

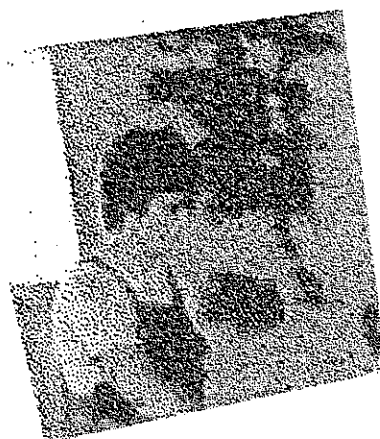
**Les endotoxines
en milieu de travail**

Geneviève Marchand

Novembre 1996 B-049

RAPPORT

BILANS DE CONNAISSANCES



IRSST
Institut de recherche
en santé et en sécurité
du travail du Québec

La recherche, pour mieux comprendre

L'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec (IRSST) est un organisme de recherche scientifique voué à l'identification et à l'élimination à la source des dangers professionnels, et à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes. Financé par la CSST, l'Institut réalise et finance, par subvention ou contrats, des recherches qui visent à réduire les coûts humains et financiers occasionnés par les accidents de travail et les maladies professionnelles.

Pour tout connaître de l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par la CSST et l'Institut.

Les résultats des travaux de l'Institut sont présentés dans une série de publications, disponibles sur demande à la Direction des communications.

Il est possible de se procurer le catalogue des publications de l'Institut et de s'abonner à *Prévention au travail* en écrivant à l'adresse au bas de cette page.

ATTENTION

Cette version numérique vous est offerte à titre d'information seulement. Bien que tout ait été mis en œuvre pour préserver la qualité des documents lors du transfert numérique, il se peut que certains caractères aient été omis, altérés ou effacés. Les données contenues dans les tableaux et graphiques doivent être vérifiées à l'aide de la version papier avant utilisation.

Dépôt légal
Bibliothèque nationale du Québec

IRSST - Direction des communications
505, boul. de Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : (514) 288-1 551
Télécopieur: (514) 288-7636
Site internet : www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche en santé
et en sécurité du travail du Québec,

Les endotoxines en milieu de travail

**Geneviève Marchand,
Programme soutien analytique, IRSST**

**BILAN DE
COMMISSAIRES**

RAPPORT

Table des matières

Page

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : DESCRIPTION DES ENDOTOXINES	2
1.1 Membrane cellulaire	2
1.2 Structure des lipopolysaccharides	3
1.2.1 Chaîne-O spécifique	3
1.2.2 Coeur	3
1.2.3 Lipide A	3
1.3 Activités biologiques et fonctions des LPS	4
CHAPITRE 2 : LES ENDOTOXINES ET LEURS EFFETS SUR LA SANTÉ	5
2.1 Introduction	5
2.2 Réponse cellulaire	6
2.2.1 Endotoxines et macrophages	6
2.2.2 Endotoxines et neutrophiles	7
2.3 Réponse clinique	7
2.4 Relation dose-réponses	8
CHAPITRE 3 : LES ENDOTOXINES ET LE MILIEU DE TRAVAIL	10
CHAPITRE 4 : VALEURS MAXIMUM D'EXPOSITION AUX ENDOTOXINES	13
CHAPITRE 5 : ÉCHANTILLONNAGE DES ENDOTOXINES	15
CHAPITRE 6 : DÉTECTION DES ENDOTOXINES - MÉTHODES D'ANALYSE	17
6.1 Mesure de pyrogénicité chez le lapin	17
6.2 Analyse chimique	17
6.3 Méthodes LAL	19
6.3.1 Histoire du test du LAL	19
6.3.2 Mécanisme du test du LAL	19
6.3.3 Méthode de coagulation du gel	20
6.3.4 Méthode turbidimétrique	21
6.3.5 Méthode chromogénique	21
6.3.6 Inhibition du test LAL	23
CONCLUSION	24
GLOSSAIRE	25
BIBLIOGRAPHIE	27

Liste des tableaux

Page

Tableau 1 : Relation dose-réponses	9
Tableau 2 : Niveaux d'endotoxines rencontrés dans différents milieux de travail	11
Tableau 3 : Niveaux d'endotoxines et effets	13
Tableau 4 : Limites suggérées d'exposition	14

INTRODUCTION

L'intérêt porté aux endotoxines est grandissant dans le domaine de la santé et sécurité au travail. Afin de mieux comprendre cette problématique, un bilan de connaissances a été effectué. La description des endotoxines, leurs effets sur la santé, les milieux de travail où elles sont rencontrées, les valeurs d'exposition proposées, leur échantillonnage ainsi que leur analyse ont été traités dans ce bilan de connaissances.

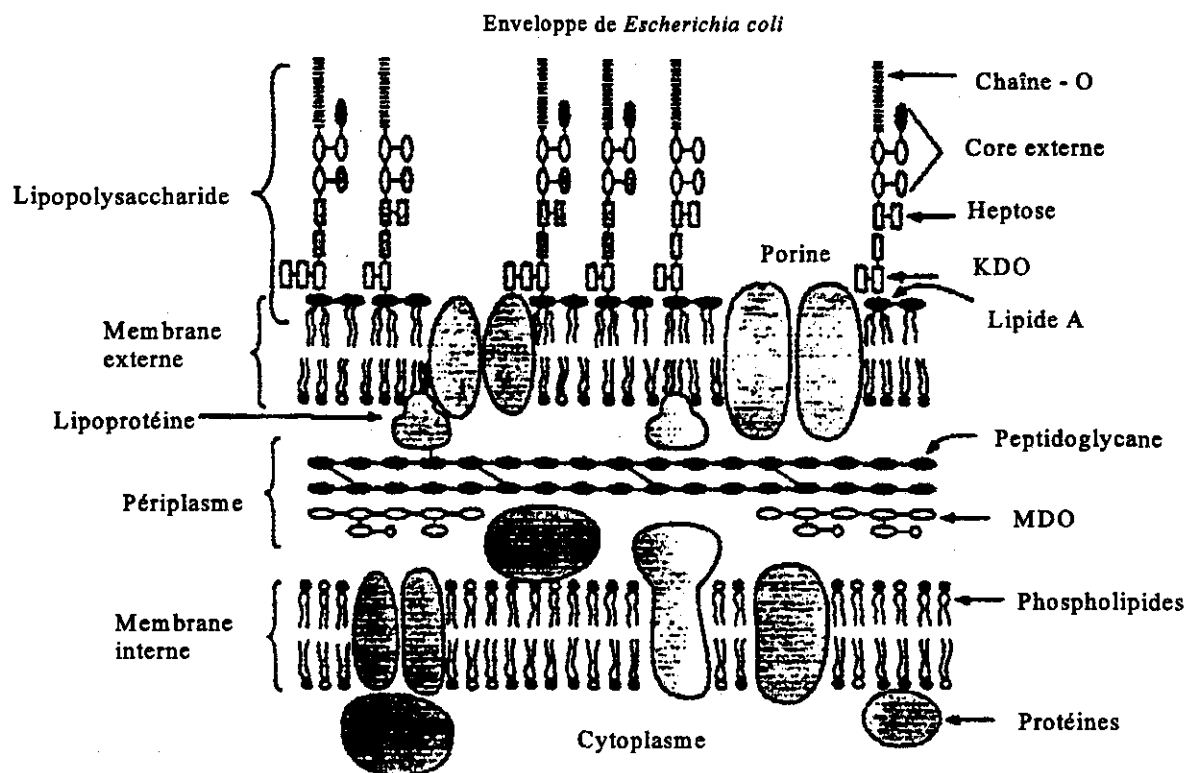
Il est à noter que certains termes techniques sont définis dans le glossaire. Ce sont les termes soulignés dans le texte.

CHAPITRE 1 : DESCRIPTION DES ENDOTOXINES

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides retrouvés dans la membrane cellulaire de certaines bactéries¹. C'est parce que les lipopolysaccharides sont toxiques qu'ils sont également appelés endotoxines. En général, on parle de lipopolysaccharides lorsqu'ils sont intacts dans la membrane cellulaire et d'endotoxines lorsque l'on parle des effets sur la santé ou de lipopolysaccharides libérés.

1.1 Membrane cellulaire

La structure fondamentale de la membrane cellulaire des bactéries Gram négatives est identique pour la majorité des espèces : une membrane externe complexe, une membrane cytoplasmique interne et une fine couche de peptidoglycane que l'on retrouve intercalée entre les deux précédentes. La membrane externe est double et organisée de façon asymétrique². Sa partie interne est constituée de protéines et de phospholipides tandis que dans la région externe on retrouve quelques protéines mais surtout des lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines.



Adapté de : Bacterial endotoxic lipopolysaccharides, Volume I, Molecular biochemistry and cellular biology.

Les bactéries Gram négatives contiennent donc les LPS sur la partie externe de leur membrane cellulaire². Les LPS jouent un rôle dans l'organisation et les fonctions de la membrane cellulaire². Les lipopolysaccharides sont essentiels à la croissance et à la survie de la cellule et ils sont uniques aux bactéries Gram négatives². Ils sont importants pour maintenir l'intégrité de la membrane et la forme de la cellule².

1.2 Structure des lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides sont ancrés dans la région hydrophobique de la membrane externe des bactéries Gram négatives². Bien qu'une grande diversité structurale soit rencontrée chez les différents sérotypes bactériens, la majorité des lipopolysaccharides présentent une architecture commune. Les lipopolysaccharides sont formés de trois régions : la chaîne O spécifique, le coeur et le lipide A.

1.2.1 Chaîne-O spécifique

La chaîne O-spécifique est constituée d'un polymère de molécules d'oligosaccharides identiques, qui sont appelées unités répétitives^{1,3}. Jusqu'à 50 unités peuvent se répéter pour former la chaîne O-spécifique. La nature, le type de lien, la structure ainsi que la séquence dans une unité répétitive sont des caractéristiques d'un lipopolysaccharide donné et sont uniques pour un sérotype bactérien³. La chaîne O-spécifique est la région qui représente la plus grande variabilité des lipopolysaccharides².

1.2.2 Coeur

La région du coeur est constituée d'hétéropolysaccharides³. La région du coeur se divise en deux régions : le coeur interne et le coeur externe. La variabilité structurale du coeur est limitée³. Les différences structurales du coeur se rencontrent principalement dans la région externe³. La région interne a une structure très conservée. Le coeur est lié de façon covalente au lipide A¹.

1.2.3 Lipide A

Le lipide A est constitué de molécules de glycolipides³. Il n'existe que des différences mineures au niveau de la structure du lipide A³. Le lipide A est l'élément le moins variable du LPS^{1,3}. Le lipide A contient des acides gras tri-hydroxylés qui sont chimiquement distincts de tous les autres

lipides retrouvés dans les membranes biologiques⁴.

1.3 Activités biologiques et fonctions des LPS

Les LPS isolés ou relâchés de la bactérie ont plusieurs activités biologiques; la pyrogénicité et la toxicité en sont des exemples^{3,5}. La chaîne-O spécifique du LPS est l'antigène de surface principale des bactéries Gram négatives³. C'est l'antigène reconnu de façon spécifique par le système immunitaire lors d'infections. Les endotoxines manifestent soit une activité immédiate tel la fièvre, l'hypotension ou une diminution du compte leucocytaire, soit une activité plus retardée comme l'induction d'anticorps spécifique aux endotoxines. C'est la réponse de l'organisme contre les LPS qui rend les endotoxines aussi poison.

Il est maintenant possible d'assigner un rôle structural et fonctionnel aux différentes régions du LPS. La chaîne-O spécifique est impliquée dans l'interaction hôte-parasite³; elle détermine la spécificité sérologique du LPS et par le fait même, de la bactérie, elle est réceptrice de bactériophage; elle est importante dans la virulence des bactéries et elle joue un rôle dans l'effet bénéfique des endotoxines (effet anti-cancérigène)³.

Le coeur interne maintient la propriété de barrière de la membrane externe bactérienne. Il est essentiel à la viabilité de la bactérie³.

Le lipide A quant à lui est la région hydrophobique qui permet le maintien du LPS à la membrane³. Le lipide A est responsable du caractère toxique des lipopolysaccharides¹⁻³. Le lipide A active la cascade d'anticorps indépendants du complément, il interagit avec les récepteurs des macrophages³. Le lipide A est lui aussi essentiel à la viabilité bactérienne³.

CHAPITRE 2 : LES ENDOTOXINES ET LEURS EFFETS SUR LA SANTÉ

2.1 Introduction

Les endotoxines sont ubiquistes dans la nature⁵. Pratiquement tout ce que nous mangeons, buvons et touchons contient des endotoxines. Les endotoxines sont parmi les toxines les plus dévastatrices et un des plus puissants adjuvants microbiens ayant le potentiel d'affecter le système immunitaire⁵. Par chance, la majorité des endotoxines sont inoffensives par ingestion car elles ne pénètrent pas le système sanguin⁵.

Les particules d'endotoxines inhalées se déposent à différents niveaux du système respiratoire selon leur dimension. La pénétration maximale au niveau profond des poumons a lieu pour des particules inférieures à 2 µm de diamètre⁶. La majorité des bactéries aéroportées sont dans cet ordre de grandeur en tant que cellules isolées et une grande proportion des poussières industrielles se rencontrent également dans cet ordre de dimension⁶.

Les endotoxines ont été impliquées pour la première fois comme agents causant une maladie professionnelle en 1942 par Neal⁷. Les travailleurs affectés étaient des fabricants de matelas utilisant du coton de mauvaise qualité. En 1961, Pernis et collaborateurs⁸ ont fait une étude pour déterminer le rôle des endotoxines dans certaines maladies professionnelles causées par l'inhalation de poussières végétales. Selon eux, plusieurs maladies professionnelles pourraient être attribuables à l'inhalation d'endotoxines. Parmi les maladies qu'ils ont citées, se retrouvent la fièvre du lundi, la byssinose, la toux du tisserand, la fièvre des imprimeurs de bibles, la fièvre des fabricants de matelas, le poumon du fermier, la bagassose, la fièvre du malt et la fièvre du grain. Ces chercheurs sont conscients que la contamination n'est pas exclusive aux bactéries Gram négatives; mais ils prétendent que les produits de ces bactéries jouent un rôle majeur dans la pathologie de ces maladies⁸. Cavagna et collaborateurs⁹ ont démontré en 1969 que l'inhalation d'endotoxines peut produire chez le lapin un changement du FEV₁ (volume d'expiration forcé en 1 seconde) semblable à ce qui est expérimenté le lundi par certains travailleurs des salles de cardage du coton. Ils concluent que l'inhalation répétée d'endotoxines induit chez le lapin un état d'hypersensibilité, une réaction inflammatoire des bronches et une altération des propriétés mécaniques des poumons⁹.

La présence de bactéries Gram négatives et de leurs endotoxines dans la poussière ou aérosol originant du milieu de travail a été associée par Rylander et Lundholm et collaborateurs¹⁰ à des symptômes non spécifiques de fièvre, de frissons et de malaises. Par contre, les données disponibles

de l'étude d'Edward sur les endotoxines et la maladie des poussières organiques ne permettent pas de conclure que les endotoxines soient responsables d'alvéolite allergique extrinsèque par des mécanismes biologiques associés aux propriétés endotoxiques elles-mêmes¹¹. Une substance provenant des bactéries Gram négatives et qui serait comparable aux endotoxines a été retrouvée dans certains milieux de travail. Cette substance est appelée par le chercheur "matériel ressemblant aux endotoxines", la relation de cette substance avec l'étiologie de byssinose et de la maladie des boues d'épandage peut être établie¹¹.

L'intérêt pour les endotoxines en milieu de travail a commencé il y a déjà plus d'un demi-siècle. Encore aujourd'hui, plusieurs recherches sur le sujet se poursuivent. Bien que nous soyons loin de connaître tout sur ce sujet plusieurs chercheurs considèrent que l'exposition aux endotoxines en milieu de travail comporte certains risques pour la santé^{9,10,12,13}. Une étude récente publiée en 1996 par Milton et collaborateurs confirme l'effet des endotoxines sur une diminution des fonctions respiratoires¹⁴.

2.2 Réponse cellulaire

2.2.1 Endotoxines et macrophages

Les macrophages font partie de la famille des globules blancs. En fait, ce sont les dérivés des monocytes qui une fois qu'ils ont atteint les tissus se transforment en macrophages. Le rôle du macrophage est de phagocyter les microorganismes, les corps étrangers et les débris cellulaires dans le but de les éliminer⁶.

Les endotoxines qui entrent en contact avec un macrophage sont capturées par pinocytose ou phagocytose selon leur dimension⁶. Une fois à l'intérieur du macrophage, les endotoxines sont capables d'affecter une variété de fonctions. La capacité d'attachement aux surfaces, la sécrétion d'enzymes et la libération de substances qui influencent les cellules du système immunitaire en sont des exemples. Les lymphocytes B et T, les neutrophiles et les plaquettes sanguines peuvent eux aussi influencer certaines fonctions des macrophages⁶. La présence d'endotoxines dans l'organisme entraîne plusieurs réactions qui agissent les unes sur les autres⁶. Les macrophages alvéolaires peuvent initier la migration des neutrophiles¹⁵. Les macrophages sont une source importante de prostaglandine PGF, qui agit comme un bronchoconstricteur⁶.

2.2.2 Endotoxines et neutrophiles

Le rôle des neutrophiles est de phagocyter, digérer et détruire les bactéries.

Les individus exposés aux bactéries Gram négatives par inhalation ont comme réaction initiale une augmentation du nombre de neutrophiles au niveau des voies^{10,16}. L'augmentation du nombre de neutrophiles dans les voies respiratoires est dépendante de la dose et est causée par le lipide A de la molécule du lipopolysaccharide¹⁷. Le lipide A est responsable de la réaction inflammatoire¹⁵. La réponse aux LPS s'effectue en deux parties. La première n'est pas influencée par une pré-exposition et elle est contrôlée par l'activité chimiotactique des macrophages. La seconde partie est reliée à la réponse immunitaire et elle est influencée par une pré-exposition¹⁵.

La libération d'acide arachidonique, de prostaglandine vasoactive, de thromboxane et de prostacycline due à la présence de radicaux d'oxygène libres peut entraîner le développement d'inflammation pulmonaire aiguë¹⁸. Les endotoxines sont directement toxiques pour les cellules épithéliales des voies respiratoires, mais leur principal effet nuisible est relié aux réponses inflammatoires qu'elles génèrent¹⁹. Les endotoxines remplissent les exigences pour une réponse inflammatoire aiguë avec les effets contrôlés par des médiateurs inflammatoires²⁰.

2.3 Réponse clinique

Les fonctions des voies respiratoires peuvent être altérées par les endotoxines inhalées. Dans des études expérimentales d'inhalation, les endotoxines causent de la fièvre, de la toux, des nausées, l'essoufflement et des obstructions respiratoires⁴.

Il est maintenant bien connu que l'exposition aux endotoxines cause de la fièvre chez les animaux et les humains avec un développement de tolérance après une exposition répétée⁶. Selon Plitman, les personnes non asthmatiques sont peu affectées par une exposition modérée aux endotoxines tandis qu'une exposition chronique peut induire un état ressemblant à l'asthme¹⁹. Les personnes exposées à la poussière aéroportée contenant des endotoxines développent une broncho-obstruction durant la période d'exposition.

Chez les éleveurs de porc, les bactéries Gram négatives et leurs endotoxines semblent jouer un rôle important dans le développement de symptômes et de changements des fonctions pulmonaires²¹. Elles semblent également impliquées dans les problèmes respiratoires reliés aux

aérosols des huiles des machines, mais selon ce chercheur d'autres composantes contribuent également à ces effets²². Rylander reconnaît que le syndrome des poussières organiques toxiques peut être causé par les endotoxines, des concentrations élevées de poussières ou d'autres composés organiques²⁰.

La bronchite chronique a été diagnostiquée chez des travailleurs non-fumeurs exposés aux poussières contenant des endotoxines⁶. Une étude suggère un rôle pour les endotoxines dans les maladies chroniques mais non les maladies aiguës^{23,24}.

Des investigations épidémiologiques fournissent des évidences pour que les Gram négatives ou leurs endotoxines soient un des agents majeurs causant la byssinose²⁴. L'agent clé induisant l'inflammation du tissu pulmonaire serait selon certains chercheurs les endotoxines bactériennes^{25,26}.

Pratt a conclu que les endotoxines présentes dans l'atmosphère d'un milieu de travail sont capables de causer des maladies chez les individus qui y sont exposés²⁷.

2.4 Relation dose-réponses

Plusieurs chercheurs ont démontré que pour les travailleurs du coton, les effets sur la santé corrélaient beaucoup mieux avec les niveaux d'endotoxines qu'avec ceux de poussière^{23, 28, 29}. Même où les concentrations de poussières sont bien contrôlées, les endotoxines peuvent présenter un risque pulmonaire²⁸. En Chine, une relation a été rapportée entre le niveau d'endotoxines aéroportées et des symptômes cliniques comme la bronchite rencontrée chez les travailleurs du coton²⁴. Une étude publiée au début de l'année 1996, a démontré une relation de dose-réponse entre le niveau d'endotoxines (4 ng/m³) et des diminutions de fonctions pulmonaires. Cette étude a eu lieu dans une manufacture de fibre de verre¹⁴.

Selon Kennedy, bien qu'il n'y a pas de différence pour la spirométrie, l'augmentation de la prévalence de byssinose, de bronchite chronique et l'augmentation du FEV₁, durant le quart de travail suggèrent qu'une exposition variant de 1 à 20 ng d'endotoxines par mètre cube d'air constitue un mauvais effet sur la santé respiratoire tel que défini par le Guideline de l'American Thoracic Society²³.

Michel a rapporté qu'une concentration de 20 ug de LPS pourrait induire une obstruction bronchique associée à l'augmentation de la réactivité non-spécifique de l'histamine bronchique chez

les asthmatiques mais pas chez les sujets normaux³⁰.

De leur côté Castellan et collaborateurs ont démontré une relation de dose-effet entre les endotoxines et la diminution du FEV₁³¹. En effet, aucune diminution n'est observée à des concentrations inférieures à 10 ng par mètre cube tandis que des concentrations supérieures à 50 ng/m³ produisent une diminution significative du FEV₁³¹. Et finalement, des doses d'endotoxines variant entre 92 et 470 ng/m³ provoqueraient un changement des fonctions pulmonaires³².

Selon les études, les niveaux d'endotoxines nécessaires pour induire un symptôme clinique varient grandement. Le tableau 1 fournit différents niveaux d'endotoxines proposés par Rylander selon les symptômes qu'il a observés²⁶.

Tableau 1 : Relation dose-réponses

Symptôme	Limite ug/m ³	
	Bien certaine	Non certaine
Fièvre	0,5 - 1,0	
Diminution FEV ₁	0,1 - 0,2	
Oppression thoracique	0,3 - 0,5	
Inflammation (bronchite)		0,02

CHAPITRE 3 : LES ENDOTOXINES ET LE MILIEU DE TRAVAIL

Les endotoxines se rencontrent dans tous les environnements. Bien que les endotoxines se rencontrent partout, il n'en demeure pas moins que certaines conditions ou activités peuvent augmenter leur concentration dans un milieu. En effet, comme nous l'avons expliqué auparavant, les endotoxines se retrouvent dans la membrane des bactéries Gram négatives, il est donc normal de retrouver plus d'endotoxines dans des milieux où la présence de telles bactéries est favorisée. Les excréments sont toujours remplis de ce type de bactérie donc, tout les endroits où il y a des excréments sont plus susceptibles d'être contaminés par des endotoxines. Les réservoirs d'eau peuvent également permettre la prolifération des bactéries Gram négative et ainsi contenir des concentrations variables d'endotoxines. Tous les endroits où les bactéries Gram négatives peuvent se retrouver ou peuvent s'être déjà retrouvées contiennent des endotoxines. Ce sont les concentrations présentes qui varient d'un lieu à un autre.

Les concentrations d'endotoxines présentes dans l'air d'un milieu de travail vont varier selon le niveau des concentrations d'endotoxines du milieu porteur et l'agitation nécessaire pour le procédé. Les manipulations qui créent des aérosols contribuent à l'augmentation des concentrations d'endotoxines dans l'air. Des concentrations d'endotoxines assez élevées peuvent se retrouver dans l'air et ce, même si les concentrations de bactéries Gram négatives viables de l'air sont faibles.

Comme il existe différentes façons d'exprimer les niveaux d'endotoxines, il est important de standardiser leur notation pour faciliter la comparaison entre les différents milieux étudiés. Les résultats d'analyses d'endotoxines sont exprimés en poids (μg , ng) ou en unité d'endotoxines (EU : endotoxines unit) par mètre cube d'air. Plusieurs chercheurs considèrent l'unité d'endotoxine comme plus représentative. Toutefois, depuis l'utilisation de l'unité d'endotoxine, deux standards sont utilisés et il est essentiel que les chercheurs spécifient lequel des deux standards a été utilisé dans leur étude pour que des comparaisons puissent être effectuées. Il existe les standards EC_2 et EC_5 , chaque standard correspond à un poids d'endotoxine nécessaire pour obtenir une réaction prédéterminée. Le standard EC_5 est de plus en plus utilisé car il correspond à environ $0,1 \text{ ng}$ d'endotoxine, ce qui facilite les calculs. Dans le tableau 1, tous les résultats ont été convertis en ng d'endotoxine / m^3 d'air. Le manque d'information de certaines études rendait la conversion en EU/m^3 d'air impossible.

Le tableau 2 présente un résumé des différents milieux de travail où des concentrations d'endotoxines ont été mesurées. Les méthodes utilisées pour les différentes études ne sont pas les

mêmes, une certaine variation des résultats peut donc être attribuable à cette variabilité des méthodes.

Tableau 2 : Niveaux d'endotoxines rencontrés dans différents milieux de travail

Milieu de travail	ng/m ³	Référence
Biotechnologie	0,07-1812	33
Boulangerie	0,015-6,75	34
Brasserie (silo)	60-927	35
Déchargement silo	159-8850	36
Élevage d'oiseaux	30 - 720	37
Entrepôt d'avoine	1286	36
Fabricant meubles bois	1,2 - 350	38
Ferme de grain	5,9-16000	34
Ferme laitière	6 - 16	34,39
Ferme animaux à fourrure	1 - 1950	34,40
Ferme	10-1600	41
Fibre de verre	0,4 -27800	13,14
Humidificateur	390	42
Industrie du tabac	1 - 106	34
Industrie d'aliments pour animaux	0,1 - 1850	32,43
Moulin à bois	0,1 -79	34
Moulin à grain	3,5 - 528	34
Pâte et papier	1 - 76	34
Porcherie	1 - 75000	21,34,39,44-46
Poulailler	1 - 2679	34,45,47-49
Préparation de litière	43,8-1429	36
Production de riz	48 - 1341	50
Silo de maïs	19 - 5452	36

Milieu de travail	ng/m ³	Référence
Textile (coton)	0,9 - 2200	23,24,45,52,53
Traitement des eaux	0,6 - 410	34,54,55
Traitement de déchets	0 - 990	56,57
Usine préparation des patates	45000 - 1893000	58
Vidangeur de compost	6 - 26	59

Bien que les endotoxines se retrouvent partout, il n'en demeure pas moins que les travailleurs de certains milieux de travail sont exposés à des concentrations plus élevées que celles que l'on rencontre dans un milieu sain. Le niveau le plus élevé retrouvé dans les différentes études consultées l'a été dans une usine de préparation des patates. Des concentrations atteignant $1,8 \times 10^6$ ng/m³ d'air ont été mesurées dans de tels endroits. Les travailleurs exposés dans les fermes de grain, la préparation de la litière et dans les usines de fibres de verre sont également en présence de concentrations élevées d'endotoxines. Les concentrations élevées d'endotoxines rencontrées dans certains milieux de travail semblent surprenantes à priori, par exemple, les concentrations rencontrées dans une usine de fibre de verre. Ces concentrations élevées peuvent s'expliquer par le principe du procédé de fabrication qui utilise de l'eau recirculée. Cette eau permet la prolifération de plusieurs bactéries dont particulièrement certaines bactéries Gram négatives. Dès que la croissance de bactéries de ce type est possible, la présence d'endotoxines est à suspecter.

CHAPITRE 4 : VALEURS MAXIMUM D'EXPOSITION AUX ENDOTOXINES

Des chercheurs ont associé des symptômes cliniques à différents niveaux d'endotoxines. La diminution de 5% du volume d'expiration forcée en une seconde (FEV₁) est considérée par plusieurs chercheurs comme étant une manifestation objective significative attribuable à l'effet des endotoxines. Différents niveaux d'endotoxines reconnus pour leurs effets sont présentés au tableau 3.

Tableau 3 : Niveaux d'endotoxines et effets

Diminution du FEV₁ 5%	
Milton, Wyoi, Kriebel, Walters, Hammend et Evans 96 ¹⁴	15 ng/m ³
Rylander et Morey 82 ⁵² Rylander Morey et Bethea 83 ⁵³	500 ng/m ³
Castellan et al. 1987 ³¹ Sujets sensibles à la poussière de coton	50 ng/m ³
Rylander 87 ²⁶	100 - 200 ng/m ³
Pas de diminution du FEV₁	
Hagling et Rylander 84 ⁶⁰ étudiants travailleurs fumeurs	170 ng/m ³ 80 ng/m ³
Rylander, Hagling et Lundholm 85 ⁶¹	~ 100 ng/m ³
Castellan 87 ³¹ Sujet sensible à la poussière de coton	10 ng/m ³
Jacobs 89 ⁶² Sujet sensible à la poussière de coton	10 ng/m ³
Fièvre	
Hagling et Rylander 84 ⁶⁰	300 ng/m ³
Rylander 87 ²⁶	500 - 1000 ng/m ³
Oppression thoracique	
Rylander 87 ²⁶	300 - 500 ng/m ³

Selon les études consultées, les niveaux d'endotoxines responsables d'une diminution du FEV₁ de 5% varient entre 15 ng/m³ pour les travailleurs d'une usine de fibre de verre, jusqu'à 500 ng/m³ pour d'autres travailleurs^{14, 26, 31, 52, 53, 60-62}. D'après les études de Castellan et Jacobs, les individus sensibles ne subiraient aucun effet lorsqu'ils sont exposés à des concentrations inférieures à 10 ng/m³^{31,60}. Pour les autres individus, et ce, en incluant les personnes qui fument, aucune diminution du FEV₁ n'est observée à des concentrations variant de 80 à 170 ng/m³⁶⁰. Les concentrations nécessaires à l'apparition de fièvre chez l'individu exposé sont entre 300 ng/m³ et 1 000 ng/m³ et des sensations d'oppression de poitrine seraient ressenties à des concentrations de 300-500 ng/m³^{26,60}.

Le tableau 4 présente trois limites d'exposition qui ont été suggérées par différents chercheurs. Ces limites d'expositions ont été suggérées à la fin des années 1980. Rylander, Hagling et Lundhold suggèrent en 85 un niveau d'exposition maximal de 33 ng/m³⁶¹. Castellan et Jacobs suggèrent des limites d'expositions de 9-10 ng/m³^{31,62}. Ces chercheurs considèrent qu'à de tels niveaux, même les gens sensibles ne subissent pas d'effet clinique significatif. Palchark recommande quant à lui une limite d'exposition de 30 ng/m³, et ce, pour la production à grande échelle de protéines bactérienne⁶³. Palchark base sa recommandation sur les diminutions de FEV₁ de 5% ou par la fièvre causée pour des expositions à 300 ng/m³. Il considère qu'un facteur de sécurité de 10 est suffisant pour protéger les individus en général⁶³.

Tableau 4 : Limites suggérées d'exposition

Rylander et collaborateurs 85 ⁶¹	33 ng/m ³
Castellan et collaborateurs 87 ³¹ (Sujet sensible)	9 ng/m ³
Palchenk 88-90 ⁶³	30 ng/m ³
Jacobs 89 ⁶²	10 ng/m ³

D'après d'autres chercheurs, les endotoxines ne peuvent être considérées comme seules responsables des effets sur la santé. De plus, les méthodes de prélèvement et d'analyses se doivent d'être améliorées et standardisées avant de fixer une limite d'exposition définitive.

CHAPITRE 5 : ÉCHANTILLONNAGE DES ENDOTOXINES

L'échantillonnage des endotoxines présentes dans l'air des milieux de travail s'effectue avec les mêmes méthodes de prélèvement que l'échantillonnage des poussières. Kennedy et Jacobs ont utilisé des élutriateurs verticaux mais le prélèvement sur filtre est plus souvent utilisé car beaucoup plus simple^{23,24,51,62}. Toutefois, le type de filtre n'est pas encore standardisé et varie d'un utilisateur à un autre. Les types de filtres les plus utilisés sont ceux en chlorure de polyvinyle (PVC) et en acétate de cellulose^{4,22,51,64-67}. Par contre, des filtres en fibre de verre⁶⁸, en Polyflon®⁶⁹, en Teflon®⁷⁰ et en polycarbonate⁷¹ ont été également utilisés par certains chercheurs. Selon Gordon et l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), l'efficacité du milieu capteur serait dépendant du lieu de l'échantillonnage^{4,22}. Les filtres en fibre de verre ne seraient pas adaptés aux prélèvements dans les milieux contenant de la poussière de coton, tandis que ceux en chlorure de polyvinyle auraient un rendement plutôt faible pour l'analyse des endotoxines aéroportées, générées lors de l'utilisation des huiles de coupe²². Dans une autre étude Gordon rapporte que les filtres en acétate de cellulose sont meilleurs que ceux en fibre de verre et en chlorure de polyvinyle⁶⁴. Puis finalement, d'après Olenchok, il n'y a que très peu de différence selon le type de filtres utilisés et que selon lui les filtres en PVC et en fibre de verre donnent des résultats semblables⁶⁵.

Les débits utilisés dans les différentes études consultées varient entre 2 et 4 LPM. Les temps de prélèvement varient énormément d'une étude à une autre ainsi que dans une même étude selon le lieu échantillonné. Les temps d'échantillonnage rencontrés ont varié entre 15 minutes pour un système industriel de recirculation de l'eau⁷² et 82 heures pour une salle de repos adjacente à une unité de soins pour animaux⁶⁹. Bien qu'il y ait des extrêmes, la durée moyenne de prélèvement est de quelques heures principalement entre 2-8 heures dépendamment des situations^{23,66,68}.

Une fois les prélèvements terminés, l'étape suivante est l'extraction des endotoxines recueillies. Cette étape s'effectue au laboratoire, dans des conditions stériles et exemptes d'endotoxines. L'extraction des endotoxines présentes sur le filtre se fait soit par traitement aux ultrasons⁶⁹⁻⁷² ou par agitation^{44,65,68,70,73}. Les filtres sont retirés des supports plastiques et placés dans un volume connu de liquide. L'extraction aux ultrasons s'effectue pour environ 60 minutes, le surnageant est conservé pour l'analyse des endotoxines. La méthode d'extraction par agitation consiste aussi en une extraction d'environ 60 minutes. Toutefois, pour cette méthode, les chercheurs ajoutent une étape supplémentaire qui consiste en une centrifugation du surnageant à une accélération de 1000 g pour une durée de 10 minutes⁷⁰.

Deux milieux liquides peuvent être utilisés pour l'extraction des endotoxines. Certains utilisent de l'eau tandis que d'autres préfèrent l'utilisation d'un tampon phosphate. Milton rapporte que l'utilisation d'un tampon augmente la sensibilité de l'analyse comparativement à l'eau ⁷².

Il n'existe pas encore de méthode standard d'échantillonnage pour les endotoxines. Les méthodes utilisées pour l'échantillonnage des endotoxines sont les mêmes que celles présentement utilisées pour les poussières. Le choix du filtre, du temps d'échantillonnage et de la méthode d'extraction n'est pas standardisé.

CHAPITRE 6 : DÉTECTION DES ENDOTOXINES - MÉTHODES D'ANALYSE

Il existe trois principaux types de tests de détection des endotoxines.

- pyrogénicité chez le lapin
- analyse chimique
- Lysat d'Amoebocyte de Lymulus ou LAL

6.1 Mesure de pyrogénicité chez le lapin

La méthode traditionnelle de détection est la mesure de l'effet pyrogène des endotoxines chez le lapin. Le test du U.S. pharmacopeia (U.S.P.) utilise l'augmentation de la température corporelle interne du lapin après injection intraveineuse de la solution à tester⁷⁵. Pour effectuer ce test, une dose de 10 ml de solution / Kg de poids corporel du lapin est injectée dans trois lapins. Si un lapin subit une augmentation de température de 0,6°C et que la somme de l'augmentation des températures des trois lapins est supérieure à 1,4°C, le test est positif. Tout test positif doit être confirmé sur cinq autres lapins. Dans ce test final, trois lapins doivent subir une augmentation de température de 0,6°C et la somme de l'augmentation pour les huit lapins doit être supérieure à 3,7°C. Selon Sharma, ce test est capable de déceler des nanogrammes d'endotoxines, mais il demeure susceptible à l'erreur⁷⁵.

Plusieurs problèmes demeurent reliés à l'utilisation de ce test sur les lapins.

- implication des animaux⁷⁶
- coûts élevés, manipulations laborieuses⁷⁶
- variabilité biologique⁷⁶
- variation due à l'environnement⁷⁵
- le produit à tester peut être pyrogène sans contenir d'endotoxines⁷⁵
- le produit peut provoquer une baisse de température et ainsi camoufler la présence d'endotoxines⁷⁵

6.2 Analyse chimique

L'utilisation des méthodes chimiques est plus récente que l'utilisation des autres types de méthodes. La détection des endotoxines par méthodes chimiques est basée sur la détection d'un marqueur. Le marqueur chimique choisi doit se retrouver dans l'unité bactérienne responsable de la toxicité et lui être spécifique. La région du lipide A, l'unité responsable de la toxicité de la molécule d'endotoxine et de la coagulation de la réaction du Lysat d'Amoebocyte du Lymulus est

souvent utilisée. Cette région contient l'acide 3 ou β hydroxymyristique (BHM). Le BHM est l'acide gras saturé le plus abondant du lipide A^{77,78} et est spécifique aux endotoxines des bactéries Gram négatives⁷⁹. Le BHM est utilisé comme marqueur chimique pour doser les endotoxines dans la majorité des recherches consultées^{77,78,80-82}. La détection du BHM peut se faire à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse (CPG) très souvent jumelé à un spectromètre de masse (SM), l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance a aussi été rapportée dans une étude^{77,80,83}.

L'acide 3-Hydroxymyristique peut être analysé par CPG après avoir été méthylé pour augmenter sa volatilité. La méthylation est effectuée à l'aide de différents produits spécifiques aux acides gras saturés⁷⁷. Certains chercheurs utilisent un CPG muni de deux colonnes pour effectuer la première partie de l'analyse. Par la suite, ils peuvent utiliser un CPG/SM s'ils jugent nécessaire la poursuite de l'analyse⁷⁷. Une telle façon de procéder permet de réduire les coûts d'analyse reliés à l'utilisation du CPG/SM. Morris recommande la prudence lors de l'utilisation du CPG pour effectuer l'analyse des endotoxines⁸³. Un des inconvénients serait la complexité de l'interprétation des résultats par des utilisateurs occasionnels⁸³. Maitra utilise le CPG/SM à balayage d'ions sélectif pour déterminer la présence ou l'absence d'endotoxine dans un échantillon⁷⁸. Il utilise cette méthode de façon qualitative et non quantitative. Malgré les inconvénients vus par certains chercheurs, Seid utilise un spectromètre de masse à balayage d'ion négatif produit par bombardement d'atome rapide (FAB) comme étant une méthode simple et rapide pour faire l'identification d'acides gras estérifiés du lypopolysaccharides. Par contre, cette méthode comporte également des lacunes au niveau quantitatif⁷⁹. La chromatographie liquide a été utilisée par Morris pour déterminer la quantité d'acide 3-hydroxymyristique. Quoique prometteuse, cette méthode ne donne toutefois pas des résultats exacts sur la quantité d'endotoxines présentes lorsqu'utilisée pour analyser des échantillons qui ont été traités pour désintoxication alcaline⁸⁰.

En 1993, Mielniezuk et collaborateurs utilisent une méthode de CPG/SM pour analyser la poussière d'un système de ventilation et ils rapportent utiliser cette méthode pour des échantillons d'air également. Ces chercheurs ont observé que les échantillons environnementaux contiennent des acides 2- hydroxylés qui ne sont pas d'origine bactérienne. Ils veulent séparer cet acide gras des acides 3- hydroxylés car selon eux il existe un risque de surévaluer la quantité d'endotoxines analysée à l'aide d'un CPG/SM⁸¹. Les acides 2 et 3 hydroxylés ne sont pas complètement séparés par CPG. Ils ont réussi à séparer ces deux acides à l'aide d'un CPG/SM⁸¹.

Une dernière technique utilisée pour marquer le groupe hydroxy de l'acide gras 3- hydroxylé

a été proposée par un chercheur. Ce chercheur utilise le marquage par fluorescence qui s'avère sensible à la spectrométrie⁸⁴. Avec cette technique il peut déceler 100 pg d'endotoxines de *Salmonella abortus equi* dans une solution d'eau⁸⁴.

6.3 Méthodes LAL

6.3.1 Histoire du test du LAL

Le développement du test de la limule utilisé pour la détection des endotoxines est le résultat d'études effectuées sur l'effet des bactéries Gram négatives sur le sang de la limule mais, plus particulièrement *Limulus polyphenus*.

L'histoire de ce test débute en 1885 par une étude de Howell⁸⁵. Il a décrit dans un petit circulaire de l'Université de Hopkins la coagulation du sang de *Limulus polyphenus* lorsqu'il est exposé à l'air⁸⁶. Au cours des années 1960, le Dr Bang est à la recherche de quelques pathogènes marins susceptibles de l'intéresser lorsqu'il constate que ce sont les bactéries Gram négatives qui causent la coagulation du sang de la limule et non simplement l'air⁸⁵. D'après les recherches des Dr Bang et Levin, ce sont les amœbocytes du sang de la limule qui contiennent les composés nécessaires aux mécanismes de coagulation du sang de cet invertébré⁸⁵. C'est en 1965 que le Dr Levin prépare le premier lysat d'amœbocyte qui constitue maintenant toute la base du test LAL utilisé pour détecter les endotoxines⁸⁵.

6.3.2 Mécanisme du test du LAL

La coagulation du lysat d'amœbocyte est produite par une cascade de protéases. Les endotoxines activent une protéase sérine zymogène. Le facteur activé convertit l'enzyme de précoagulation en enzyme de coagulation⁸⁷. L'enzyme résultante scinde deux liens du coagulogène soluble, il en résulte de la coaguline un composé rendu insoluble⁸⁷. Le coagulogène et l'enzyme de précoagulation sont contenus dans les hémocytes de la limule. Durant la coagulation, un grand peptide est libéré de la portion centrale de la molécule⁸⁸. Le gel résultant est constitué de chaînes A et B liées ensemble par deux liens disulfides⁸⁸.

Le facteur C est l'activateur initial de la cascade de coagulation qui est enclenchée par la présence de LPS. Ce Facteur C est converti auto-catalytiquement en présence d'endotoxines⁸⁸. En présence du 1-3- β -Glucane, une substance produite par les moisissures, ce n'est pas le facteur C

qui est activé mais le facteur G. Cet autre facteur active aussi l'enzyme de précoagulation⁵ ce qui provoque une réaction positive du test même en l'absence des LPS.

L'utilisation de test du LAL a été acceptée car il est sensible, spécifique, simple et reproductible^{75,89}. Il est aussi moins coûteux que le test traditionnel avec les lapins et moins complexe que les tests d'analyse chimique. Le test du LAL peut détecter des subnanogrammes d'endotoxines⁷⁵. En 1986, le désavantage de ce test selon Sharma était que ce test ne pouvait détecter que les endotoxines et que d'autres produits pyrogènes donnaient des résultats négatifs⁷⁵. D'autres chercheurs ont par contre démontré une réaction positive avec du peptidoglycan, des acides lipoprotéique et des fragments de parois de bactéries Gram négatives⁹⁰.

Hofman a démontré qu'en présence de concentrations élevées de *Staphylococcus*, une bactérie Gram positive, une gélification du réactif LAL se produit. Le test de LAL est trop spécifique pour certains chercheurs⁷⁵ et non rigoureusement spécifique pour d'autres⁹⁰. Ce test a toutefois remplacé le test U.S.P. dans la pratique courante des laboratoires.

6.3.3 Méthode de coagulation du gel

Avec les années, différentes méthodes ont été mises au point pour améliorer le test du LAL. La première méthode qui a été utilisée est celle de la coagulation du gel. Pour réaliser cette méthode, un substrat ayant une sensibilité connue aux endotoxines est placé en présence du produit à tester. Le test se fait dans des éprouvettes ou des micro-plaques. S'il y a formation d'un gel, le produit contient une concentration d'endotoxines supérieure à la sensibilité du réactif. L'utilisation du test LAL de cette façon n'est pas quantitative, toutefois, cette méthode peut être modifiée et devenir semi-quantitative si le test est effectué sur différentes dilutions du produit à tester. En utilisant des dilutions, le résultat obtenu s'exprime en intervalle de concentrations et est semi-quantitatif. La grandeur de l'intervalle dépend de la dilution effectuée. Une dilution 1 : 1,25 donne des intervalles de concentrations inférieures à une dilution 1 : 2⁸⁹. Pour pouvoir déterminer la sensibilité du réactif, le test est toujours effectué avec plusieurs dilutions d'une solution d'endotoxines standard.

Avec la méthode de coagulation du gel, il est parfois difficile de différencier un test positif d'un test négatif. Des chercheurs ont proposé une méthode de visualisation en utilisant du sang de mouton défibriné⁹¹. Lorsque le test est positif, le sang demeure en petite goutte sinon il est dispersé dans la solution.

La technique de la coagulation de gel est la plus simple présentement disponible mais d'autres techniques sont plus intéressantes à cause de leur caractère quantitatif⁷⁶. De plus, la méthode de coagulation dépend beaucoup de l'interprétation de l'utilisateur.

6.3.4 Méthode turbidimétrique

La méthode turbidimétrique du test LAL est une méthode quantitative de mesure des endotoxines. Différents appareils permettant de mesurer la turbidité peuvent être utilisés. Cette méthode est basée sur le temps nécessaire au développement d'une certaine densité optique. Deux techniques peuvent être utilisées; la technique du point final qui mesure le temps nécessaire pour atteindre une densité optique prédéterminée ou la technique cinétique qui mesure l'évolution des différentes densités optiques dans le temps. Les concentrations d'endotoxines présentes dans un produit sont calculées à partir de courbes standard. Les appareils pour les méthodes turbidimétriques sont composés d'un lecteur optique, d'un accumulateur de données qui collecte et emmagasine les densités optiques obtenues à partir du lecteur et d'un programme qui peut construire les courbes standard et calculer les concentrations d'endotoxines⁹²⁻⁹⁵.

Le LAL-4000 peut faire l'incubation et la lecture de 20 échantillons en simultané. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 565nm, cet appareil prend une lecture à toutes les 5 secondes. La température est maintenue à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ⁹³. Le Multiscan est un autre appareil qui traite jusqu'à 80 échantillons. Il fait également l'incubation à 37°C pour 60 minutes. Les densités optiques sont enregistrées à une longueur d'onde de 380nm avec un photomètre à haute vitesse. Le Multiscan peut ou non être branché à un interface pour le traitement des données⁹⁴. Comme dernier exemple, le Toximètre ET-201 traite 12 échantillons. Cet appareil fait la lecture de la densité optique à 660nm et ce, à toutes les 12 secondes. Les concentrations d'endotoxines sont calculées selon le temps qui est nécessaire pour atteindre une diminution de 5% du rapport de la transmission initiale⁹². Selon l'appareil utilisé une méthode d'analyse spécifique doit être utilisée.

6.3.5 Méthode chromogénique

La méthode chromogénique utilise un substrat incolore qui mis en présence de l'enzyme de coagulation est scindé et devient d'une couleur jaune. Ce substrat est composé d'une séquence d'acides aminés identique à celle retrouvée à l'extrémité scindée du coagulogène par l'enzyme de la limule. En utilisant le réactif du LAL en excès, la quantité d'enzymes de coagulation formée est directement proportionnelle à la quantité d'endotoxines présente. Après un certain temps, l'enzyme

formée catalyse la séparation du p-nitroaniline (pNa) qui sert de substrat colorimétrique. Comme pour les méthodes turbidimétriques, il est possible de mesurer la concentration d'endotoxines à l'aide d'une seule lecture de densité optique prise à un temps donné ou de faire une étude cinétique et de vérifier le taux de développement de la couleur dans le temps. Pour la première technique, la réaction est arrêtée après un temps prédéterminé et ce le plus précisément possible. L'arrêt de la réaction s'effectue avec de l'acide acétique. Les méthodes chromogéniques cinétiques peuvent se faire en une ou deux étapes. Pour les tests en une étape tous les réactifs sont combinés et la température d'incubation, le pH et le temps de réaction ont été optimisés pour tous les réactifs en même temps. Le test en deux étapes se fait pour des durées d'incubation différentes et des pH différents selon l'étape du test⁹⁶. Des chercheurs ont démontré qu'il y avait une grande variabilité entre les différents lots des manufacturiers⁹⁷. Pour réduire les erreurs reliées à ce problème, il est très important de faire une courbe standard pour chaque test.

Les limites de détections obtenues des différentes recherches consultées varient selon le type de test utilisé, soit de 0,0005 EU/ml pour un test de type point final effectué en 2 étapes, 0,125 EU/ml pour le même type de test mais effectué en une seule étape⁹⁸. Une limite de détection de 0,03 EU/ml a été obtenue par Lindsay pour un test de type cinétique. Les coefficients de corrélation obtenus pour les pentes de courbes standard étaient supérieurs à 0,98⁹⁷⁻⁹⁹.

Les chercheurs utilisant la méthode chromogénique utilisent tous le pNa comme indicateur colorimétrique. La longueur d'onde utilisée pour mesurer l'apparition du produit est de 405 ou 410 nm^{87,96-98,101-103}. Un chercheur propose une méthode utilisant 2 longueurs d'onde soit 405 et 492nm, la dernière servant de référence. Selon ce chercheur, cette technique permettrait d'effectuer une correction pour des absorptions non-spécifiques⁸⁷.

Les temps d'incubation varient beaucoup d'une méthode à une autre. Un test en deux étapes de type point final peut se faire avec une première incubation de 5 minutes suivies d'une seconde de 7 minutes¹⁰¹. Tandis que la méthode cinétique utilisant une densité optique prédéterminée et effectuée en deux étapes prend 10 minutes pour la première et jusqu'à 90 minutes pour la seconde¹⁰¹. En général, le temps d'incubation est d'environ 30 minutes^{95,96,103}. Les méthodes d'analyses varient beaucoup d'un chercheur à un autre, mais la méthode chromogénique semble une méthode simple et fiable pour effectuer l'analyse des endotoxines.

6.3.6 Inhibition du test LAL

Avant de pouvoir analyser un produit à l'aide du test du LAL il faut démontrer qu'il n'y a pas d'inhibition ou d'activation de créer par le produit à analyser. L'absence d'inhibition ou d'activation peut être démontrée en obtenant la même sensibilité du réactif LAL dans l'eau que dans le produit.

Si le produit affecte le réactif du LAL, des dilutions peuvent être effectuées jusqu'à ce que la sensibilité dans le produit égale la sensibilité obtenue dans l'eau^{99,104}. Cette technique s'appelle la dilution d'équivalence de l'eau. On peut aussi effectuer la courbe standard dans le produit au lieu de l'eau et ainsi obtenir la courbe standard pour le produit^{99,104}. Pour que cette méthode soit valable, la courbe standard dans l'eau doit être parallèle à la courbe obtenue avec le produit. Si les courbes sont parallèles, le facteur d'inhibition est constant¹⁰⁴. Autre que la dilution, une filtration du produit peut être effectuée pour séparer les endotoxines du composé qui crée une inhibition ou une activation¹⁰⁵. Pour doser les endotoxines dans un produit qui a un effet sur le réactif du LAL, certains chercheurs utilisent une technique d'adsorption sur des histines immobilisées¹⁰⁵. Cette technique est complexe et très longue. De plus, seulement 83% des endotoxines sont récupérées¹⁰⁵.

Il faut également noter que certains produits colorés interfèrent avec les méthodes turbidimétriques et chromogéniques, l'utilisation d'anticorps monoclonaux a donc été suggérée¹⁰⁶. Au cours des dernières années, un test immunologique utilisant un anticorps contre le peptide C a été proposé¹⁰⁷. Le peptide C est produit lors de l'activation du substrat LAL en présence d'endotoxines¹⁰⁷. Les protéines présentes sont séparées à l'aide d'un gel d'électrophorèse. Ensuite, un immunoblot est réalisé avec les anticorps anti-peptide C pour repérer et doser le peptide C présent. La lecture se fait à l'aide d'un lecteur ELISA à 490 nm de longueur d'onde¹⁰⁷. Ce test est sensible et utilise seulement 5% du réactif LAL utilisé par les autres méthodes¹⁰⁷.

Comme le réactif LAL initial n'était pas spécifique à 100% aux endotoxines, Obayashi a créé un nouveau substrat qui ne contient pas de facteur G, ce facteur étant responsable de la réactivité du substrat avec les polysaccharides fongiques¹⁰⁸. Il appelle ce nouveau test le ES-test pour Endotoxines Spécifique.

Puis finalement, avant de faire un test LAL, il faut s'assurer que tout le matériel utilisé est exempt de pyrogène. En général, le traitement du verre à 180-200°C pour une durée de 4 heures est considéré suffisant pour rendre le matériel sans pyrogène^{99,101,109}. Certains chercheurs vont préférer

l'utilisation du plastique qui peut être acheté déjà traité et exempt de produits pyrogènes^{87,97}.

CONCLUSION

Ce bilan de connaissances a permis de reconnaître que les endotoxines se retrouvent dans plusieurs milieux de travail et que dans certains cas, les concentrations observées étaient élevées. Certains effets sur la santé sont connus et des valeurs limites d'exposition sont maintenant proposées.

Une méthode d'analyse sera bientôt implantée au laboratoire de l'IRSST. La méthode utilisant le test du LAL avec l'approche chromogénique a été retenue car elle est une bonne alternative entre la complexité de certaines méthodes et la fiabilité des autres.

GLOSSAIRE

- 1-3 β -Glucane :** Composé produit par les moisissures.
- Acide arachidonique :** Acide gras non-saturé à 20 atomes de carbone dérivé des phospholipides des membranes cellulaires, est dégradé en prostaglandine, Prostacycline et Thromboxane.
- Amoebocytes :** Composante de l'équivalent du sang chez la Limule.
- Bactériophage :** Un virus capable de se répliquer dans une cellule bactérienne. Virus qui détruit activement certaines bactéries.
- Chimiotactique :** Détection et mouvement vers (ou à l'opposé) d'un produit chimique par une cellule.
- E.L.I.S.A :** Immuno-Enzymatique, procédé de dosage des antigènes et des anticorps inspiré de la méthode radio-immunologique par une enzyme.
- Immunoblot** Immuno-électrophorèse (Western blotting, electroblotting, Immuno-electroblotting, immnoblotting).
- Lipopolysaccharide :** C'est une macromolécule composée d'un lipide à une extrémité et d'un polysaccharide à l'autre. On le connaît également sous le nom d'endotoxine. Il se retrouve sur la surface externe de la membrane des bactéries Gram négatives.
- Lymphocytes B et T :** Leucocyte mononucléé de petite taille, à cytoplasme réduit et jouant un rôle important dans l'immunité.
- Macrophages :** Cellule de grande taille intervenant dans le processus immunitaire en phagocytant les éléments tels que, notamment des cellules étrangères.

Neutrophiles :	Se dits des cellules (leucocytes polynucléaires du sang) ayant une affinité pour les colorants neutres.
Oligosaccharides :	Plusieurs groupes de monosaccharides unient par des liens glycosidique.
Peptidoglycane :	C'est la structure rigide de la membrane cellulaire des procaryote. Il permet d'équilibrer la pression entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.
Phagocyter :	Détruire par phagocytose. Absorber et neutraliser à la façon des phagocytes.
Phagocytose :	Processus par lequel certaines cellules (amibes, phagocytes) englobent des particules ou d'autres cellules par leurs pseudopodes, les absorbent puis les digèrent.
Pinocytose :	Inclusion, dans une cellule, d'une gouttelette de liquide du milieu ambiant, qui forme une vacuole.
Prostacycline :	Prostaglandine X, PGX ₁ , PGI ₂ substance proche des prostaglandines dérivée de l'acide arachidonique.
Prostaglandine :	Hormone présente dans de nombreux tissus et organes et dont les différentes sortes exercent des actions biochimiques diverses (Elles jouent en particulier un rôle dans la plupart des processus de reproduction). Acide lipidique ayant un squelette de 20 atomes de carbones.
Pyrogénicité :	Qui peut provoquer de la fièvre.
Sérotype :	Différence entre les bactéries selon leurs caractéristiques antigéniques.
Thromboxane :	Substance dérivée de l'acide arachidonique synthétisée dans les plaquettes et les polynucléaires..

BIBLIOGRAPHIE

1. Rietschel, E.T. et collaborateurs, Bacterial Endotoxins : Chemical Structure and Biologic Activity., Am. J. Emergency Medicine, vol 2, 1 : 60-69, 1982.
2. Sonesson, A.H.R. et collaborateurs, Bacterial Entotoxin Chemical Structure and Biological Activity. Dans : Endotoxin of the lungs, Edited par : Kenneth, L. Brigham. New-York, p.1-20, 1994.
3. Morrison, D.C. et Ryan, J.L., Bacterial endotoxic lipopolysaccharides. Vol1 : Molocular Biochemistry and cellular biology, CRC Press, Boca Raton
4. ACGIH, Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment, Cincinnati, 1989.
5. Highsmith, A.K. et Jarvis, W.R., Endotoxin Production as a Virulence Factor in Disease. Dans Detection of bacterial Endotoxins with the Limulus Ameobocyte Lysate Test. p.387-403, 1987.
6. Rylander, R. et Snella, M-C., Endotoxins and the Lung : Cellular Reactions and Risk for Diseases, Prog. Allergy, Vol : 33, p.332-344. 1987.
7. Neal, P.A., et collaborateurs, Report on Acute Illness among Rural Mattress Makers using Low Grade Stained Cotton. J. Amer. Med. Ass. 119, p : 1074-1082, 1942.
8. Pernis, B., et collaborateurs, The Role of Endotoxins in Occupational Diseases Caused by Inhaling Vegetable Dusts. Brit. J. Industr. Med., 18, 120-129, 1961.
9. Cavagna, G., et collaborateurs, Effects in Man and Rabbits of Inhalation of Cotton Dust or Extracts and purified Endotoxins., Brit. J. Industr. Med., 26, 314-321. 1969.
10. Rylander, R. et Lundholm, M., Bacterial Contamination of Cotton Dust and Effects on the lung. Br. J. Industr. Med., 35, 204-207, 1978.

11. Edwards, J.H., Organic Dust Diseases and Endotoxins., Rev. Epidem. et Santé Publ. 29, 199-207, 1981.
12. Preller, R et collaborateurs, Lung Fonction and Chronic Respiratory Symptoms of the Pig farmers : focus on Exposure to Endotoxins and Ammonia and use of Disinfectants., Occup. Environ. Med., 52, 654-660, 1995.
13. Milton, D.K., et collaborateurs Croos-sectional Follow-up of a Flu-Like Respiratory Illness among Fibergalss Manufacturing Employees : Endotoxin Exposure Associated with two Distinct sequelae., Am. J. Ind. Med., 28, 469-488, 1995.
14. Milton, D.K., et collaborateurs, Endotoxin Exposure Response in a Fiberglass Manufacturing Facility., Am. J. Ind. Med. 29, 3-13, 1996.
15. Snella, M-C. et Rylander, R., Endotoxin inhalation Induces Neutrophil Chemotaxis by Alveolar Macrophages, Agents and actions., 16, 521-526, 1985.
16. Rylander, R. et Snella, M-C., Acute Inhalation Toxicity of Cotton Plant Dust., Br. J. Ind. Med., 33, 175-180, 1976.
17. Helander, I., Acute Pulmonary Toxicity and Pyrogenicity of Inhaled Lipid A. FEMS Microbiol. Lett., 13, 283-287, 1982.
18. Collins, R.D.. et Wood, B.W. Studies on the Pathogenesis of Fever, J.Exp. Med., 110, 1105-1116, 1959.
19. Plitman, J.D., et Snapper, J.R., Effects of Endotoxin on Airway Function., dans Entotoxin of the lungs, Edited par : Kenneth, L. Brigham. New-York, p.133-152, 1994.
20. Rylander, R., Symptoms and Mechanims- Inflammation of the Lung., Am. J. Ind. Med., 25, 19-23, 1994.
21. Heederik, D., et collaborateurs, relationship of Airborne Endotoxin and Bacteria Levels in Pig Farms with the Lung Function and Respiratory Symptoms of Farmers., Int. Arch. Occup. Environ. Health, 62, 595-601, 1991.

22. Gordon, T. et collaborateurs, Comparaison of Sampling Media for Endotoxin-Contaminated Aerosols., *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 7, 472-476, 1992.
23. Kennedy, M.S., et collaborateurs, Cotton Dust and Endotoxin Exposure-Response Relationships in Cotton Textile Workers, *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 194-200, 1987.
24. Christiani, D.C., et collaborateurs Cotton Dust and Gram-Negative Bacterial Endotoxin Correlations in Two Cotton Textile Mills. *Am. J. Ind. Med.*, 23, 333-342, 1993.
25. Herbert, A., et collaborateurs, Reduction of Alveolar-Capillary Diffusion after Inhalation of Endotoxin in Normal Subjects., *Chest*, 102 : 1095-1098, 1992.
26. Rylander, R., The Role of Endotoxin for Reactions after Exposure to Cotton Dust., *Am.J.Ind. Med.* 12 : 687-697, 1987.
27. Pratt, D., Endotoxin and (1-3)- β -D-Glucan., *Am.J. Ind.Med.* 25 : 139-140, 1994.
28. Zejda, J.E., Respiratory Health Status in Swine Producers Relates to Endotoxin Exposure in the Presence of Low Dust Levels., *JOM*, 36 : 49-55, 1994.
29. Rylander, R., et collaborateurs, Bronchial Reactivity among Cotton Workers in Relation to Dust and Endotoxin Exposure., *Ann. occup. Hyg.*, 37 : 57-63, 1993.
30. Michel, O., et collaborateurs Relation between the Bronchial Obstructive Response to inhaled Lipopolysaccharide and Bronchial Responsiveness to Histamine., *Thorax*, 47 : 288-291, 1992.
31. Castellan, R.M., et collaborateurs Inhaled Endotoxin and Decreased Spirometric Values, An Exposure-Response Relation for Cotton Dust., *New England J. Med.*, 317 : 605-610, 1987.
32. Smid, T., et collaborateurs Dust- and Endotoxin-related respiratory Effects in the Animal Feed Industry., *Am. Rev. respir. Dis.*, 146 : 1474-1479, 1992.

33. Palchak, R.B., et collaborateurs A Threshold for Airborne Endotoxin Associated with Industrial-Scale Production of Proteins in Gram-Negative Bacteria., *Dev. Ind. Micro.*, 31 : 199-203, 1990.
34. Liesivuori, J., et collaborateurs Airborne Endotoxin Concentrations in Different Work Conditiond., *Am. J. Ind. Med.*, 25 : 123-124, 1994.
35. Carvalheiro, M.F., et collaborateurs, Symptoms and Exposure to Endotoxin among Brewery Employees., *Am. J. Ind. Med.*, 25 : 113-115, 1994.
36. Olenchock, S.A., Endotoxins in Various Work Environments in Agriculture., *Dev. Ind. Micro.*, 31 : 193-197, 1990.
37. Rylander, R., et collaborateurs, Bird Dropping Contain Endotoxin and (1-3)-Beta-D-Glucan., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 103 : 102-104, 1994.
38. Wilhelmsson, B., Nasal Hypersensitivity in Wood Furniture Workers., *Allergy*, 39 : 586-595, 1984.
39. Dutkiewick, J., et collaborateurs, Airborne Microorganisms and Endotoxin in Animal Houses., *Grana*, 33 : 85-90, 1994.
40. Schimberg, R.W., et collaborateurs, Airborne Particulate Matter, Fungi, Bacteria and Endotoxin in Fur Farming., *Staub-Reinhaltung der luft*, 52 : 457-460, 1992.
41. Lundholm, M., Exposure to Endotoxin in the Farm Environment., *Am. J. Ind. Med.*, 10 : 314-315, 1986.
42. Rylander, R. et collaborateurs, Airborne Endotoxins and Humidifier Disease., *Clinical Allergy*, 14 : 109-112, 1984.
43. Smid, T., et collaborateurs, Exposure to Dust, Endotoxins, and Fungi in the Animal Feed Industry., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 53 : 362-368, 1992.

44. Attwood, P., et collaborateurs, Assessment of Dust and Endotoxin Levels in the Working Environment of Dutch Pig Farmers : a Preliminary Study., *Am. Occup. Hyg.*, 30 : 201-208, 1986.
45. Clark, S., et collaborateurs, Airborne Bacteris, Endotoxin and Fungi in Dust in Poultry and Swine Confinement Building., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 44 : 537-541, 1983.
46. Pickrell, J.A., et collaborateurs, Characterization of particles, Ammonia and Endotoxin in Swine Confinement Operations., *Vet. Human toxicol.*, 35 : 421-428, 1993.
47. Lenhart, S.W., et collaborateurs, Sources of Respiratory Insult in the Poultry Processing Industry., *Am. J. Ind. Med.*, 6 : 89-96, 1984.
48. Lenhart, S.W., et collaborateurs Organic Dust, Endotoxin, and Ammonia Exposures in the North Carolina Poultry Processing industry., *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, 5 : 661-661, 1990
49. Olenchok, S.A., et collaborateurs, Occupational Exposure to Airborne Endotoxins during Poultry Processing., *J. Toxicol. Environ. Health*, 9 : 339-349, 1982.
50. Olenchok, S.A., et collaborateurs, Airborne Endotoxins in a Rice Production Commune in the People's Republic of China., *J. Toxicol. Environ. Health*, 13 : 545-551, 1984.
51. Christiani, D.C., et collaborateurs, Airborne Endotoxin Concentrations in Various Work Areas within a Cotton Mill in Central America., *Environ. Research*, 60 : 187-192, 1993.
52. Rylander, R., et collaborateurs, Airborne Endotoxin in Industries Processing Vegetable Fibers., *Am. Ind. Assoc. J.*, 43 : 811-812, 1982.
53. Rylander, R., et collaborateurs, Endotoxin Content in Cottonseed Oil Mill Dust., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 44 : 330-332, 1983.
54. Laitinen, S., et collaborateurs Relationship between Bacterail Counts and Endotoxin Concentrations in the Air of Wastewater Treatment Plants., *App. Environ. Micro.*, 58 : 3774-3776, 1992.

55. Schira, J.C., et collaborateurs, Mise en évidence de bactéries Gram négatives et d'endotoxines dans l'air ambiant d'une station d'épuration des eaux usées : influence des aérosols contaminés sur l'état de santé du personnel., *Scweiz. Med. Wschr.*, 117 : 354-358, 1987.
56. Melbostad, E., et collaborateurs, Exposure to Bacterial Aerosols and Work-Related Symptoms in Sewage Workers., *Am. J. ind. Med.*, 25 : 59-63, 1994.
57. Sigsgaard, T., et collaborateurs, Respiratory Impairment among Workers in a Garbage-Handling Plant., *Am. J. Ind. Med.*, 17 : 92-93, 1990.
58. Dutkiewicz, J., Bacteria, Fungi, and Endotoxin as Potential Agents of Occupational Hazard in a Potato Processing Plant., *Am. J. Ind. Med.*, 25 : 43-46, 1994.
59. Nielsen, B.H., et collaborateurs, Endotoxin and Microorganisms in Percolate Derived from Compostable Household Waste., *Am. J. Ind. Med.*, 25 : 121-122, 1994.
60. Hagling, P. et Rylander, R. Exposure to Cotton Dust in an Experimental Cardroom., *Br. J. Ind. Med.*, 41 : 340-345, 1984.
61. Rylander, R., Hagling, P. et Lundholm, M., Endotoxin in Cotton Dust and Respiratory Function Decrement among Cotton Workers in an Experimental Cardroom, *Am., Rev., Respir., Dis.*, 131 : 209-213, 1985.
62. Jacobs, R.R. Airborne Endotoxins : An Association with Occupational Lung Disease., *Appl. Ind. Hyg.*, 4 : 50-56, 1989.
63. Palchak, R.B., Cohen, R., Ainslie, M., et Hoerner, C.L., Airborne Endotoxin Associated with Industrial-Scale Production of Protein Products in Gram-negative Bacteria., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 49 : 420-421, 1988.
64. Gordon, T., Acute Respiratory Effects of Endotoxin-Contaminated Machined Fluid Aerosols in Guines Pigs, *Fundamental and Applied Toxicology*, 19 : 117-123, 1992.

65. Olenchock, S.A., "Endotoxins" Biological Contaminants in Indoor Environment, ASTM STP 1071, Philip, R. Morey, James C. Feeley, Sr., James A. Otten, editor, American Society for testing and Materials, Philadelphia, 1990.
66. Sonesson, A., Larsson, L., Schütz, A., Hagmar, L., et Hallberg, T., Comparaison of the *Limulus* Amebocytes Lysate Test and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Measuring Lipopolysaccharides (Endotoxins) in Airborne Dust from Poultry- Processing Industries., App. Environ. Microbiol., 56 : 1271-1278, 1990.
67. Donham, K.J., Reynolds, S.J., Whitten, P., Merchant, J.A., Burmeister, L., et Pendergast, W.J., Respiratory Dysfunction in Swine Production Facility Workers : Dose-response Relationships of Environmental Exposure and Pulmonary Function., Am. J. Ind. Med., 27 : 405-418. 1995.
68. Hollander, A., Heederik, D., Versloot, P., et Douwes, J., Inhibition and Enhancement in the Analysis of Airborne Endotoxin Levels in various Occupational Environment., Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 54 : 647-653, 1993.
69. Milton, D.K., Gere, R.J., Feldman, a., et Greaves, I.A., Endotoxin Measurement : Aerosol Sampling and Application of a New Limulus Method., Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 51 : 331-337, 1990.
70. Reynolds, S.J., et Milton, D.K., Comparaison of Methods for Analysis of Airborne Endotoxin., Appl. Occup. Environ. Hyg., 8 : 761-767, 1993.
71. Walters, M., Milton, D., Larsson, L., et Ford, T., Airborne Environmental Endotoxin : a Cross-Validation of Sampling and Analysis Techniques., App. Environ. Microbiol., 60 : 996-1005, 1994.
72. Milton, D.K., Feldman, H.A., Neubergh, D.S., Bruckner, R.J., et Greaves, I.A., Environmental Endotoxin Measurement : The Kinetic Limulus Assay with Resistant-Parallel-Line Estimation., Environ. Research., 57 : 212-230, 1992.
73. Rylander, R., et Hagling, P., Airborne Endotoxins and Humidifier Disease., Clinical Allergy, 14 : 109-112. 1984.

74. Olenchok, S.A., Lewis, D.M., et Mull, J.C., Effects of Different Extraction Protocols on Endotoxin Analysis of Airborne Grain Dusts., *Scand. J. Work. Environ. Health*, 15 : 430-435, 1989.
75. Sharma, S.K., Endotoxin Detection and Elimination in Biotechnology, *Biotechnology and applied biochemistry*, 8 : 5-22, 1986.
76. Booth, C., The Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Assay- A Replacement for the Rabbit Pyrogen Test, *IABS Symposium on Reduction of Animal Usage in the Development and Control of Biological Products, Develop. Biol. Standard.*, 64 : 271-275, 1986.
77. Kirschner, D., Que Hee, S.S., et Clark, C.S., Method for Detecting the 3-Hydroxymyristic Acid Component of the Endotoxin of Gram-negative Bacteria in Compost Samples, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 46 : 741-746, 1985.
78. Maitra, S.K., Nachum, R., Pearson, F.C., Establishment of Beta-Hydroxy Fatty Acids as Chemical Marker Molecules for Bacterial Endotoxin by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 : 510-514, 1986.
79. Seid, R.C.Jr., Bone, W.M., et Phillips, L.R., Identification of Ester-Linked Fatty Acids of Bacterial Endotoxins by Negative Ion Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 155 : 168-176, 1986.
80. Morris, N.M et Catalano, E.A., A Chemical Method for Determining Endotoxins in Cotton Dust and Lint Without Extraction, *Textile Research Journal*, July 1990.
81. Mielniczuk, Z., Mielniczuk, E., et Larsson, L., Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methods for Analysis of 2 and 3- Hydroxylated Fatty Acids : Application for Endotoxin Measurement, *J. Microbiol. Methods*, 17 : 91-102, 1993.
82. Sonesson, A., Larsson, L., Westerdahl, G. et Odham, G., Determination of Endotoxins by Gas Chromatography : Evaluation of Electron-Capture and Negative-Ion Chemical Ionisation Mass Spectrometry Detection of Halogenated derivatives of β -Hydroxymyristic Acid, *J. Chromatography*, 417 : 11-25, 1987.

83. Morris, N.M., et Brannan, A.F., Gas Chromatographic Determination of the Fatty Acid Composition of Endotoxins From Different Bacteria, *J. Chromatography*, 374 : 27-35, 1986.
84. Tanamoto, K., Development of a New Quantitative Method for Detection of Endotoxin by Fluorescence labeling of 3- Hydroxy Fatty Acid, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 256 : 203-213, 1990.
85. Levin, J., The History of the Development of the Limulus Ameobocyte Lysate Test, dans : *Progress in Clinical and Biological Research, Bacterial Endotoxins : Structure, Biomedical Significance, and Detection With the Limulus Amebocyte Lysate Test*, Editor ten Cate, J.W., Büller, H.R., Sturk, A., et Levin, J., New-York, Volume 189, p 3-28, 1984.
86. Howell, W.H. Observation upon the Chemical Composition and Coagulation of the Blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. *Johns Hopkins Univ., Circ.* 5 : 4-5, 1885. Tiré de Levin, J. 1984.
87. Tanaka, S., et Iwanaga, S., Limulus Test for Detecting Bacterial Endotoxins, *Methods in Enzymology*, 23 : 358-364, 1993.
88. Iwanaga, S., The Limulus Clotting Reaction, *Current opinion in Immunology*, 5 : 74-82, 1993.
89. Adner, N., Flink, O., Nystrand, R., Pihl, B., et Vegis, P., Collaborative Study of a Control Standard Endotoxin Using the Limulus Amebocyte(Gel-Clot) Test, *J. Parenteral Science & Technology*, 45 : 88-93, 1991.
90. Hofmans, M., Devleeschouwer, M.J., Dony, J., Specificité du test limulus pour la detection des endotoxines, *J. Pharm. Belg.*, 40 : 277-280. 1985.
91. Hussaini, S.N., et Hassanali, H.T., Limulus amoebocyte lysate assay of Endotoxin : a Method for Visual Detection of the Positive Gel Reaction, *J. Med. Microbiol.*, 24 : 89-90. 1987.
92. Mottar, J., De Nlock, J., Merchiers, M., Vantomme, K., et Moermans, R., Routine Limulus amoebocyte lysate (LAL0 Test for Endotoxin Determination in Milk using Toxinometer ET-201, *J. Dairy Research*, 60 : 223-228, 1993.

93. Novitsky, T.J., Remillard, J.F. et Loy, N., Design Criteria and Evaluation of the LAL-4000 for Kinetic Turbidimetric LAL Assay, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Alan R. Liss Inc., New-York, p : 189-196, 1987.
94. Albaugh B.R., Chandler, C.B., Automated Methodology for the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay using the Multiskan Microplate Reader., Progress in Clinical and Biological Research, Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Editors Watson, S.w., Levin, J., et Novitsky, T.J., Allan R. Liss Inc, New-york, p : 183-194, 1982.
95. Sloyer, J.L. Jr., Karr, L.J., et Stoneycypher, T.E.jr., Quantitative Techniques for the LAL Test, Progress in Clinical and Biological Research, Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Editors Watson, S.w., Levin, J., et Novitsky, T.J., Allan R. Liss Inc, New-york, p : 207-215, 1982.
96. Bussey, D.M. et Tsuji K., Optimization of a Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL0 Assay for Automated Endotoxin Detection, J. Parenteral Science and Technology, 38 : 228-233, 1984.
97. Piotrowicz, B.I., et McCartney, Chromogenic Limulus Amoebocyte Lysate Assay for Endotoxin : Comparaison of Three Commercial Products, Medical Laboratory Sciences, 44 : 89-91, 1986.
98. Lindsay, G.K., Roslandsky, P.F. et Novitsky, T.J., Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin, J. Clin. Microbiol., 27 : 947-951, 1989.
99. Friberger, P. Knös, M. et Mellstam, L., A Quantitative Endotoxin Assay Utilizing LAL and a Chromogenic Substrate, Progress in Clinical and Biological Research, Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Editors Watson, S.w., Levin, J., et Novitsky, T.J., Allan R. Liss Inc, New-york, p : 195-206, 1982.
100. Schadewald, L.K. Martin, D.G. et TSUJI, K., Automation and Computerization of Chromogenic LAL Assay Method for Bacterial Endotoxin Using 96-Well Microtiter Plate, J. parenteral Science & Technology, 44 : 50-53, 1989.

101. Dunér K.I., A New Kinetic Single-Stage Limulus Amoebocyte Lysate Method for the Detection of Endotoxin in Water and Plasma, *J.Biochemical and Biophysical Methods*, 26 : 131-142, 1993.
102. Twohy, C., Duran, A., et Munson, T., Evaluation of Commercial LAL Reagents from Different Manufacturers, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Alan R. Liss Inc., New-York, p : 171-181, 1987.
103. Friberger, P., Sörskog, L., Nilsson, K., et Knös, M., The Use of a Quantitative Assay in Endotoxin Testing, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Alan R. Liss Inc., New-York, p : 149-169, 1987
104. Remillard, J.F., Case Gould, M., Roslansky, P.F. et Novitsky, T.J., Quantitation of Endotoxin in Products using the LAL Kinetic Turbidimetric Assay, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test, Alan R. Liss Inc., New-York, p : 197-210, 1987
105. Nawata, M., Minobe, S., Hase, M., Watanabe, T., Sato, T., et Tosa, T., Specific Assay for Endotoxin using Immobilized Histidine, Limulus amoebocyte Lysate and a Chromogenic Substrate, *J.Chromatography*, 597 : 415-424, 1992.
106. Zhang, G.H., Baek, L., et Koch, C., New Microassay for Quantitation of Endotoxin using Limulus Amebocyte Lysate Combined with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *J. Clin. Microbiol.*, 26 : 1464-1470, 1988.
107. Zhang, G.H., Baek, L., Nielsen, P.E., Buchardt, O., Koch, C., Sensitive Quantitation of Endotoxin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Monoclonal Antibody against Limulus Peptide C, *J. Clin. Microbiol.*, 32 : 416-422, 1994.
108. Obayashi, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ohki, M., Takahashi, S., Arai, M., Masuda, M., et Kawai, T., A New Chromogenic Endotoxin-Specific Assay using Recombined Limulus Coagulation Enzymes and its Clinical Applications, *Clinica Chimica Acta*, 149 : 55-65, 1985.
109. Roth, R.I., Levin, J., et Behr, S., A Modified Limulus Amebocyte Lysate Test with Increased Sensitivity for Detection of Bacterial Endotoxin, *J. Lab. Clin. Med.*, 114 : 306-311, 1989.