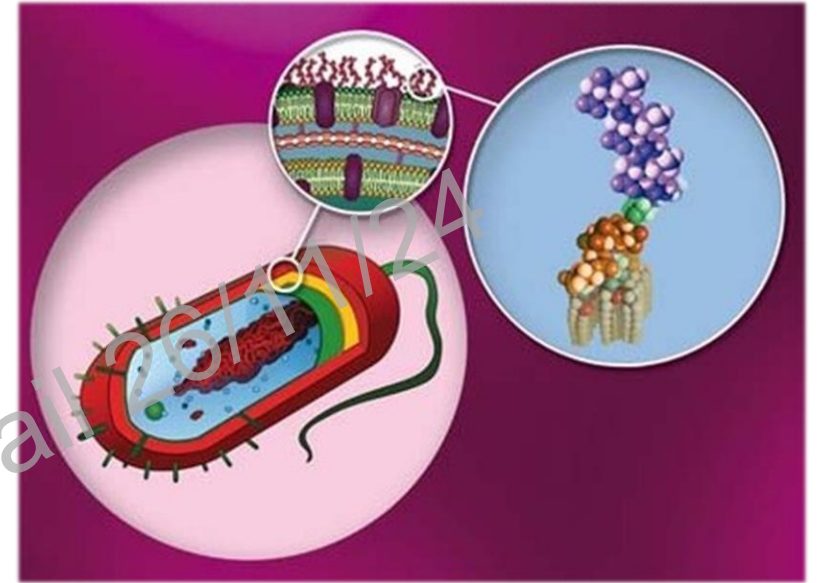
Prélèvement et analyse

Plan :

- > Définition des endotoxines
- > Effets sur la santé
- > Secteurs d'activité concernés
- > Méthodes de mesure
- > Évolution de la méthode
- > Retour d'expérience
- > Conclusion

Les endotoxines

- > Composés d'origine bactérienne
- > Constituants de la membrane externe des bactéries Gram \ominus
- > Molécules libérées lors de la mort de la bactérie et lors de la division cellulaire
- > Très stables, persistant dans l'environnement
- > Véhiculées par les poussières...



Effets sur la santé

Par injection:

- > Bien connues dans le domaine pharmaceutique pour leur effet pyrogénique (fièvre),
- > Recherchées dans tous les médicaments injectables,
- > A l'origine d'une réponse inflammatoire générale démesurée pouvant entraîner un choc septique et la mort.

Par inhalation :

- > A l'origine d'effets irritants et de symptômes respiratoires comme toux, dyspnée, asthme.
- > Exposition brutale et très intense : syndrome toxique des poussières organiques (ou ODTS pour Organic Dust Toxic Syndrom).
- > Exposition fréquente / répétée : broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoire.

Secteurs d'activité concernés

Présentes dans les atmosphères de travail de nombreux secteurs :

- > **Déchets** : Tri, recyclage, compostage, ...
- > **Assainissement** : Egouts, traitement eaux usées, boues d'épuration, ...
- > **Agro-alimentaire** : Abattoirs, transport et stockage de produits animaux ou végétaux (industrie de la pomme de terre), ...
- > **Métallurgie** (fluides de coupe), **Papeterie-cartonnerie**, **Traitement des fibres végétales** (teillage de lin)



Mesure des endotoxines



Objectif : Caractériser l'exposition des salariés au cours de leur travail

- > Mise au point d'un protocole standardisé de prélèvement et d'analyse des endotoxines par l'INRS en 2005,
- > Optimisation du protocole par l'INRS en 2023, publié sur site INRS : **fiche MetroPol_454**,
- > Protocole utilisé par le Réseau Prévention des CARSAT.

Les prélèvements sont effectués :

- En entreprise :
 - au niveau des voies respiratoires des salariés - prélèvement individuel, à privilégier,
 - à poste fixe à hauteur des voies respiratoires - prélèvement en ambiance de travail.
- Sur toute la France :
 - en région, par les contrôleurs de sécurité des Laboratoires Inter-régionaux des CARSAT,
 - en Île-de-France, par les contrôleurs de sécurité du Laboratoire des Biocontaminants (LBC).

Les analyses de tous les prélèvements sont réalisées au LBC.

Mesure des endotoxines

Méthode de prélèvement :

> Prélèvement d'air :

- Échantillonnage de la fraction inhalable
- Sur un filtre en fibre de verre traité, en cassette fermée
- À l'aide d'une pompe régulée à 2L/min

> Transport des échantillons et analyses au LBC.



Atelier de séchage thermique des boues d'épuration



Centre de tri



Surveillance d'un tampon d'égout

Mesure des endotoxines

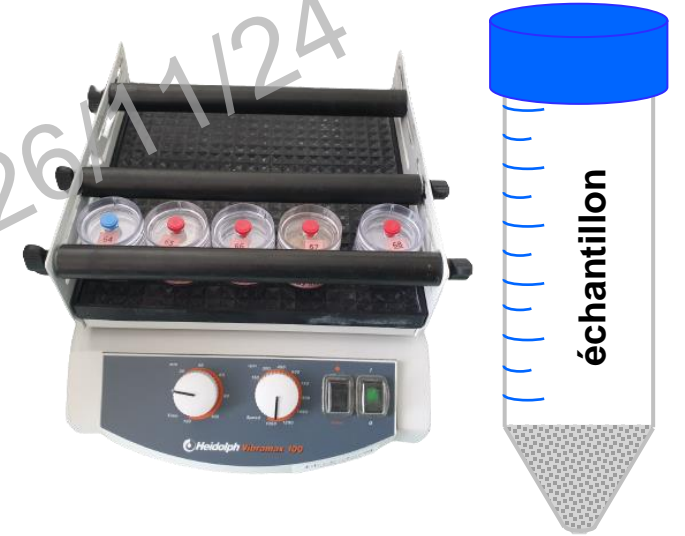
Méthode d'analyse : Analyse biochimique

> Extraction des échantillons :

- ❑ Ajout de 5 mL d'eau apyrogène par l'orifice supérieur de la cassette
- ❑ Agitation forte de la cassette fermée à 2000 rpm pendant 20 minutes
- ❑ Récupération du liquide contenant les endotoxines extraites du filtre

> Analyse par la technique au L.A.L (Lysat d'Amœbocytes de Limules)

Réaction enzymatique basée sur une méthode colorimétrie cinétique à l'aide d'un spectrophotomètre. La densité optique mesurée (coloration jaune) est proportionnelle à la quantité d'endotoxines.



Limules : arthropodes marins

Optimisation du protocole

ÉTAPES	PROTOCOLE 2005	PROTOCOLE 2023	AVANTAGES
Prélèvement	Filtre en fibre de verre	Plusieurs choix de filtres Fibre de verre, PTFE ou polycarbonate PC	> Choix de la nature du filtre : facilité pour les commandes avec possibilité de différents fournisseurs et tarifs
Conservation et transport des échantillons	4°C (+/-2°C)	Température ambiante ou 4°C (+/-2°C)	<ul style="list-style-type: none"> > Logistique simplifiée : <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Pas de glacière réfrigérée pour la conservation des échantillons et pour le transport au LBC <input type="checkbox"/> Pas de transport express pour les interventions hors IDF : Envoi en colis postal > Réduction des coûts de transport > Facilité d'organisation entre le LBC et les CARSAT
Délai d'analyse	Dans les 24h max	Dans les 7 jours	<ul style="list-style-type: none"> > Souplesse pour le planning analytique > Facilité d'organisation entre le LBC et les CARSAT
Extraction des échantillons	Filtre seul	Cassette + filtre	> Prise en compte des dépôts dans la cassette et meilleure représentativité de la fraction inhalable
Agitation de l'extrait	1 heure	20 minutes	<ul style="list-style-type: none"> > Réduction du temps d'analyse > Possibilité d'analyser plus d'échantillons dans la journée
Dosage des endotoxines	100 µL de réactif L.A.L	50 µL de réactif L.A.L	> Réduction des coûts de réactifs

Retour d'expérience du LBC

Demande :

Sollicitation du LBC par une CARSAT pour mesurer l'exposition aux endotoxines des salariés dans une entreprise :

- > Prélèvements réalisés par le contrôleur du laboratoire de la CARSAT.
- > Analyses effectuées par le LBC.

Contexte :

- > Entreprise type « start-up » en phase de développement et d'ajustement.
- > Activité : Recyclage de vêtements de travail (hôpital, EHPAD...).
- > Machines en cours de réglage avec une activité en dent de scie.
- > Intervention calée sur un délai court, entre l'entreprise et le contrôleur du laboratoire de la CARSAT.

	SELON PROTOCOLE 2005	CONTRAINTES	AVEC PROTOCOLE 2023
AVANT INTERVENTION	> Envoi par transporteur d'une glacière réfrigérée nécessaire au transport des échantillons <i>Du LBC à la CARSAT</i>	> Commande auprès du transporteur + délai d'envoi de la glacière au préalable	> Pas d'envoi de glacière réfrigérée : Envoi des cassettes en colis postal par le LBC
	> Planification du transport des échantillons <i>Entre le LBC et le transporteur</i>	> Planification au préalable avec le transporteur (disponibilité, délai d'enregistrement, devis...)	> Pas de logistique particulière à prévoir
APRÈS INTERVENTION	> Transport des échantillons en glacière réfrigérée dès la fin de l'intervention <i>De l'entreprise au LBC</i>	> Enlèvement de la glacière sur le site de l'entreprise > Livraison vers le LBC en moins de 24h et en frais à 4°C (+/-2°C)	> Pas d'envoi en frais : Envoi des échantillons en colis postal par la CARSAT
	> Analyses dans les 24h max <i>Au LBC</i>	> Disponibilité du LBC pour l'analyse à J+24h après intervention	> Moins de contraintes analytiques : 7 jours pour réaliser l'analyse

L'intervention a pu être réalisée sans difficulté, les prélèvements et les analyses ont été effectués malgré le court délai. Sans le protocole actuel, elle n'aurait pu être menée à bien.

Conclusion



> Souplesse d'organisation
entre :

- ❑ L'entreprise et la CARSAT
- ❑ La CARSAT et le LBC

Planning



> Pas de logistique
particulière sur site
> Conservation des
échantillons à T°C
ambiante pendant et
après prélèvement

Intervention



> Facilité de transport :
Envoi des échantillons par
voie postale à T°C ambiante
> Réduction des coûts

Transport



> Souplesse du planning
analytique
> Réduction temps
d'analyse
> Réduction des coûts

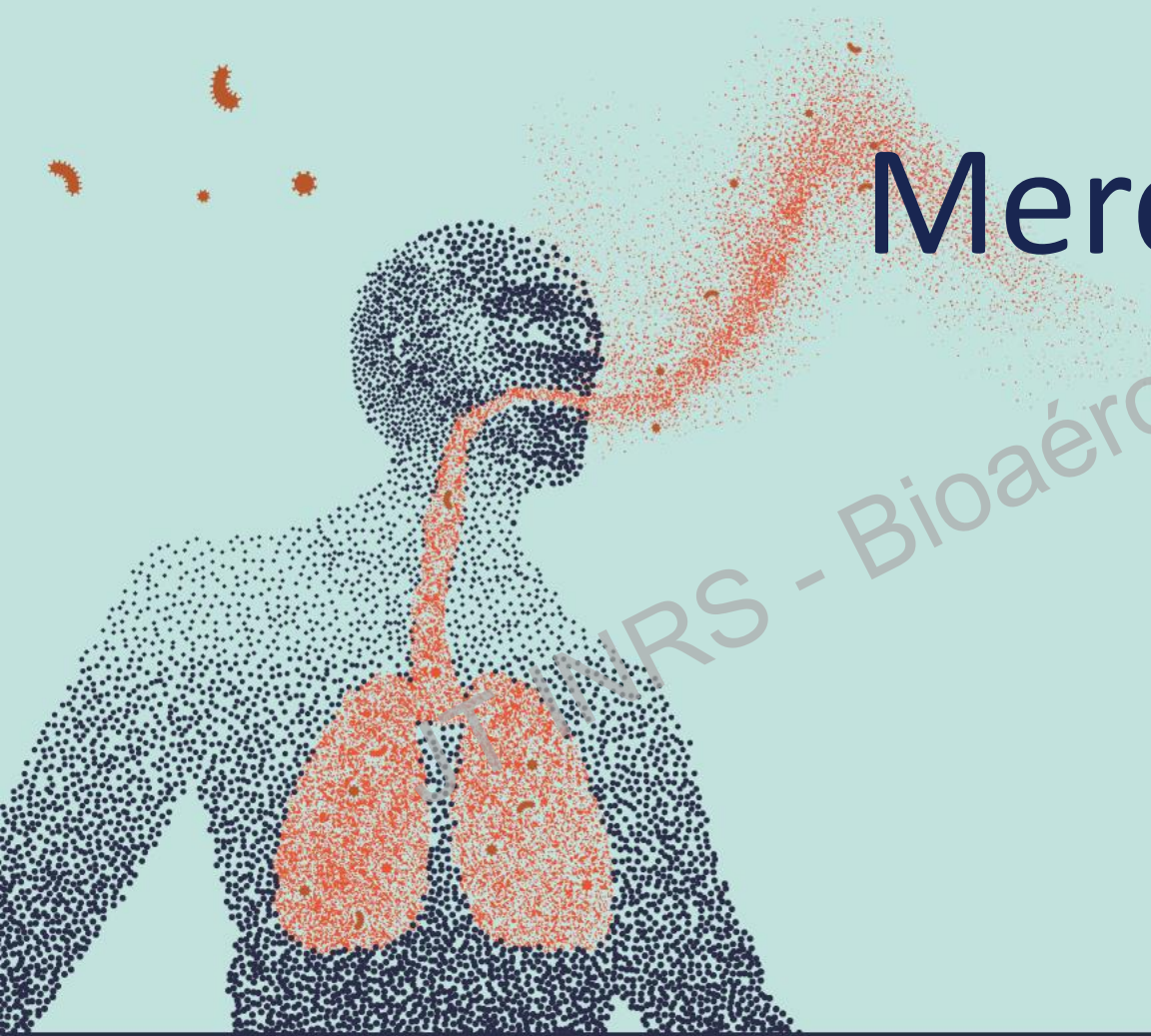
Analyses



L'optimisation de la méthode de mesure des endotoxines développée par l'INRS a permis :

- > D'intervenir plus facilement dans les entreprises,
- > D'investiguer de nouveaux secteurs d'activité.

JOURNÉE
TECHNIQUE



Merci de votre attention

INRS - Bioaérosols au travail 26/11/24

BIOAÉROSOLS AU TRAVAIL

Mieux les comprendre pour les prévenir

26 NOVEMBRE 2024