



Audrey Bernèche-D'Amours

M. Sc., Mcb.A., RMCCM, biochimiste
Professionnelle scientifique, Direction des laboratoires

Développement d'une méthode de dosage non spécifique des protéases de type subtilisine

AQHSST
23 mai 2024



Les protéases de type subtilisine

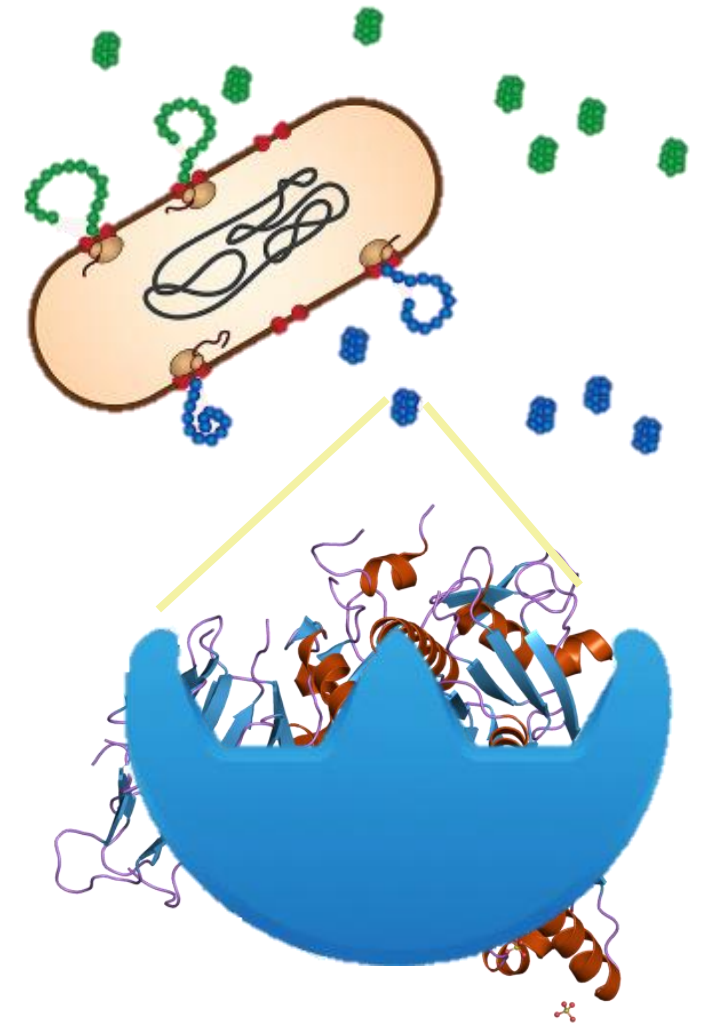
- **Enzymes** produites par des bactéries du genre *Bacillus* sp.



Bacillus subtilis: bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet

- **Plusieurs synonymes**: alcalase, bacillopeptidase A/B, maxatase, subtilopeptidase A/B/C, subtilisine de type Carlsberg

Numéro CAS: 1395-21-7; 9014-01-1



Wikiwand.com

<https://lizahvandraart.com/work/microbeprofile-bacillus>

Les protéases de type subtilisine

- **Cliver les protéines** en s'attaquant au lien peptidique → réaction d'hydrolyse
- **Alcaline**: conserve son activité à pH élevé

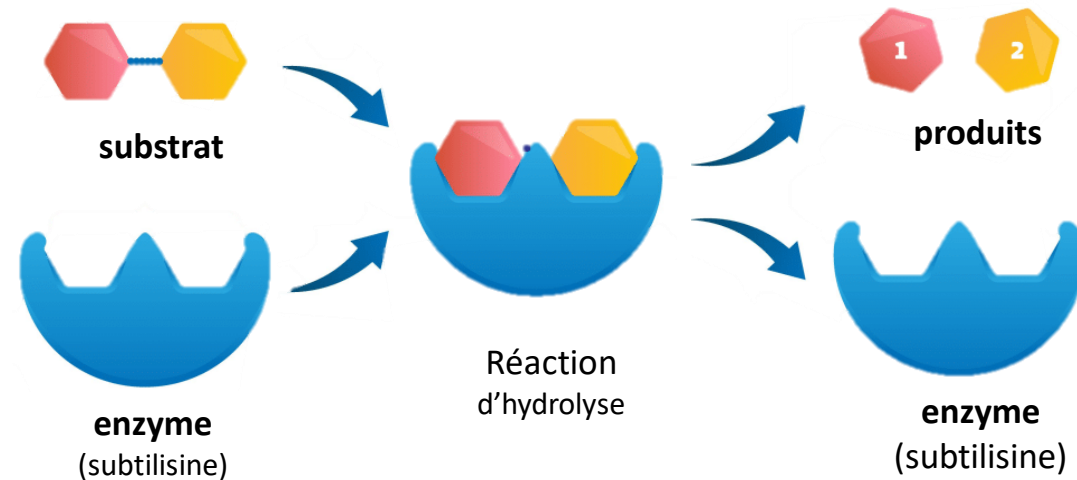
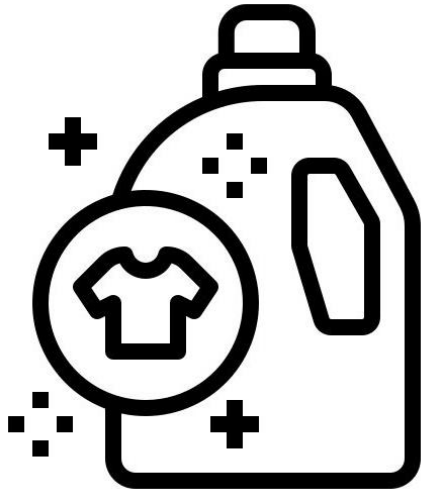


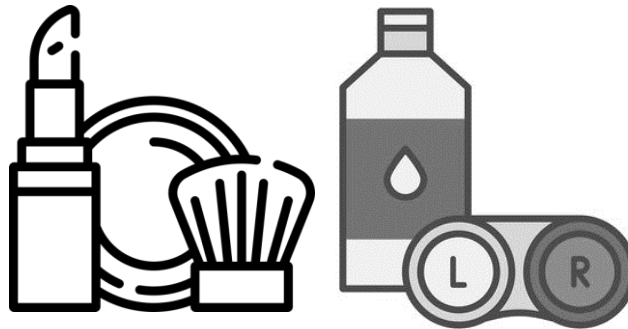
Figure tirée de shalom-education.com

Les protéases de type subtilisine

- Utilisées dans plusieurs produits



Détergents, détachants



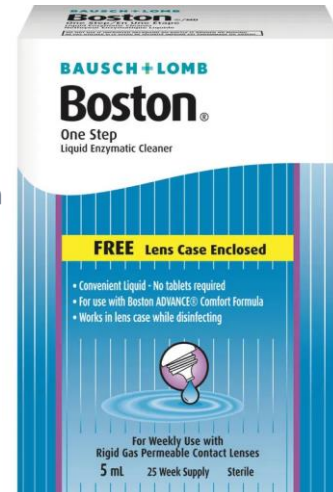
Cosmétiques;
nettoyant à verres de contact



Sodium Glutamate, Talc, Cellulose, Maltodextrin
Subtilisin, Lipase



ALCOHOL, CITRIC ACID, SODIUM HYDROXIDE, SODIUM
LIC COPOLYMER, POLYACRYLATE POLYMER,
ISOTHIAZOLINONE, METHYLISOTHIAZOLINONE, SUBTILISIN,
ODECANOL. SCJ FORMULA 35*35249



DESCRIPTION: A sterile, aqueous solution containing proteolytic enzyme (subtilisin) as the active ingredient, and glycerol. Preservative-free.

Les protéases de type subtilisine en SST

- Les milieux de travail concernés
 - **Production:** enzyme, détergents/cosmétiques, etc.
 - **Procédés:** Industrie du cuir, transformation alimentaire
 - **Milieu hospitalier:** agent de pré-stérilisation (unités de retraitement des dispositifs médicaux - URDM)



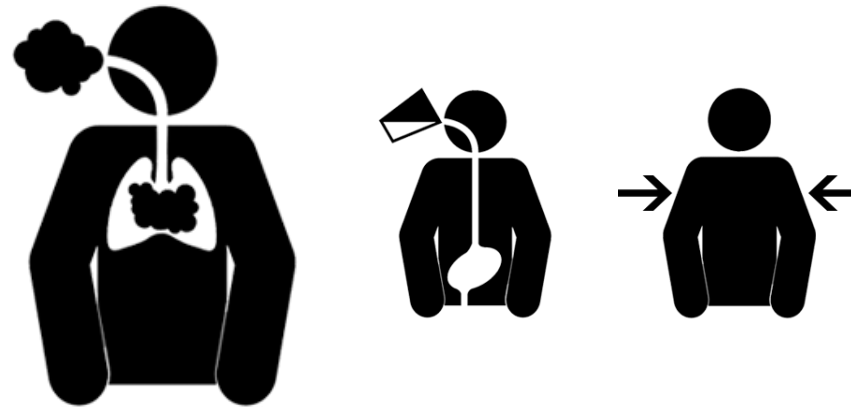
<https://avenirensante.gouv.qc.ca/>



Marchand, G. (2016)

Les protéases de type subtilisine en SST

- Voies d'exposition et risques à la santé



<https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/exposureassessment/>

- **Irritation** des yeux, de la peau et des voies respiratoires
- Sensibilisation respiratoire (**asthme** aux enzymes)
- Transpiration, maux de tête, douleurs thoraciques, symptômes grippaux, toux, essoufflement, respiration sifflante

Les protéases de type subtilisine en SST

- VEA

60 ng/m³ d'air
(valeur plafond)

Substance	[#CAS]	VEMP		VECD/Plafond		Notations et remarques
		ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³	
Subtilisines (enzymes protéolytiques exprimées en enzyme cristallin pur à 100%)	[1395-21-7]					
	[9014-01-1]				P0,00006	S,RP

S : L'exposition répétée à cette substance peut provoquer une sensibilisation.

RP : Substance dont la recirculation est prohibée (article 108).

Connaissances sur l'analyse des protéases de type subtilisine

- Rapport de recherche
 - Rapport **R-927** - IRSST (2016)
 - Rapport **RR972** - HSE (2013)

- Méthode d'analyse

non disponible

Subtilisines (enzymes protéolytiques en enzyme cristallin pur à 100%)

L'IRSST recommande la méthode suivante :

➤ Méthode : -

Protocole d'échantillonnage

Dispositif :

Paramètres :

Débit : -

Volume VEMP : -

Volume VECD : -

Remarques : Cette substance n'est pas analysée par nos laboratoires. Il est possible qu'elle le soit par un autre laboratoire. Veuillez contacter l'IRSST avant d'échantillonner.

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-927

Méthode d'analyse des protéases de type subtilisine et évaluation des concentrations de l'air ambiant de cinq centres hospitaliers

Geneviève Marchand
Yves Cloutier
Annie Castonguay
Carole Pépin

Rym Barafane
Jacques Lavoie
Nicolas Doucet
François Lépine

irst

HSE Health and Safety Executive

A survey of exposure to enzymes in cleaning solutions used to clean endoscopes

Prepared by the Health and Safety Laboratory for the Health and Safety Executive 2013

RR972
Research Report

Développement de la méthode d'analyse des protéases de type subtilisine

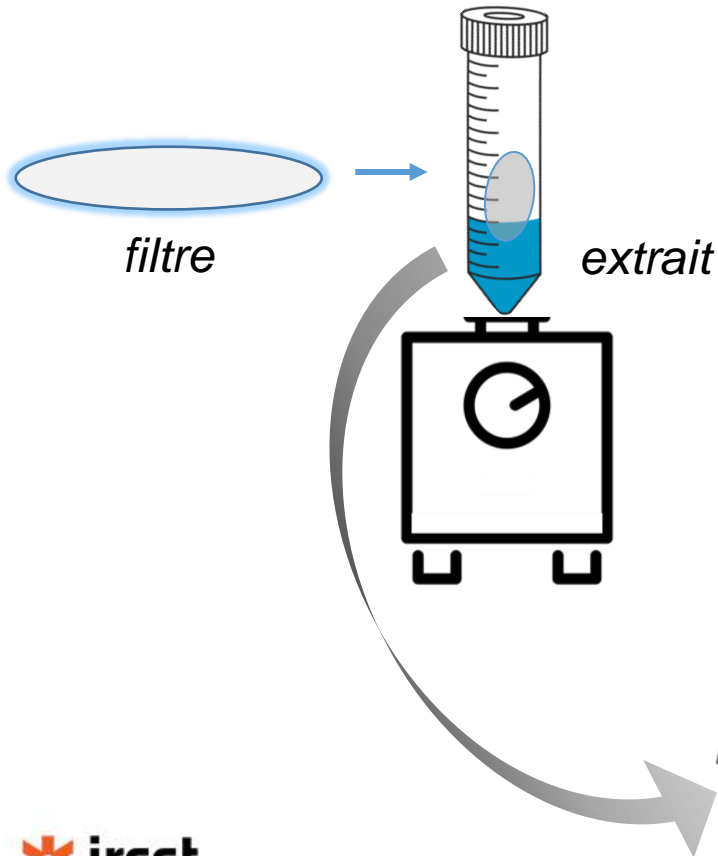
- Objectifs - validation analytique
 - Rapport R-927- IRSST
 - Rencontrer les critères internes de validation méthodologique
 - ① Récupération: $\geq 75\%$ acceptable, **$> 90\%$ préférable**
 - ② Précision (réplicabilité et répétabilité): $\leq 10\%$ (erreur)
 - ③ Exactitude: $\pm 25\%$ de la valeur attendue



Développement de la méthode d'analyse - Principe analytique

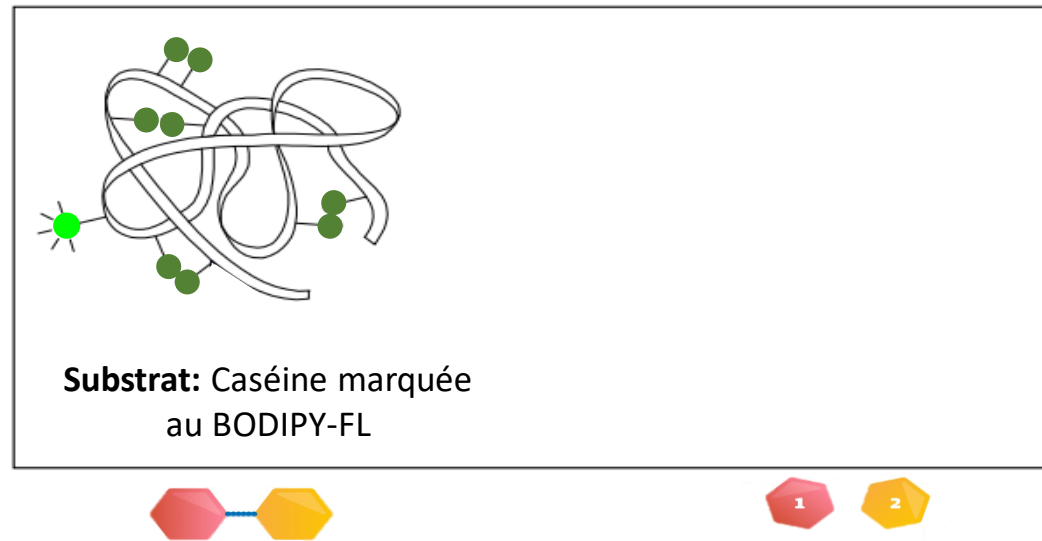
- Dosage enzymatique par spectrofluorimétrie

Extraction



Dosage

Réaction d'hydrolyse à 37°C pendant 1h30



Spectrofluorimètre
(excitation/émission 485nm/528nm)

Développement de la méthode d'analyse - Principe analytique

- Dosage enzymatique par spectrofluorimétrie

Inconvénients

- Non spécifique
- Plusieurs interférences
potentielles

Avantages

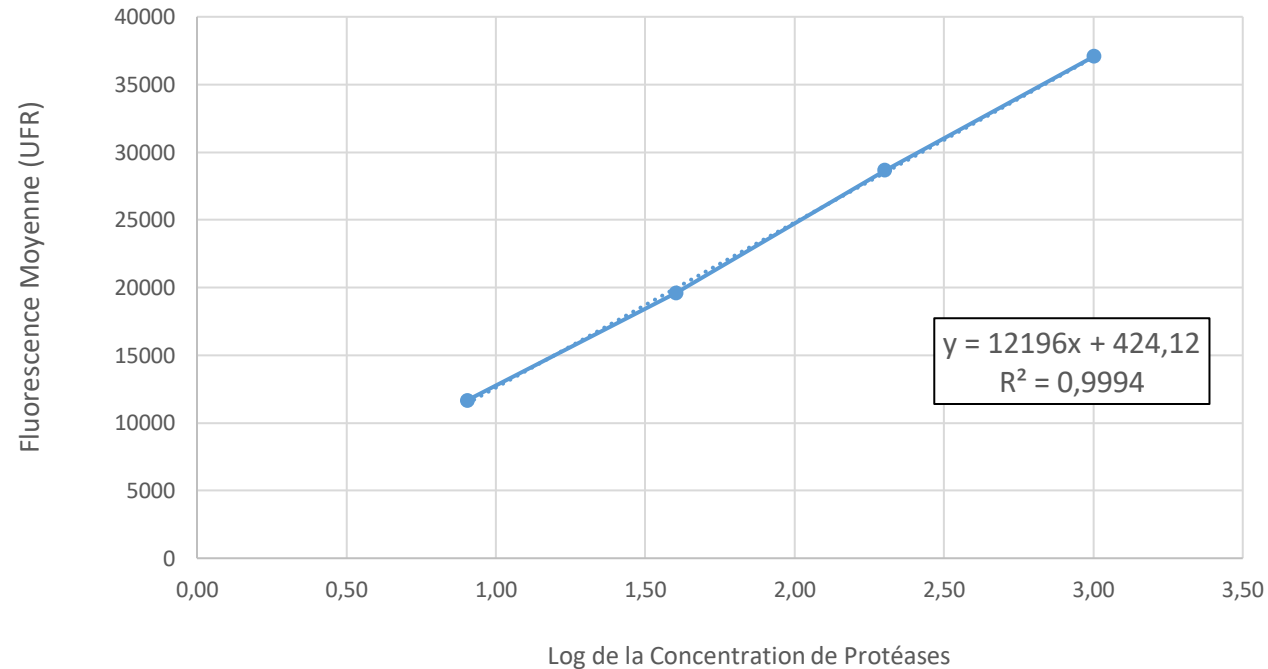
- Simple, rapide, peu coûteuse
- Spectrofluorimètre
- Données: R-927 IRSST

Enjeux

- Sensibilité?
- Reproductibilité?

Développement de la méthode d'analyse - Validation

- Courbe standard et limite de détection estimée



Source: Protéase de *Bacillus licheniformis* (Sigma P5380) (CAS : 9014-01-1)

STD	Concentration (ng/mL)	Log Concentration
1	1000	3,00
2	200	2,30
3	40	1,60
4	8	0,90

**LD estimée - extraits
10 ng/mL**

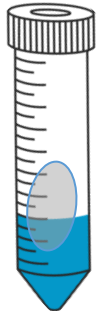
Critères d'acceptabilité:

- Négatif: valeur d'UFR, 2-3X plus bas que celle de la conc. la plus faible sur la courbe STD (8 ng/mL)
- Coefficient de détermination: $R^2 \geq 0,990$

Limite de détection estimée et dispositif d'échantillonnage

- Modification de la méthode d'échantillonnage pour accommoder la LD analytique

LD estimée- extraits
10 ng/mL

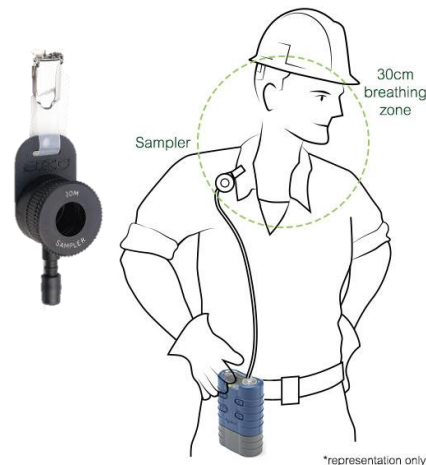


R-927 IOM

- Filtres de FV
- 10 L/min, 15min
- 3 mL d'extraction

LD estimée: **200 ng/m³ d'air**

>300% de
la VEA



SASS 3100

- Filtres « bioaerosols » (Microfibre PP electret)
- 300 L/min, 30 min
- 10 mL d'extraction

LD estimée: **11 ng/m³ d'air**

18% de
la VEA



Filtre
« bioaerosols »



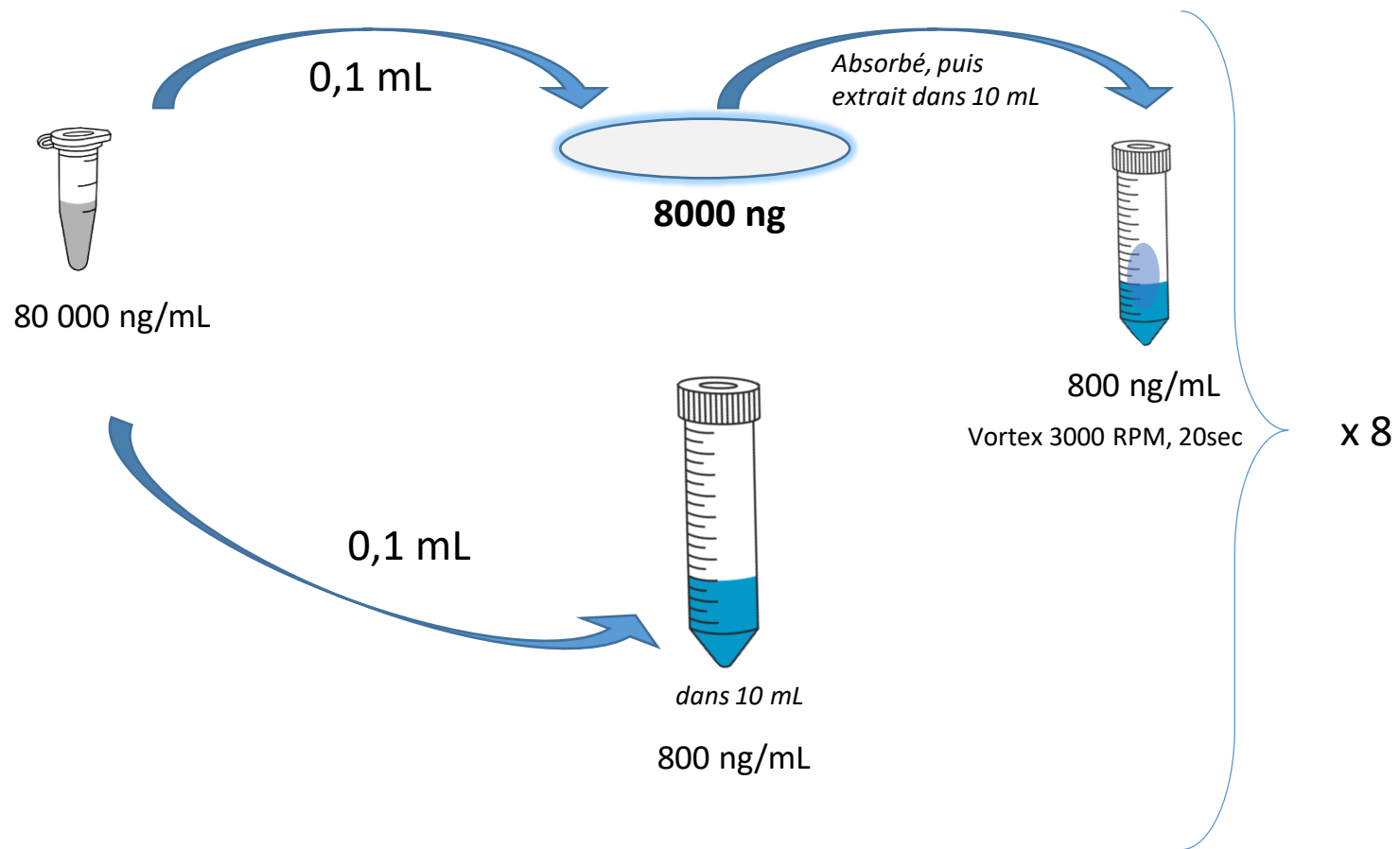
SASS 3100

Validation - Efficacité d'extraction des filtres (récupération) ①

1



- Exemple 800 ng/mL



Concentrations testées

Conc. (ng/mL)
800*
100
20
8*

* Les deux extrêmes (ou près) du domaine de linéarité de la courbe STD

Développement de la méthode d'analyse - Validation analytique

• Récupération, précision, incertitude et exactitude

① Efficacité d'extraction des filtres (récupération): **90,6%**

② Précision (réplicabilité-même analyste): **7,1%**

(répétabilité- différents analystes): **14,0%**

③ Exactitude (justesse): **95,9%**

- Comparaison avec deuxième source: Neogen Megazyme
 - Protéase subtilisine A de *Bacillus licheniformis*
CAS : 9014-01-1
 - 15 valeurs



- ① • Récupération: $\geq 75\%$ acceptable, $> 90\%$ préférable
- ② • Précision (réplicabilité et répétabilité): $\leq 10\%$
- ③ • Exactitude: $\pm 25\%$ de la valeur attendue



Incertainitude (CVa) : 10,3%

- **Domaine de linéarité:**
8 à 1000 ng/mL
- **LD:** 2 ng/mL
- **LQ:** 7 ng/mL
- **VMR:** 8 ng/mL

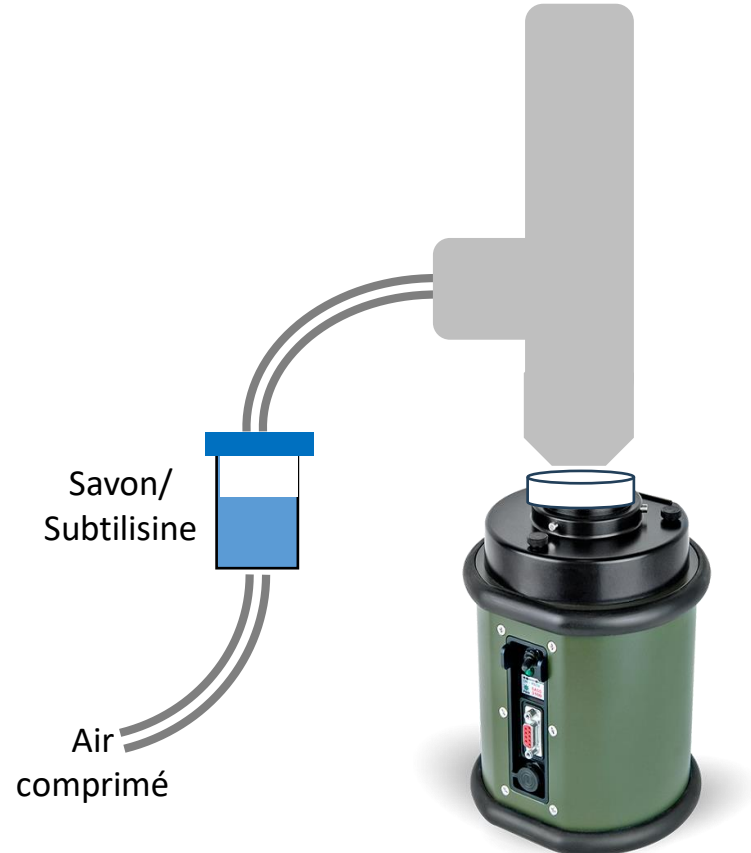
VMR : 8.9 ng/m³ d'air

**15% de
la VEA**

Développement de la méthode d'analyse - Validation de l'échantillonnage

- Résultats préliminaires

1) En laboratoire - *Essais de génération*



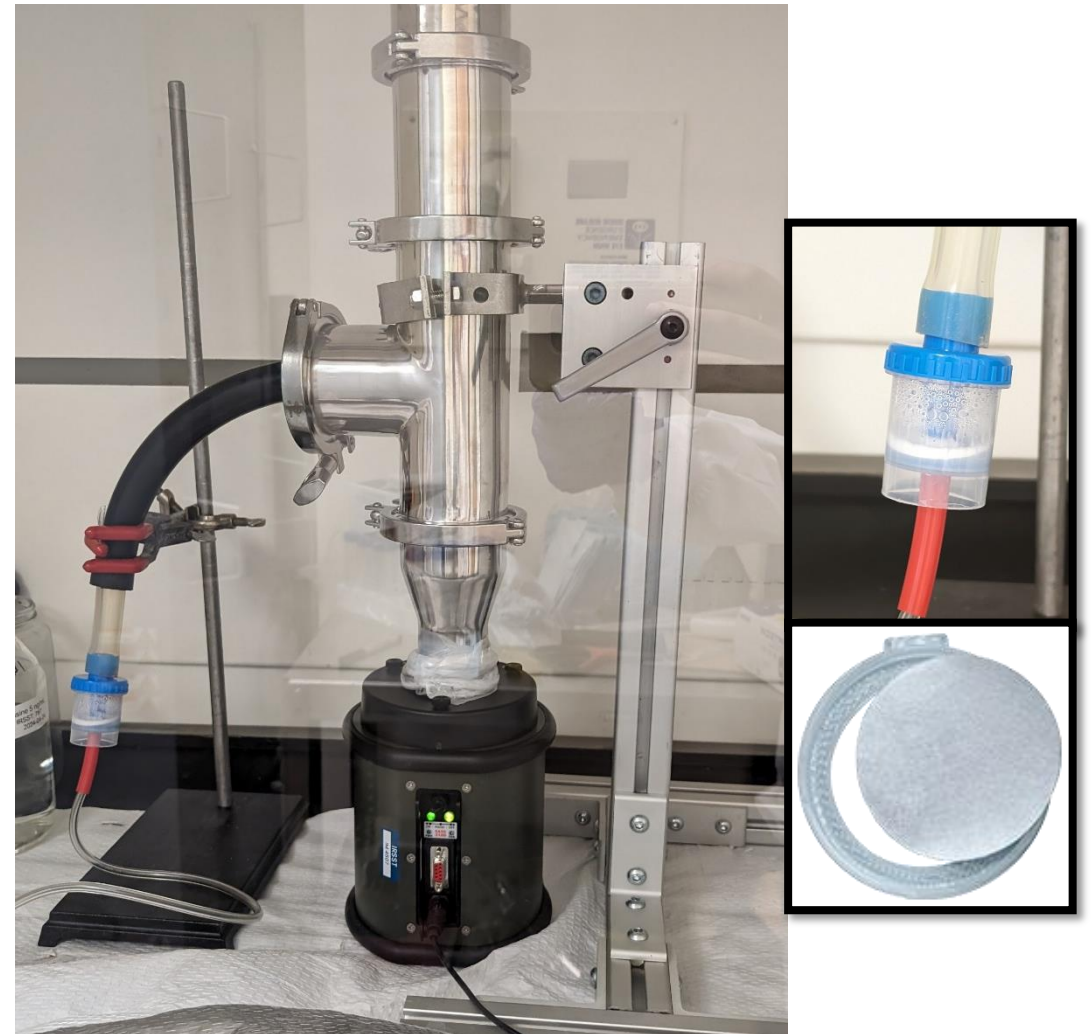
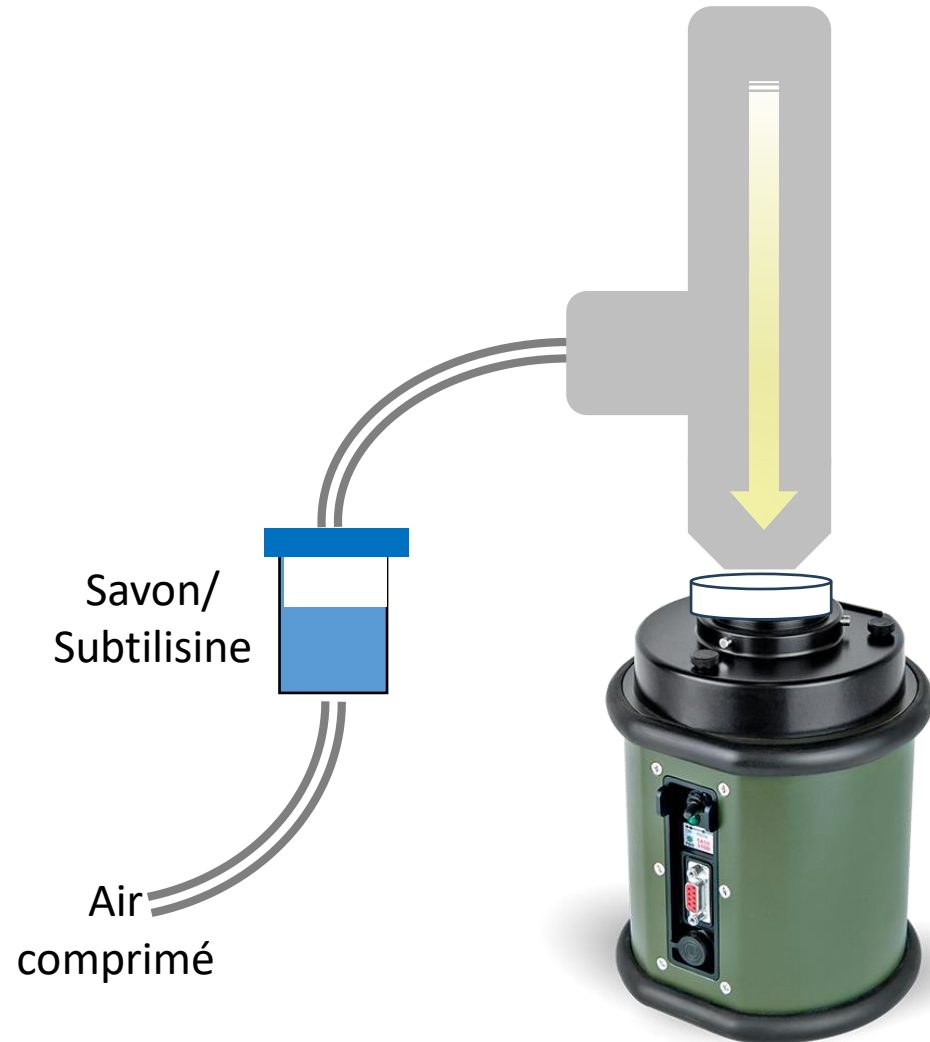
2) En milieu de travail - *URDM*



<https://avenirensante.gouv.qc.ca/>

Développement de la méthode d'analyse - Validation de l'échantillonnage

1) Essais de génération en laboratoire



Développement de la méthode d'analyse - Validation de l'échantillonnage

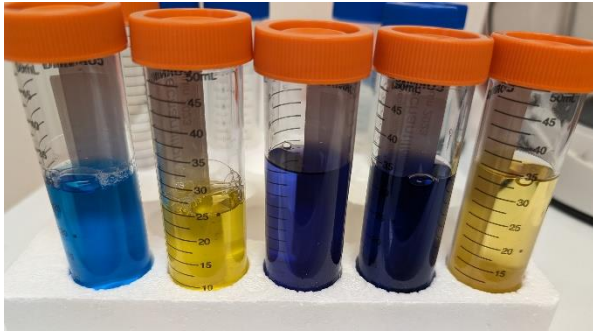
1) Essais de génération en laboratoire - Récupération

Savon/Solution Concentration	Quantité générée estimée (ng)	Quantité obtenue par filtre (ng)	Récupération (%)
Solution subtilisine 20 000 ng/mL	44 000	14 000	32
Savon A - ~ 650 ng/mL	1 900	440	23
	1 300	230	18
Savon B ~ 30000 ng/mL	69 000	16 000	23
	72 000	21 000	29

- Récupération entre **18 et 32%**
- Pertes évaluées:
 - Parois internes du montage: négligeable à ~ 10%
 - Air expulsé du SASS 3100: négligeable (<1%)

Développement de la méthode d'analyse - Validation de l'échantillonnage

2) En milieu de travail (URDM)



- Produits utilisés:

# échant.	Résultat échantillon dilué (ng/mL)	Échantillon concentré (ng/mL)	FDS	Conc. attendue (ng/mL)	
				min	max
1	33000	8,2E+06	0,1-1%	1E+06	1E+07
2	21000	2,6E+06	0,1-1%	1E+06	1E+07
3	1000	6,3E+04	<i>below report. limit</i>	NA	NA
4	930	1,2E+05	<i>below report. limit</i>	NA	NA
5	2600	6,5E+05	<i>below report. limit</i>	NA	NA

Développement de la méthode d'analyse - Validation de l'échantillonnage

2) En milieu de travail (URDM)



- Air ambiant:

Échantillon	Concentration extrait (ng/mL)	Concentration air (ng/m ³)	Commentaire
Filtre 1	15	15	Prélèvement pendant broissage
Filtre 2	7	7	Prélèvement pendant broissage; LQ
Contrôle négatif	<6	<VMR	

Conclusion - Résumé, limitations et prochaines actions

- Validation analytique complétée



- Critères de validation satisfaits

- LD et LQ (et VMR) obtenues permettent de quantifier la subtilisine dans l'air (avec SASS 3100) (domaine d'application)

- *Méthode peu spécifique (importance de consulter FDS)*

- *Prochaines actions: travaux de caractérisation d'interférants*

- Essais préliminaires - Dosage de la subtilisine dans l'air

- URDM: résultats encourageants; subtilisine détectée, sous la VEA → *Davantages de mesures*

- Génération: récupération maximale de 30% → *Amélioration du montage/essais*

→ *Publication de la méthode à venir*

Remerciements et questions

- **Tam Nguyen**, Technicienne de laboratoire, équipe des Risques bio, Direction des Laboratoires, IRSST
- **Nancy Lacombe**, Technicienne de laboratoire, Direction de la Recherche, IRSST
- **Sébastien Gagné**, Professionnel scientifique, Direction des Laboratoires, IRSST
- **Marc Veillette**, Associé de recherche, Chaire de recherche du Canada sur les bioaérosols, Ulaval
- **Caroline Duchaine**, Professeure titulaire, Chaire de recherche du Canada sur les bioaérosols, Ulaval
- **Delphine Lanoie**, Professionnelle scientifique, équipe des Risques bio, Direction des Laboratoires, IRSST



Références

1. ACGIH TLV Subtilisins. <https://www.acgih.org/subtilisins>
2. EnzChek™ Protease Assay Kit. 2004. Manual instruction.
3. Evans, G. *et al.* (2013). A survey of exposure to enzymes in cleaning solutions used to clean endoscopes. Rapport RR972. HSE.
4. Marchand, G. *et al.* (2016). Méthode d'analyse des protéases de type subtilisine et évaluation des concentrations de l'air ambiant de cinq centres hospitaliers. Rapport R-927. IRSST.
5. NIOSH Pocket Guide to Chemical. Subtilisins. <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0572.html>
6. OSHA, Occupational chemical database. Subtilisins. <https://www.osha.gov/chemicaldata/257>
7. Répertoire toxicologique, CNESST. Fiche complète pour Subtilisines [1395-21-7; 9014-01-1]. https://reptox.cnesst.gouv.qc.ca/pages/fiche-complete.aspx?no_produit=9431
8. SASS 3100 Dry air sampler. Research international. https://www.resrchintl.com/SASS_3100_air_sampler.html
9. Rosenberg, N. (2000). Asthme professionnel dû aux désinfectants employés en milieu hospitalier. 84 TR 26. INRS.
10. Subtilisins (Protease). (2007). Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products. [https://www.heraproject.com/files/22-F-07_PROTEASE_HERA_Final%20Edition%20\(unsecured%20-%20PDF-A-1b\).pd](https://www.heraproject.com/files/22-F-07_PROTEASE_HERA_Final%20Edition%20(unsecured%20-%20PDF-A-1b).pd)