

**INSTITUT SUPERIEUR DES TECHNIQUES MEDICALES DE
GOMA**

27/08/2024

ISTM/GOMA



BP 176 GOMA

E-mail : www.istmgoma.ac.cd

COURS DE BIOSECURITE EN LABORATOIRE

A l'usage des Etudiants de LI Biologie Médicale

Année d'étude : 2023-2024

NFITUMUKIZA NT. Modeste
Biologiste Médicale

DESCRIPTIF DU COURS

I. OBJECTIFS DU COURS

II.

A la fin de ce cours, l'étudiant qui aura bien suivi sera capable de :

- ✚ Définir la biosécurité et d'en donner ses composantes,
- ✚ Décrire le principe de la sûreté biologique en Laboratoire
- ✚ Différencier les équipements de sécurité en Laboratoire
- ✚ Décrire les bonnes pratiques applicables au Laboratoire
- ✚ Décrire les mécanismes de gestion des risques et de gestion de déchets au Laboratoire

III. PLAN DU COURS

INTRODUCTION :

DEFINITION

COMPOSANTE DE LA BIOSECURITE

Chapitre I. **LA SECURITE BIOLOGIQUE EN LABORATOIRE**

PRINCIPES DE LA SURETE BIOLOGIQUE EN LABORATOIRE

EQUIPEMENTS DE SECURITE BIOLOGIQUE

Chapitre II. **BONNE PRATIQUE EN LABORATOIRE**

Chapitre III. **GESTION DES RISQUES AU LABORATOIRE**

I. DEFINITION

II. . EVALUAVTION DES RISQUES

III. GROUPE DE RISQUES

IV. PROCESSUS DE L'EVALUATION DES RISQUES

V. RISQUES CHIMIQUES

VI. AUTRES TYPES DE RISQUES AU LABORATOIRE

VII. . MINIMISER LES RISQUES DE CONTAMINATION

Chapitre IV. **GESTION DES DECHETS AU LABORATOIRE**

I. INTRODUCTION

II. TYPE DE DECHETS PRODUITS AU LABORATOIRE

ANNEXE

CODE DE BONNES PRATIQUES

IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pour constituer ces notes, nous nous sommes référés aux documents suivants :

1. OMS : Manuel de Sécurité biologique en laboratoire ; Troisième Edition 2005
2. Pr MBOPI KEOU ; Le Guide de Biosécurité Et de Biosûreté En Laboratoires au Cameroun, Ed. 2019
3. UQAC : Manuel de Biosécurité en laboratoire ; Ire édition 2014
4. Emilie CHOUINARD ; CRCHU de Québec-Université Lava : Manuel de procédures Niveau de confinement 2 (NC2) ; éd. Janvier 2021
5. Mme MARIE LECLERC : Manuel de Biosécurité en Laboratoire ; Édition 2017
6. ONSSA-Maroc : Guide de biosécurité et de biosûreté au sein des établissements vétérinaires, 1 ère édition 2023
7. Dr : JOHAN PEETERS : Institut Scientifique de la Santé : Le manuel de biosécurité : Canevas et Guide de rédaction ; Juillet 2011 | Bruxelles
8. L'UQAC - Université du Québec à Chicoutimi : Comité de gestion des risques biologiques ; FORMATION SUR LA BIOSÉCURITÉ DANS LES LABORATOIRES ; Éd. 2016
9. Claude LEFEBVRE, Florent PASQUIER : La biosécurité État des lieux et perspectives ; Éd. 2022
10. COUMBA TOURE KANE : Biosécurité au Laboratoire & Covid-19 ; Éd. 2022

INTRODUCTION

Le laboratoire est un environnement sensible et complexe dont les services sont essentiels pour l'identification, la confirmation des causes des maladies courantes et en cas d'épidémie. Il peut être le point de départ d'une épidémie et le personnel qui y travaille est exposé au risque biologique.

Le risque biologique est présent lorsque des personnes peuvent être exposées à des agents biologiques infectieux notamment les bactéries, les virus, les champignons et les parasites ; les agents transmissibles non conventionnels. Ces agents sont susceptibles de provoquer une infection, une allergie ou une intoxication.

Les installations de production à grande échelle comme les usines spécialisées en fermentation industrielle et en production de vaccins, y compris les installations de recherche et d'analyse, représentent, aussi, un risque accru pour le personnel et l'environnement en raison des grandes quantités de matières infectieuses ou de toxines manipulées. C'est la raison pour laquelle le travail à grande échelle est parfois assujéti à des exigences uniques ou plus strictes et à des considérations supplémentaires comparativement aux espaces de travail en laboratoire pour un même niveau de confinement.

Il s'avère donc, nécessaire de doter au personnel de laboratoire des techniques et directives pratiques en vue de l'application des règles de biosécurité et de biosûreté aux installations manipulant les agents pathogènes y compris leurs laboratoires.

L'application de ces règles vise à réduire les risques pour ses utilisateurs et à prévenir la propagation d'agents pathogènes dans l'environnement à l'occasion du transport des spécimens, de leur stockage, de la manipulation des germes et de l'analyse proprement dite.

En définitive, il s'agit de protéger le personnel de l'installation, de laboratoire, la communauté en général, la population animale et l'environnement des conséquences d'une exposition aux matières infectieuses, aux animaux infectés ou aux produits chimiques et toxines manipulés dans leur enceinte.

DEFINITION DE LA BIOSECURITE

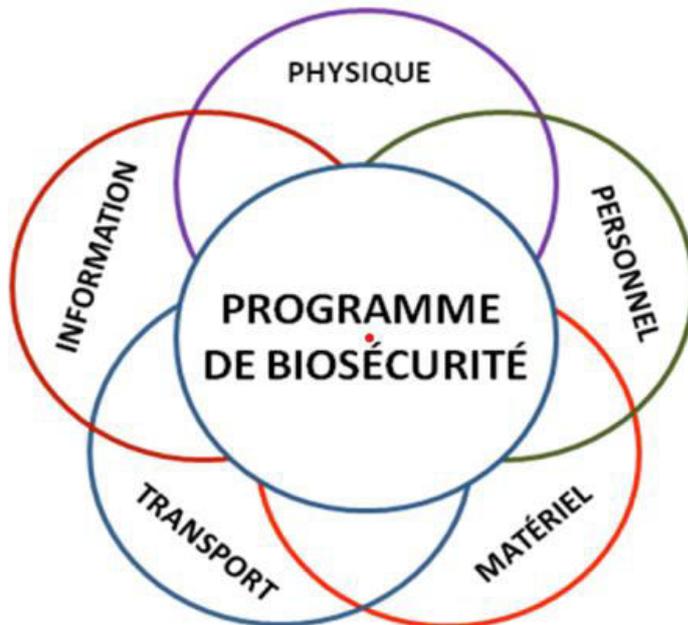
De manière générale, la biosécurité désigne l'ensemble des mesures préventives et réglementaires visant à réduire les risques de diffusion et transmission de maladies infectieuses chez l'homme, l'animal et le végétal (incluant le biotope), sachant ces trois domaines sont intimement liés les uns aux autres et que l'un d'entre eux, s'il est contaminé, peut parfaitement contaminer les deux autres par un agent pathogène transmissible (zoonose par exemple).

Ce concept désigne des processus, méthodes et mesures préventives et réglementaires visant à prévenir et à contrer les dangers qui sont liés à la manipulation et à l'utilisation de matériel biologique dans les laboratoires d'enseignement, de recherche, les hôpitaux et l'industrie civile d'une part et à réduire le risque biologique et notamment les risques de diffusion et de transmission (accidentelles ou malveillantes) de pathogènes (prions inclus) dans les populations humaines, les élevages, chez les animaux de compagnie, dans les cultures ou la nature sauvage d'autre part.

La biosécurité a pour vocation première de **prévenir, maîtriser** et/ou **gérer les risques** pesant sur la vie et la santé en tant que de besoin dans chaque secteur de la biosécurité considéré. Elle est ainsi un élément essentiel du développement et de prospérité d'un laboratoire en particulier et de toute structure de santé en général.

COMPOSANTES DE LA BIOSECURITE

La biosécurité entant que programme de prévention de dangers biologiques comprend cinq composante essentiels dont :



PERSONNEL : les personnes qui manipulent le matériel à risque doivent recevoir une formation pertinente pour ne pas mettre leur santé à risque.

PHYSIQUE : les locaux (laboratoire d'analyse biologique) où sont réalisées les manipulations ne doivent pas être fréquentés par des personnes étrangères

MATÉRIEL : il faut contrôler le matériel qui présente des risques en biosécurité dès leur arrivée à leur élimination ; le responsabiliser les personnes formées en matière de gestion des déchets

TRANSPORT : il faut porter une attention toute particulière à la réception et à l'expédition de matériel à risque.

INFORMATION : il faut réduire l'accès à la base de données et aux appareils qui renferment le matériel à risque, tout en transmettant l'information relative à la biosécurité aux nouveaux utilisateurs.

Nb. En tant que programme à part entière, Il est obligatoire pour toutes personnes utilisant des matériaux et organismes comportant des risques biologiques faire une formation en biosécurité ; cela permettra de réduire sensiblement ou d'éliminer des éventuelles contaminations par des agents infectieux, prévenir le vol, le mauvais usage ou le rejet intentionnel de matériaux et organismes comportant des risques biologiques.

Chapitre I. **LA SECURITE BIOLOGIQUE EN LABORATOIRE**

I.1. PRINCIPES DE LA SURETE BIOLOGIQUE EN LABORATOIRE

La sécurité biologique consiste dans la mise en œuvre d'un certain nombre de principes, de techniques et de pratiques visant à prévenir le risque accidentel d'exposition du personnel à des agents pathogènes ou à des toxines, ou encore de libération de telles substances.

La sûreté biologique, elle, consiste dans la mise en place d'un certain nombre de mesures d'ordre administratif et de gestion du personnel, en vue de réduire le risque de perte, de vol, d'utilisation à mauvais escient, de détournement ou de libération délibérée d'agents ou de toxine

Le véritable fondement de la sûreté biologique **réside dans l'application en laboratoire des pratiques de sécurité biologique**. En effet, grâce aux évaluations du risque pratiquée dans le cadre du programme biosécuritaire de l'établissement, **on peut recueillir des informations sur la nature des micro-organismes détenus, sur l'emplacement de ces micro-organismes, sur le personnel qui demande à pouvoir en disposer et sur l'identité de la personne responsable de ces germes**. On peut alors exploiter ces informations pour déterminer si un établissement détient des matières biologiques susceptibles d'attirer des personnes envisageant d'en faire un usage criminel.

Il incombe à chaque laboratoire, en fonction de ses besoins, de la nature de ses activités et des conditions locales, **d'élaborer et de mettre en œuvre un programme de sûreté biologique spécifique**. Par conséquent, les activités de sûreté biologique pratiquées dans un laboratoire doivent être représentatives des divers besoins de cet établissement et bénéficier de la contribution ou de l'avis des directeurs scientifiques, des principaux chercheurs,

des responsable de la sûreté biologique, du personnel scientifique du laboratoire, du personnel d'entretien, des responsables administratifs, du personnel spécialisé dans les technologies de l'information et, si nécessaire, des services de répression des fraudes et du personnel de sécurité.

Les mesures de sûreté biologique en laboratoire doivent s'appuyer sur **un programme complet** de responsabilisation à l'égard des agents pathogènes et des toxines, qui comprend un **inventaire actualisé** identifiant l'emplacement de ces matières et du personnel y ayant accès et **indiquant leur utilisation**, leurs transferts internes à l'établissement ou entre établissements, ainsi que toute inactivation et/ou élimination éventuelles des matières. De même, il convient **d'établir un protocole de sûreté biologique pour le laboratoire, destiné à guider l'identification, le signalement, l'étude et l'élimination des failles dans la sûreté biologique de cet établissement, y compris les incohérences dans les résultats d'inventaire**. La participation, les rôles et les responsabilités des autorités de santé et de sécurité publiques en cas d'entorse à la sûreté doivent être clairement définis.

Une formation à la sûreté biologique en laboratoire, distincte de la formation à la sécurité biologique en laboratoire, doit être dispensée **à tout le personnel**. Une telle formation devrait aider les membres du personnel à comprendre **les besoins en matière de protection** de ces matières et **les raisons des différentes mesures de sécurité biologique**. Elle devrait aussi inclure un examen des normes nationales pertinentes et des procédures propres à l'établissement. Au cours de cette formation, il convient de présenter également les procédures précisant les rôles et les responsabilités du personnel en matière de sûreté en cas d'infraction dans ce domaine.

L'aptitude professionnelle et **morale** à travailler avec des agents pathogènes dangereux de l'ensemble du personnel disposant d'un accès autorisé

régulier aux matières sensibles **joue également un rôle déterminant dans l'efficacité** des activités concernant la sûreté en laboratoire.

En résumé, les **précautions de sûreté** doivent devenir des **éléments de routine du travail de laboratoire**, à l'égal des mesures d'asepsie ou de sécurité microbiologique. **Les mesures de sûreté** biologique en laboratoire **ne doivent pas faire obstacle à un partage efficace des matières de référence**, des échantillons cliniques et épidémiologiques et des informations qui s'y rapportent, nécessaires aux enquêtes cliniques ou de santé publique. Un programme de sûreté bien géré ne devrait pas entraver outre mesure les activités quotidiennes du personnel scientifique, ni faire obstacle à la réalisation des recherches. Un accès légitime aux recherches et aux matières cliniques importantes doit être préservé. **L'évaluation de l'aptitude des membres du personnel, l'apport à ces membres d'une formation spécifique à la sûreté et un respect rigoureux des procédures de protection des agents pathogènes constituent des moyens raisonnables pour améliorer la sûreté biologique en laboratoire.** La mise en place et le maintien de tous ces efforts passe par la réalisation d'évaluations des risques et des menaces et par la révision et la mise à jour des procédures sur une base régulière. Des **contrôles du respect de ces procédures**, s'appuyant sur des **instructions claires quant aux rôles, aux responsabilités et aux mesures correctives**, doivent être prévus par les programmes de sûreté biologique en laboratoire et par les normes nationales dans ce domaine.

I.2.EQUIPEMENTS DE SECURITE BIOLOGIQUE

Comme les aérosols sont une source importante d'infection, il faut veiller à ce qu'il s'en forme le moins possible et éviter de les disperser. Des aérosols dangereux peuvent se former dans de nombreux laboratoires, par exemple

lorsqu'on mélange, mixe, broie, secoue, agite, traite aux ultrasons ou centrifuge du matériel biologique infectieux. Même en utilisant un appareillage qui répond aux normes de sécurité, il est préférable d'effectuer autant que possible ces opérations dans une enceinte de sécurité biologique agréée. L'utilisation d'équipements de sécurité ne garantit pas la protection de l'opérateur si celui-ci n'est pas formé et n'utilise pas les techniques appropriées.

I.2.1. ISOLATEURS A DEPRESSION EN FILM OU FEUILLE DE PLASTIQUE SOUPLE

L'isolateur à dépression en film souple est un **dispositif de confinement primaire autonome qui assure une protection maximale contre le matériel biologique dangereux**. Il peut être monté sur un support mobile. Le volume de travail est complètement fermé par une enveloppe transparente en chlorure de polyvinyle (PVC) suspendue à un cadre en acier. La pression à l'intérieur de l'isolateur est maintenue à une valeur inférieure à celle de la pression atmosphérique.

On peut équiper l'isolateur d'un incubateur, d'un microscope ou d'autres types d'objets ou d'instruments tels que centrifugeuses, cages pour animaux, enceintes chauffantes, etc. Tous ces objets ou ces matériels sont introduits ou retirés par des orifices destinés, l'un à l'instrumentation et l'autre aux échantillons, sans risque pour la sécurité microbiologique. Les manipulations se font à l'aide de manchons dont l'extrémité est munie de gants jetables. L'isolateur est équipé d'un manomètre pour la surveillance de la pression à l'intérieur de l'enveloppe plastique. Les isolateurs en film souple sont utilisés pour manipuler les micro-organismes à haut risque (groupes de risque 3 ou 4) sur le terrain, dans des conditions où il serait impossible ou imprudent d'installer et d'utiliser des enceintes de sécurité biologique classiques.

I.2.2. PIPETTEURS

Le pipetage doit toujours se faire au moyen de pipeteurs. **Le pipetage à la bouche est absolument interdit.** Les accidents les plus courants liés au pipetage sont dus au pipetage à la bouche. **L'aspiration par la bouche et l'ingestion de produits dangereux** sont responsables d'un grand nombre d'infections et d'accidents de laboratoire.

Des germes pathogènes peuvent également être véhiculés jusqu'à la bouche si le doigt avec lequel on ferme la pipette a été contaminé. Le pipetage à la bouche présente un autre danger beaucoup moins connu, à savoir **l'inhalation des aérosols qui se forment pendant l'aspiration.** Le cotonnage des pipettes n'assure pas une filtration microbiologique satisfaisante, en pression positive ou négative, et des particules peuvent traverser le coton. Si celui-ci est très serré, on risque d'aspirer fortement, et en conséquence, d'aspirer le coton, l'aérosol et même le liquide. **L'utilisation de pipeteurs permet donc d'éviter l'ingestion de germes pathogènes.**

Des aérosols peuvent également se former lorsqu'une goutte de liquide tombe sur un plan de travail, lorsqu'on mélange une culture par aspirations et refoulements successifs, et lorsqu'on souffle pour évacuer la dernière goutte de la pipette. On peut éviter l'inhalation des aérosols qui se forment inévitablement au cours du pipetage en travaillant dans une enceinte de sécurité biologique.

Les pipeteurs seront choisis avec soin. Ils seront conçus et utilisés de manière à ne pas créer de risque supplémentaire d'infection et ils doivent pouvoir être nettoyés et stérilisés facilement. Des pipettes dont la pointe est munie d'un embout (anti aérosols) doivent être utilisées pour la manipulation des micro-organismes et des cultures cellulaires. Les pipettes défectueuses ne doivent pas être utilisés car elles comportent des risques

I.2.3. HOMOGENEISEURS, AGITATEURS SECOUEURS, MELANGEURS ET GENERATEURS D'ULTRASONS

Les homogénéiseurs domestiques (utilisés à la cuisine) ne sont pas hermétiques et libèrent des aérosols. **On utilisera exclusivement des homogénéiseurs conçus pour les laboratoires.** Ils sont construits de manière à réduire ou empêcher la libération d'aérosols. Les broyeurs, que l'on peut utiliser maintenant pour traiter de petits ou de gros volumes de matériel biologique, peuvent également entraîner la formation d'aérosols.

Lorsque des homogénéiseurs sont utilisés pour traiter du matériel contenant des micro-organismes contagieux, ils doivent toujours être chargés et rouverts dans une enceinte de sécurité biologique.

Les générateurs d'ultrasons peuvent entraîner la formation d'aérosols. Ils seront utilisés dans des enceintes de sécurité biologique ou couverts par un écran protecteur pendant l'utilisation. L'écran et l'extérieur du générateur d'ultrasons seront décontaminés après usage.

I.2.4. ANSES A USAGE UNIQUE

L'avantage des anses à usage unique tient à ce qu'elles n'ont pas besoin d'être passées à la flamme et qu'elles peuvent donc être utilisées dans des enceintes de sécurité biologique où les becs Bunsen et les micro-incinérateurs perturberaient le flux laminaire. **Ces anses seront mises à tremper dans un désinfectant après usage et éliminées selon la procédure applicable aux déchets contaminés.**

I.2.5. MICRO-INCINERATEURS

Les micro-incinérateurs fonctionnant au gaz ou à l'électricité comportent une protection en verre au **borosilicate** ou en **céramique** qui **réduit les projections et la dispersion du matériel infecté lorsque les anses sont stérilisées**. Ils peuvent cependant perturber le flux laminaire et doivent donc être disposés vers le fond du plan de travail de l'enceinte.

I.2.6. EQUIPEMENTS ET VETEMENTS DE PROTECTION INDIVIDUELLE

Les équipements et vêtements destinés à la protection individuelle **constituent une barrière matérielle qui réduit le risque d'exposition aux aérosols, aux éclaboussures** ou encore le **risque d'inoculation accidentelle**. Ces équipements ou vêtements doivent être portés pour travailler au laboratoire. Avant de quitter le laboratoire, il faut les ôter puis se laver les mains. Ces équipements peuvent être des **blouses, sarraus, combinaisons et tabliers de laboratoire**

Il est préférable que **les blouses de laboratoire soient entièrement boutonnées**. Cela étant, les sarraus ou les combinaisons à manches longues boutonnées sur l'arrière protègent mieux que les blouses de laboratoire et ont la préférence dans les laboratoires de microbiologie ou pour travailler avec une enceinte de sécurité biologique.

Si nécessaire, on peut porter un **tablier sur la blouse** ou le **sarrau pour mieux se protéger en cas de renversement de produits chimiques** ou de matériel biologique comme le sang ou les milieux de culture liquides.

L'établissement doit disposer d'un service de blanchisserie sur place ou à proximité. **Les blouses de laboratoires, sarraus, combinaisons ou tabliers ne doivent pas être portés hors des locaux du laboratoire.**

I.2.7. LUNETTES A COQUES, LUNETTES DE SECURITE ET ECRANS FACIAUX

Le **choix d'un équipement** destiné à protéger les yeux et la face contre les éclaboussures, les projections ou les chocs **dépend de la nature des activités auxquelles se livre l'opérateur.** Il existe des lunettes de vue ou des lunettes non correctrices en matériau incassable dont la monture est spécialement conçue pour que les verres soient montés par l'avant et qui sont incurvées ou dotées d'écrans latéraux (lunettes de sécurité). Ces lunettes de sécurité ne protègent pas très bien contre les éclaboussures ou projections, même quand elles sont dotées d'écrans latéraux. ***Pour se protéger contre les projections et les chocs, il faut porter des lunettes à coques,*** le cas échéant par-dessus les lunettes de vue ou les lentilles de contact (lesquelles ne protègent pas des risques chimiques ou biologiques). Les **écrans faciaux** (visières) sont en plastique incassable, ils s'adaptent sur le visage et sont maintenus au moyen de sangles ou d'un serre-tête. **Les lunettes à coques et les lunettes de sécurité ne doivent pas être portées hors des locaux du laboratoire.**

I.2.8. APPAREILS RESPIRATOIRES

Une protection respiratoire peut se révéler nécessaire lorsqu'on procède à des manipulations particulièrement dangereuses (par ex. **le nettoyage d'une surface où du matériel infectieux a été répandu**).

Le choix de tel ou tel appareil dépend de la nature du danger. Certains de ces appareils sont munis de filtres interchangeables pour la protection contre les gaz, les vapeurs, les particules et les micro-organismes.

Il est impératif d'utiliser un filtre adapté au type d'appareil respiratoire utilisé. **Pour une protection optimale, il faut veiller à bien adapter le masque à la face de l'utilisateur et procéder à un essai.**

Il existe également des appareils respiratoires totalement autonomes alimentés en air par un système intégré ; **ces dispositifs assurent une protection totale.** Pour choisir l'appareil qui convient, il est prudent de s'adresser à un spécialiste qualifié, par exemple un ingénieur hygiène et sécurité. Les masques chirurgicaux n'ont d'autre but que de protéger le patient et ne confèrent aucune protection respiratoire à ceux qui les portent. Il existe des appareils respiratoires jetables à usage unique (ISO 13.340.30) qui sont conçus pour protéger contre l'exposition aux agents biologiques. **Les appareils respiratoires ne doivent pas être portés hors des locaux du laboratoire.**

I.2.9. GANTS

Les mains peuvent être contaminées au cours de certaines manipulations. Elles sont également exposées aux coupures et aux piqûres. **Les gants de type chirurgical certifiés de qualité microbiologique, en latex, PVC ou polyacrylonitrile sont très utilisés pour les travaux de laboratoire en général,** comme pour la manipulation d'agents infectieux ou de sang et de liquides organiques contaminés. On fait également usage de gants réutilisables, mais il faut veiller à les ôter correctement et à les laver, nettoyer et désinfecter scrupuleusement.

Lorsqu'on a manipulé du matériel infectieux, travaillé avec une enceinte de sécurité biologique ou qu'on s'apprête à quitter le laboratoire, **il faut ôter les gants et se laver soigneusement les mains. Les gants jetables qui ont été utilisés doivent être éliminés avec les déchets infectieux.**

Des cas de réactions allergiques telles que dermatites ou hypersensibilisation immédiate ont été observés chez certains personnels de laboratoire ou d'autres travailleurs qui avaient porté des gants en latex, notamment des gants poudrés. On devrait pouvoir disposer d'autres gants que des gants poudrés en latex.

Lorsqu'il y a risque de coupure, comme cela peut être le cas à l'occasion d'une autopsie, **il faut porter des gants en mailles d'acier inoxydable.** Il est toutefois à noter que ces gants protègent contre les coupures ou les entailles mais pas contre les piqûres. **Les gants ne doivent pas être portés hors des locaux du laboratoire.**

I.2.10. ENCEINTES DE SECURITE BIOLOGIQUE

Les enceintes de sécurité biologique (ESB) – appelées aussi **postes de sécurité microbiologique (PSM)** sont des dispositifs conçus **pour éviter que l'opérateur, le local du laboratoire et le matériel de travail ne soient exposés aux aérosols ou éclaboussures infectieux** qui pourraient se produire lors de la manipulation de matériels biologiques contenant des agents pathogènes, comme les cultures primaires, les souches pour les cultures et les échantillons destinés au diagnostic.

Des aérosols se produisent lors de toute manipulation qui communique de l'énergie à un produit liquide ou semi-liquide, par exemple lorsqu'on secoue,

verse, agite, ou fait tomber un liquide goutte à goutte sur une surface ou dans un autre liquide.

D'autres opérations, par exemple **ensemencer** en stries une plaque de gélose, **inoculer des flacons pour culture cellulaire à l'aide d'une pipette**, utiliser une pipette multivoie pour délivrer une suspension liquide d'agents infectieux sur une plaque de microculture, homogénéiser et mélanger du matériel biologique infectieux, centrifuger un liquide ou travailler sur un animal, **peuvent provoquer la formation d'aérosols infectieux.**

Les particules d'aérosol de moins de 5 µm de diamètre ou les gouttelettes de diamètre compris entre 5 et 100 µm, ne sont pas visibles à l'œil nu. **Lorsque des aérosols se forment, l'opérateur ne s'en rend généralement pas compte, et il n'a pas conscience non plus qu'ils peuvent être inhalés ou provoquer la contamination croisée des plans de travail.** On a montré qu'une ESB convenablement utilisée est capable de réduire très efficacement le nombre d'infections contractées au laboratoire ou les contaminations croisées consécutives à une exposition à des aérosols infectieux. **Les ESB contribuent également à la protection de l'environnement.**

Les ESB sont conçues selon leur niveau de protection et sécurité contre les agents infectieux. D'où nous pouvons citer :

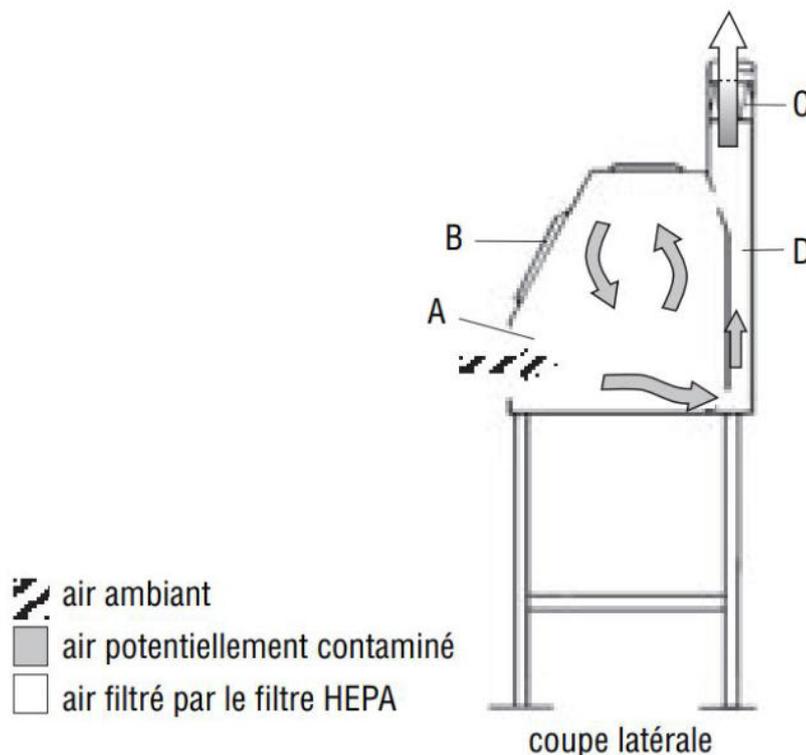
I.2.10.1. Enceinte de Sécurité Biologique de Classe I

L'ESB de classe I a été la première enceinte à être agréée et, du fait de la simplicité de sa conception, elle est encore très largement utilisée dans le monde. **Elle présente l'avantage d'assurer la protection du personnel et de l'environnement** et peut également être utilisée pour travailler sur des radionucléides ou des produits chimiques volatils et toxiques.

L'opérateur peut passer les bras par l'ouverture frontale pour atteindre le plan de travail situé à l'intérieur de l'enceinte tout en observant ce plan à travers un panneau de verre. Ce panneau peut également être complètement levé, ce qui permet d'accéder plus facilement au plan de travail pour le nettoyer ou pour toute autre raison.

L'air de l'enceinte est évacué par une conduite munie d'un filtre HEPA : a) dans le laboratoire, puis à l'extérieur du bâtiment par le circuit d'évacuation de ce dernier ; b) à l'extérieur par le circuit d'évacuation du bâtiment ; c) directement à l'extérieur.

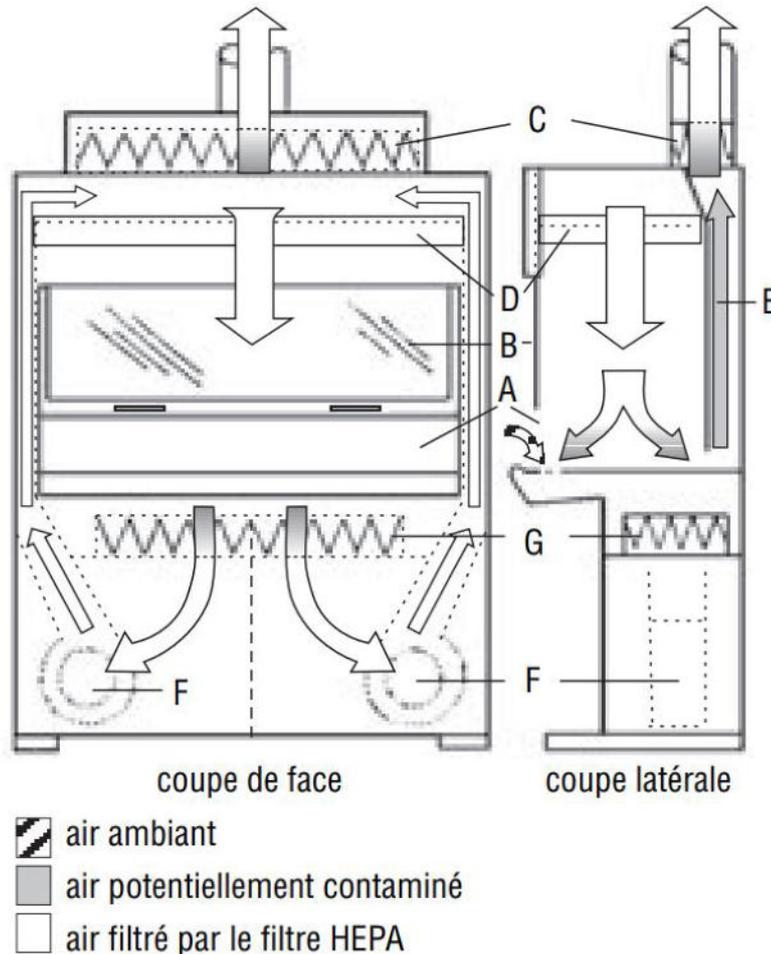
Toutefois, comme l'air aspiré par l'ouverture frontale passe sur le plan de travail sans être stérilisé, ce dispositif ne protège pas à coup sûr le produit manipulé



Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe I.
A, ouverture frontale; B, panneau d'observation à guillotine; C, filtre HEPA monté sur la conduite d'évacuation; D, gaine d'évacuation.

I.2.10.2. Enceinte de Sécurité Biologique de Classe II

Les ESB de classe II ont été conçues **non seulement pour assurer la protection du personnel, mais également pour éviter que le matériel biologique présent sur le plan de travail ne soit contaminé par l'air de la pièce.** Les ESB de classe II, dont il existe quatre types (A1, A2, B1 et B2), se **différencient des ESB de classe I par le fait qu'elles ne laissent passer sur le plan de travail que de l'air stérile** c'est-à-dire ayant traversé un filtre HEPA. Les ESB de classe II peuvent être utilisées pour travailler sur des agents infectieux dangereux (groupe 2 & 3) et l'opérateur doit porter une combinaison de protection pressurisée

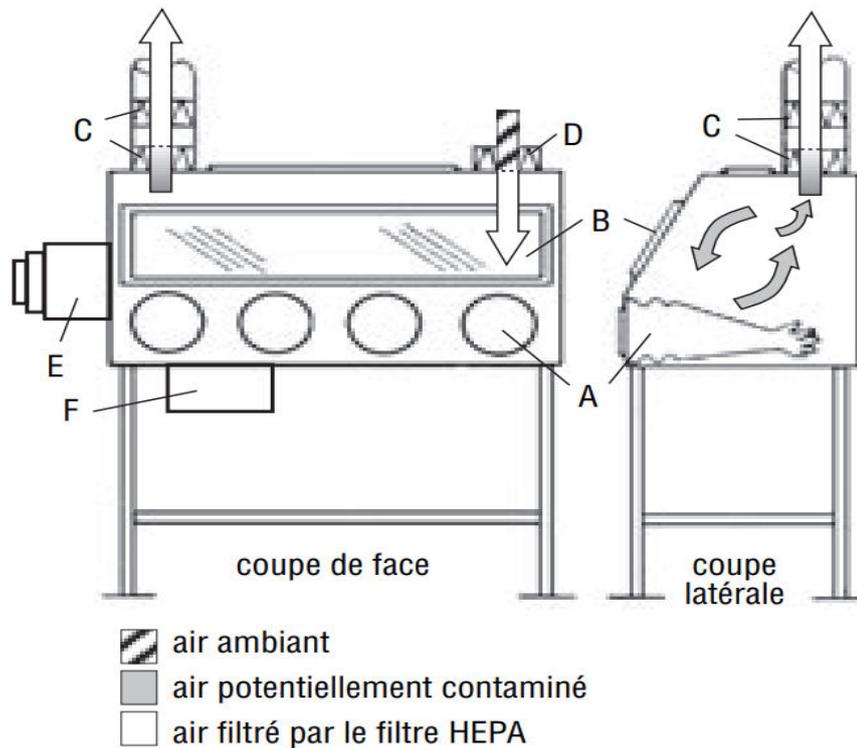


1. Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe II, type B1.

A, ouverture frontale; B, panneau d'observation à guillotine; C, filtre HEPA d'évacuation; D, filtre HEPA d'admission; E, gaine d'évacuation en dépression; F, ventilateur; G, filtre HEPA d'admission d'air. Il est nécessaire de raccorder le circuit d'évacuation de l'enceinte au circuit général d'évacuation du bâtiment.

1.2.10.3. Enceinte de Sécurité Biologique de Classe III

Il assure au personnel la **protection maximale**, est utilisé pour travailler sur des agents très infectieux (groupe de risque 4). Toutes les traversées sont dotées de joints étanches aux gaz. L'air admis dans l'enceinte passe à travers un filtre HEPA et l'air qui en sort à travers deux filtres HEPA. **Les ESB de classe III conviennent pour les manipulations effectuées dans les laboratoires de sécurité biologique niveau 3 ou 4.**



Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe III (boîte à gants).

A, orifices de fixation des manchons à gants; B, panneau d'observation à guillotine; C, deux filtres HEPA d'évacuation montés en série; D, filtre HEPA d'admission; E, autoclave à deux portes ou sas de passage; F, cuve de désinfection chimique. Il est nécessaire de raccorder le circuit d'évacuation de l'enceinte à un circuit d'évacuation du bâtiment indépendant.

1.2.10.4. Choix D'une Enceinte De Sécurité Biologique

Le choix d'une ESB doit reposer avant tout sur le type de protection nécessaire : protection du produit manipulé, protection du personnel contre des micro-organismes des groupes de risque I à 4, protection du personnel contre des radionucléides ou des produits chimiques toxiques et volatils, protection simultanée contre plusieurs de ces risques.

Il ne faut pas utiliser de produits chimiques toxiques ou volatils dans les enceintes avec recyclage de l'air dans la pièce, à savoir les enceintes de classe I qui ne sont pas raccordées au circuit d'évacuation du bâtiment ou les enceintes de classe IIA1 ou IIA2. Lorsque l'on travaille sur des

quantités plus importantes de radionucléides ou de produits chimiques volatils, il faut utiliser une enceinte à évacuation totale, c'est-à-dire une ESB de classe IIB2 et à défaut une ESB de classe IIB1.

I.2.10.5. Utilisation Des Enceintes De Sécurité Biologique Au Laboratoire

I. EMPLACEMENT

Il faut donc **installer les ESB** dans des emplacements qui soient **éloignés des points de passage et des courants d'air** qui pourraient perturber leur fonctionnement. Dans la mesure du possible, il faudrait prévoir un dégagement d'une trentaine de centimètres derrière l'enceinte et sur chacun de ses côtés pour faciliter l'accès en cas d'opérations de maintenance. Il peut également s'avérer nécessaire de prévoir un dégagement d'environ 30 à 35 cm au-dessus de l'enceinte afin que l'on puisse mesurer exactement la vitesse de l'air à travers le filtre d'évacuation et le cas échéant, changer le filtre.

2. OPERATEURS

Si les enceintes de sécurité biologique ne sont pas utilisées correctement, la protection conférée risque d'être considérablement réduite. **L'opérateur doit veiller à ne pas perturber le flux d'air entrant** lorsqu'il passe les bras dans le volume de travail ou les en retire. Il faut également veiller à ne faire qu'un minimum de mouvements à travers l'ouverture frontale en plaçant tous les instruments et objets nécessaires sur le plan de travail avant de commencer la manipulation.

3. DISPOSITION DU MATERIEL

Les appareils qui produisent des aérosols (par ex. mélangeurs, centrifugeuses, etc.) doivent être placés vers le fond de l'enceinte. Le matériel encombrant, comme les sacs de sécurité biologique, les plateaux pour pipettes

utilisées et les fioles à vide doivent être placés sur un des côtés du volume de travail. Sur le plan de travail, il faut travailler en allant des zones propres vers les zones contaminées. Les matériels doivent être placés en ordre utile.

4. UTILISATION ET MAINTENANCE

Il faut **brancher** les enceintes au moins **5 minutes avant** de commencer à travailler et attendre également **5 minutes une fois la manipulation achevée**, pour « **purger** » le volume de travail, c'est-à-dire pour que l'air contaminé ait le temps d'être évacué de l'enceinte. **Toute réparation effectuée sur une ESB doit être confiée à un technicien qualifié**. Si un dysfonctionnement se produit pendant l'utilisation de l'enceinte, il faut le signaler et y remédier avant de réutiliser l'enceinte

5. LAMPES UV

Il n'est pas nécessaire d'équiper les ESB de lampes à ultraviolets. Si toutefois on utilise de telles lampes, il faut les nettoyer chaque semaine pour éliminer la poussière et les saletés qui pourraient réduire l'action germicide du rayonnement.

Les lampes UV doivent être éteintes quand des personnes sont présentes dans la pièce, afin de protéger leurs yeux et leur peau contre toute exposition accidentelle.

6. FLAMMES NUES

Il faut **éviter la présence de toute flamme** nue dans l'environnement quasi stérile qui existe à l'intérieur de l'enceinte. En effet, **les flammes perturbent la circulation de l'air et peuvent être dangereuses si l'on utilise également des substances volatiles inflammables**. Pour stériliser

les anses bactériologiques, il existe des microbrûleurs et des « fours » électriques, qui sont préférables aux flammes nues.

7. PRODUITS RÉPANDUS ACCIDENTELLEMENT

Il faut **afficher dans le laboratoire un exemplaire de la conduite à tenir si des produits sont répandus accidentellement** et **veiller à ce que chacun lise et assimile ces instructions**. Si un produit présentant un danger biologique est répandu accidentellement dans une ESB, il faut nettoyer immédiatement le volume de travail pendant que l'enceinte continue à fonctionner. On **utilisera à cet effet un désinfectant efficace** que l'on devra appliquer en s'efforçant de produire le moins d'aérosols possible. Tout ce qui entre en contact avec le produit répandu doit être désinfecté ou passé à l'autoclave.

8. NETTOYAGE ET DÉSINFECTION

Tout ce qui se trouve à l'intérieur de l'enceinte, y compris l'appareillage, **doit faire l'objet d'une décontamination en surface et être retiré du volume de travail une fois la manipulation achevée**, car un reste de milieu de culture peut permettre la prolifération des micro-organismes.

Les surfaces intérieures de l'enceinte doivent être décontaminées avant et après chaque utilisation. Les plans de travail et les parois intérieures doivent être passés au désinfectant de manière à tuer tous les micro-organismes présents.

A la **fin de la journée** de travail, on procédera à une **décontamination finale** consistant à passer au désinfectant le plan de travail, les parois latérales, le fond ainsi que la face arrière du panneau d'observation. A cet effet, on peut utiliser une solution d'hypochlorite ou de l'alcool à 70 %, si ces produits sont efficaces contre les germes que l'on cherche à éliminer. Si on utilise un

désinfectant corrosif, comme l'hypochlorite par exemple, il faudra encore rincer les surfaces avec de l'eau stérile.

Il est recommandé **de procéder à cette désinfection pendant que l'enceinte est en marche**. Si elle a été arrêtée, on la remettra en marche pendant 5 minutes pour la purger de l'air qu'elle contient avant de la débrancher définitivement.

9. DÉCONTAMINATION

L'enceinte doit être décontaminée avant de changer les filtres ou avant de la déplacer. La méthode la plus courante consiste en une fumigation au formaldéhyde. La décontamination des enceintes doit être effectuée par un professionnel qualifié.

10. EQUIPEMENTS DE PROTECTION INDIVIDUELLE

Des vêtements protecteurs doivent être portés chaque fois que l'on utilise une ESB. **Les blouses de laboratoire sont acceptables pour le travail aux niveaux de sécurité biologique 1 ou 2**. Aux niveaux 3 ou 4, il faut utiliser des blouses à boutonnage dans le dos, qui assurent une meilleure protection (sauf dans un laboratoire où le port d'une combinaison pressurisée est obligatoire). Les gants doivent être bien tirés de manière à passer par-dessus les poignets et non pas en dessous. Pour se protéger les poignets, on peut ajouter des manches à élastique. Certaines manipulations nécessitent le port d'un masque ou de lunettes de protection.

11. ALARMES

Les ESB peuvent être **équipées d'un ou deux types d'alarme**. Certaines alarmes n'équipent que les enceintes dotées d'un panneau d'observation à guillotine. Ces alarmes se déclenchent si l'opérateur place le panneau dans une mauvaise position et ne s'arrêtent que lorsqu'il a remis le panneau correctement en place. **Un autre type d'alarme est destiné à avertir d'une perturbation dans la circulation de l'air**. Son déclenchement est un signal de danger immédiat pour l'opérateur ou pour le produit. Si cette alarme retentit, il faut interrompre immédiatement la manipulation et prévenir le chef de laboratoire. Le manuel d'utilisation fourni par le fabricant doit indiquer quelle est ensuite la marche à suivre. Ces questions doivent être abordées lors de la formation à l'utilisation des ESB.

12. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES

Le choix de l'ESB appropriée, son installation, son utilisation correcte et le contrôle annuel de son bon fonctionnement sont des opérations complexes. **Il est vivement recommandé qu'elles soient supervisées par un professionnel de la sécurité biologique parfaitement formé et expérimenté**. Ce spécialiste doit très bien connaître la littérature sur le fonctionnement et l'utilisation de chaque ESB.

Les opérateurs doivent également recevoir une formation en bonne et due forme portant sur le fonctionnement et l'utilisation des ESB

Chapitre II. **BONNE PRATIQUE EN LABORATOIRE**

VIII. INTRODUCTION

L'erreur humaine, une mauvaise technique et le mauvais usage des équipements et de l'appareillage sont à l'origine de la plupart des lésions et infections attribuables aux activités exercées dans un laboratoire. On trouvera dans le présent chapitre un recueil de techniques destinées à éviter ou à réduire au minimum les problèmes de cette nature qui surviennent le plus fréquemment.

II.11. REGLES DE SECURITE POUR LA MANIPULATION DESECHANTILLONS AU LABORATOIRE

Si le prélèvement, le transport et la réception des échantillons au laboratoire ne sont pas effectués correctement, il existe un risque d'infection pour le personnel.

II.3. CONTENEURS A ECHANTILLONS

Les conteneurs à échantillons peuvent être en verre ou de préférence en matière plastique. **Ils doivent être solides et ne pas fuir** lorsque le bouchon ou le capuchon est placé correctement. **L'extérieur du conteneur doit être propre, sans trace de matériel.** Les conteneurs doivent être correctement étiquetés pour faciliter l'identification. Les formulaires de demandes d'échantillons ou les fiches techniques ne doivent pas servir à emballer les conteneurs, mais seront placés dans des enveloppes séparées, de préférence résistantes à l'eau.

II.4. TRANSPORT DES ECHANTILLONS A L'INTERIEUR DE L'ETABLISSEMENT

Pour éviter qu'il y ait des fuites ou du matériel répandu accidentellement, on utilisera des conteneurs secondaires, des boîtes par exemple, munis de portoirs de façon que le récipient contenant l'échantillon ne se renverse pas. Les conteneurs secondaires peuvent être en métal ou en matière plastique, mais doivent être autoclavables ou résistants aux désinfectants chimiques et le couvercle doit de préférence être muni d'un joint d'étanchéité ; Ils seront régulièrement décontaminés.

II.5. RECEPTION DES ECHANTILLONS

Les laboratoires qui reçoivent un grand nombre d'échantillons devront réserver une pièce ou une zone particulière à cet effet.

II.6. OUVERTURE DES COLIS

Le personnel qui reçoit et défait l'emballage des échantillons doit **connaître les risques qu'il court** et on doit lui avoir appris à respecter les précautions d'usage, notamment **en présence d'un conteneur brisé ou qui fuit**. Les conteneurs primaires doivent être ouverts dans une enceinte de sécurité biologique. Le personnel doit avoir des désinfectants à sa disposition.

II.7. UTILISATION DES PIPETTES ET DES DISPOSITIFS DE PIPETAGE

1. On utilisera toujours un dispositif de pipetage (pipeteur, propipette). **Le pipetage à la bouche doit être interdit,**
2. Toutes les pipettes doivent être cotonnées pour réduire la contamination du dispositif,

3. Ne jamais souffler dans une pipette placée dans un liquide contenant des agents infectieux,
4. Les matériels infectieux ne seront jamais mélangés par aspirations et refoulements successifs,
5. Ne pas souffler dans les pipettes pour en chasser le liquide,
6. Les pipettes à deux traits sont préférables aux autres, puisqu'on n'est pas obligé de souffler pour les vider,
7. Les pipettes contaminées seront complètement immergées dans un désinfectant approprié placé dans un récipient incassable. On les laissera tremper suffisamment longtemps avant de les éliminer,
8. Un récipient pour les pipettes usagées sera placé à l'intérieur de l'enceinte de sécurité biologique (et non à l'extérieur),
9. On ne doit pas utiliser de seringue munie d'une aiguille hypodermique pour pipeter,
10. Il existe des dispositifs qui permettent d'ouvrir les flacons capsulés au moyen d'une pipette, ce qui évite l'utilisation des aiguilles hypodermiques et des seringues,
11. Pour éviter la dispersion du matériel infectieux qui tomberait accidentellement de la pipette, on placera sur le plan de travail un matériau absorbant qui sera ensuite éliminé selon la procédure applicable aux déchets infectieux.

II.8. COMMENT EVITER LA DISSEMINATION DE MATERIEL INFECTIEUX

- I. Pour éviter que les anses de transfert ne répandent prématurément leur contenu, il faut que l'anneau ait un diamètre de 2 à 3 mm et qu'il soit entièrement

fermé. Le manche ne doit pas dépasser 6 cm de long pour réduire le plus possible les vibrations,

2. On évitera le risque de projections de matériel infectieux par la flamme nue d'un bec Bunsen en utilisant un micro-incinérateur pour stériliser les anses de transfert. Toutefois, il est préférable d'utiliser des anses à usage unique qui n'ont pas besoin d'être ré-stérilisées,

3. En séchant les échantillons d'expectorations, on s'efforcera d'éviter la formation d'aérosols,

4. Les échantillons et les cultures destinés à être autoclavés ou éliminés seront placés dans des conteneurs étanches, par exemple des sacs poubelle de laboratoire. Il faut en fermer l'extrémité avec du ruban adhésif autoclavables avant de les jeter dans les poubelles,

5. Les zones de travail doivent être décontaminées avec un désinfectant approprié avant et à la fin de chaque période de travail.

II.9. UTILISATION DES ENCEINTES DE SECURITE BIOLOGIQUE

1. L'utilisation et les contraintes des enceintes de sécurité biologique seront expliquées à tous les utilisateurs potentiels, en se référant aux normes nationales et à la documentation appropriée. Des protocoles écrits, des manuels d'hygiène et sécurité ou des manuels d'utilisation seront remis au personnel. **Il doit être clairement expliqué, en particulier, que l'enceinte ne protège pas l'opérateur contre les éclaboussures, la casse ou les erreurs de manipulation,**

2. L'enceinte ne doit pas être utilisée si elle ne fonctionne pas correctement,

3. Le panneau d'observation vitré ne doit pas être ouvert lorsque l'enceinte est en fonctionnement,
4. Pour travailler, on conservera dans l'enceinte le moins possible d'appareils et de matériel. Il ne faut pas bloquer la circulation de l'air dans le volume ou la gaine arrière de l'enceinte,
5. Il ne faut pas utiliser de becs Bunsen dans l'enceinte. En effet, la chaleur dégagée dévierait le flux laminaire et pourrait endommager les filtres. On peut se servir d'un micro-incinérateur mais les anses jetables stériles sont préférables,
6. La totalité des opérations seront réalisées au centre ou dans la partie arrière du plan de travail et devront être visibles par le panneau d'observation,
7. Il faut éviter qu'il y trop de passages derrière l'opérateur,
8. L'opérateur ne doit pas perturber le flux laminaire en passant les bras dans l'enceinte ou en les retirant à plusieurs reprises,
9. Il ne faut pas bloquer les grilles en entassant des notes, des pipettes ou d'autres objets car cela a pour effet de perturber la circulation de l'air et risque d'exposer l'opérateur et le matériel à une contamination,
10. Une fois la manipulation achevée et à la fin de la journée de travail, il faut désinfecter la surface de l'enceinte avec un produit approprié,
11. Le ventilateur de l'enceinte doit continuer à fonctionner au moins 5 minutes après la fin de la manipulation,
12. Il ne faut jamais introduire de papperasse dans une enceinte de sécurité biologique.

II.10. COMMENT EVITER L'INGESTION DE MATERIEL INFECTIEUX ET LE CONTACT AVEC LA PEAU ET LES YEUX

1. Les particules et les gouttelettes de grande taille (>5mm) formées pendant les manipulations de microbiologie se déposent rapidement sur la paillasse et les mains de l'opérateur, aussi celui-ci doit-il porter des gants jetables et éviter de porter ses mains à son visage, à sa bouche et à ses yeux ;
2. Il ne faut pas consommer ou conserver de la nourriture ou des boissons dans le laboratoire ;
3. Il ne faut pas mettre dans sa bouche des objets tels que crayons ou stylos ni mâcher quoi que ce soit lorsqu'on se trouve dans le laboratoire ;
4. Il ne faut pas se maquiller ni porter des longs cheveux non couverts dans le laboratoire ;
5. Il convient d'utiliser un dispositif pour se protéger le visage, la bouche et les yeux (écran facial ou autre) pendant toute opération risquant de donner lieu à des projections de matériel infectieux.

II.11. COMMENT EVITER L'INOCULATION ACCIDENTELLE DE MATERIEL INFECTIEUX

1. Si l'on effectue les différentes manipulations et opérations avec le soin voulu, on peut éviter de s'inoculer accidentellement du matériel infectieux avec des débris de verre, il est préférable de remplacer le verre par du plastique lorsque cela est possible ;
2. Un accident avec des aiguilles ou seringues hypodermiques, des pipettes Pasteur en verre ou du verre brisé peut entraîner l'inoculation de matériel infectieux ;

3. Les piqûres d'aiguille peuvent être évitées : a) en limitant au minimum nécessaire l'utilisation des seringues et des aiguilles (il existe des dispositifs simples qui permettent d'ouvrir les flacons capsulés et d'utiliser alors une pipette plutôt qu'une seringue); b) en utilisant des dispositifs spéciaux de protection lorsque l'emploi d'une seringue est nécessaire ;
4. Il ne faut jamais remettre l'embout sur l'aiguille. Le matériel à usage unique doit être jeté dans des conteneurs spéciaux imperforables (anti-piques) munis d'un couvercle ;
5. On remplacera les pipettes Pasteur en verre par leur équivalent en matière plastique.

II.12. SEPARATION DU SERUM

1. Cette opération ne sera effectuée que par un personnel spécialement formé,
2. Il faut porter des gants ainsi qu'un dispositif pour protéger les yeux et les muqueuses ;
3. Les projections et les aérosols ne peuvent être évités ou réduits qu'au moyen d'une bonne technique. Le sang et le sérum seront pipetés avec soin et non versés d'un récipient dans l'autre. **Le pipetage à la bouche est interdit ;**
4. Après usage, les pipettes seront plongées complètement dans un bain désinfectant approprié. Il faut les laisser tremper pendant une durée suffisante avant élimination ou lavage et stérilisation en vue de leur réutilisation ;
5. Les tubes à échantillons contenant des caillots de sang ou autre et destinés à être éliminés seront rebouchés avec leur capuchon et placés dans un récipient étanche approprié dans lequel ils seront autoclavés et incinérés ;

6. Il faut disposer de désinfectants appropriés pour nettoyer les éclaboussures ou les liquides répandus.

II.13. UTILISATION DES CENTRIFUGEUSES

1. Le bon fonctionnement mécanique des centrifugeuses de laboratoire est un élément indispensable de la sécurité microbiologique.

2. La centrifugeuse doit être utilisée conformément aux instructions du fabricant ;

3. La centrifugeuse sera placée à une hauteur telle que l'opérateur puisse voir à l'intérieur de la cuve pour disposer correctement les godets (ou les pots ou nacelles selon le cas) sur les tourillons ;

4. Les tubes à centrifuger ainsi que les récipients contenant les échantillons devront être en verre épais ou de préférence en matière plastique et ils devront être inspectés avant usage à la recherche de défauts éventuels ;

5. Il faut que les tubes à centrifuger ou les récipients contenant les échantillons soient bien fermés (si possible avec un bouchon vissé) ;

6. Les godets doivent être remplis, équilibrés, fermés et ouverts dans une enceinte de sécurité biologique ;

7. Les pots (godets ou nacelles, etc.) fixés sur les tourillons seront appariés d'après leur poids et correctement équilibrés une fois les tubes en place ;

8. Le volume à laisser libre entre la surface du liquide et le bord du tube à centrifuger doit être indiqué dans les instructions du fabricant,

9. Pour l'équilibrage des pots vides, on utilisera de l'eau distillée ou de l'alcool (propanol à 70 %). Les solutés salins ou les solutions d'hypochlorite sont à éviter car ils corrodent les métaux ;

10. Des pots à centrifuger fermant hermétiquement (pots de sécurité) doivent être utilisés pour les micro-organismes appartenant aux groupes de risque 3 et 4 ;

11. Si l'on utilise des rotors angulaires, il faut veiller à ce que les tubes ne soient pas trop remplis pour éviter le risque de fuite ;

12. L'intérieur de la cuve de la centrifugeuse sera inspecté tous les jours à la recherche de taches ou de souillures au niveau du rotor. En présence de salissures manifestes, les protocoles de centrifugation seront réexaminés ;

13. Les godets (pots ou nacelles) ainsi que le rotor seront inspectés chaque jour à la recherche de signes de corrosion ou de fissures, si fines soient-elles ;

14. Les godets (pots ou nacelles), le rotor et la cuve de la centrifugeuse seront décontaminés après chaque usage ;

15. Après utilisation, les pots seront retournés et conservés ainsi pour que le liquide d'équilibrage puisse sécher ;

16. Des particules infectieuses aéroportées sont parfois éjectées à la centrifugation. Ces particules se déplacent à une vitesse trop élevée pour pouvoir être captées par le courant d'air si la centrifugeuse est placée dans une enceinte de sécurité biologique traditionnelle de classe I ou II à ouverture frontale.

En plaçant la centrifugeuse dans une enceinte de classe III, on évite la trop grande dispersion des aérosols émis par l'appareil. Toutefois, une bonne technique de centrifugation et l'utilisation de tubes soigneusement fermés offrent

une protection satisfaisante contre les aérosols infectieux et les particules en suspension.

II.14. UTILISATION DES HOMOGENEISEURS, DES AGITATEURS SECOUEURS, DES MELANGEURS ET DES GENERATEURS D'ULTRASONS

1. Les homogénéiseurs domestiques (utilisés à la cuisine) ne seront pas utilisés au laboratoire car ils peuvent fuir ou donner lieu à la formation d'aérosols. Les homogénéiseurs, mélangeurs et broyeurs de laboratoire présentent moins de danger ;

2. Les couvercles, bols, fioles ou flacons doivent être en bon état, sans défaut ni déformation. Le couvercle doit être parfaitement adapté et le joint en bon état ;

3. Lorsque les homogénéiseurs, agitateurs ou générateurs d'ultrasons sont en marche, la pression monte à l'intérieur du bol. Des aérosols contenant des germes infectieux risquent alors de s'échapper par l'interstice entre le couvercle et le récipient. Les bols en plastique et particulièrement en polytétrafluoréthylène (PTFE) sont recommandés car le verre peut se briser, libérant le matériel infectieux et risquant de blesser l'opérateur ;

4. Pendant l'utilisation, ces appareils doivent être couverts d'un boîtier transparent robuste en matière plastique qui sera désinfecté après usage. Si possible, on fera fonctionner l'appareil recouvert de son boîtier en plastique à l'intérieur d'une enceinte de sécurité biologique ;

5. L'opération terminée, le conteneur sera ouvert dans une enceinte de sécurité biologique ;

6. Une protection auditive doit être fournie au personnel qui utilise des générateurs d'ultrasons.

II.15. UTILISATION DES BROyeurs DE TISSUS

1. Les broyeurs en verre seront enveloppés dans un tampon de matériau absorbant et tenus par un opérateur ganté. Les broyeurs en matière plastique (PTFE) sont plus sûrs ;
2. Les broyeurs de tissus seront utilisés et ouverts dans une enceinte de sécurité biologique.

II.16. ENTRETIEN ET UTILISATION DES REFRIGERATEURS ET CONGELATEURS

1. Les réfrigérateurs, les congélateurs et les enceintes à dioxyde de carbone solide (carboglace) seront dégivrés et nettoyés périodiquement et les ampoules, les tubes, etc. cassés pendant la conservation, retirés. Il faut porter une protection faciale et des gants en caoutchouc résistants pour effectuer ce travail. Après nettoyage, les surfaces intérieures de l'enceinte seront désinfectées ;
2. Tous les récipients conservés dans les réfrigérateurs, etc. doivent être clairement étiquetés, en indiquant le nom scientifique du contenu, la date de stockage et le nom de la personne qui les a stockés. Le matériel ancien ou sans étiquette sera autoclavé et éliminé ;
3. Il faut tenir un inventaire du contenu des congélateurs ;
4. Les solutions inflammables ne doivent pas être conservées dans un réfrigérateur qui n'est pas **antidéflagrant**. Une étiquette de mise en garde sera apposée à cet effet sur la porte des réfrigérateurs.

II.17. OUVERTURE DES AMPOULES CONTENANT DU MATERIEL INFECTIEUX LYOPHILISE

Il faut prendre des précautions lorsqu'on ouvre des ampoules de matériel lyophilisé car l'entrée brutale de l'air, alors que l'intérieur de l'ampoule peut se trouver à une pression inférieure, risque de disperser une partie de son contenu dans l'atmosphère. Les ampoules doivent toujours être ouvertes dans une enceinte de sécurité biologique. Il est recommandé de procéder comme suit :

- ✓ Décontaminer tout d'abord l'extérieur de l'ampoule ;
- ✓ Faire un trait de lime sur le tube à peu près au milieu du tampon de coton ou de cellulose, le cas échéant ;
- ✓ Envelopper l'ampoule avec de l'ouate imbibée d'alcool pour se protéger les mains avant de la briser au niveau du trait de lime ;
- ✓ Retirer délicatement la partie supérieure et traiter comme du matériel contaminé ;
- ✓ Si le tampon de coton est encore en place au-dessus du contenu de l'ampoule, le retirer avec des pinces stériles ;
- ✓ Mettre le lyophilisat en suspension en versant lentement le liquide destiné à cet effet de manière à éviter la formation de mousse.

II.18. STOCKAGE DES AMPOULES CONTENANT DU MATERIEL INFECTIEUX

Les ampoules contenant du matériel infectieux ne doivent **jamais être immergées dans de l'azote liquide**, les ampoules mal scellées ou fissurées risquant de se briser ou d'exploser à la sortie. S'il est nécessaire d'atteindre des températures très basses, les ampoules ne seront conservées que dans la phase gazeuse, au-dessus de l'azote liquide. On peut aussi stocker le matériel infectieux dans des cryostats ou sur carboglace. Le personnel chargé de retirer les ampoules **cryoconservées** doit se protéger les yeux et les mains. La surface extérieure des ampoules cryoconservées sera désinfectée lorsqu'elles seront retirées après stockage.

II.19. RECOLTE, ETIQUETAGE ET TRANSPORT D'ECHANTILLONS

- ✓ Il faut observer ces précautions d'usage dans tous les cas et porter des gants quelle que soit la manipulation ;
- ✓ Le prélèvement de sang sur des malades ou des animaux doit être effectué par du personnel expérimenté ;
- ✓ Pour les ponctions veineuses, on remplacera la seringue classique par un dispositif de sécurité à usage unique (tube à prélèvement sous vide) qui permet de prélever le sang directement dans un tube de transport ou de culture fermé qui met ensuite l'aiguille automatiquement hors d'usage (par obturation ou rétraction) ;
- ✓ Les tubes devront être placés dans des conteneurs appropriés pour être transportés jusqu'au laboratoire ou dans les locaux mêmes. Les formulaires de demande devront être placés dans des sacs ou des enveloppes séparés résistants à l'eau ;
- ✓ Le personnel qui réceptionne les échantillons ne doit pas ouvrir ces sacs.

II.20. OUVERTURE DES TUBES A ECHANTILLON ET ECHANTILLONNAGE

1. Les tubes à échantillon seront ouverts dans une enceinte de sécurité biologique ;
2. Le port de gants est obligatoire. Il est également recommandé de se protéger les yeux et les muqueuses (au moyen de lunettes à coque ou d'un écran facial) ;
3. Les vêtements protecteurs seront complétés par un tablier en plastique ;
4. Pour éviter éclaboussures ou projections, le bouchon sera saisi avec une feuille de papier ou un morceau de gaze.

II.21. VERRE ET OBJETS TRANCHANTS OU POINTUS

1. Dans la mesure du possible, le verre sera remplacé par du plastique. Seul le verre de qualité « **laboratoire** » (**au borosilicate**) devra être utilisé et le matériel ébréché ou fêlé sera jeté ;
2. Il ne faut pas utiliser des aiguilles hypodermiques en guise de pipettes.

II.22. FROTTIS/GOUTTES EPAISSES

La fixation et la coloration des échantillons de sang, d'expectorations et de selles aux fins d'examen microscopique ne tuent pas obligatoirement tous les micro-organismes ou les virus qu'ils contiennent. Il faut donc manipuler les frottis et les gouttes épaisses avec des pinces, les conserver de manière appropriée et les décontaminer ou les autoclaver avant élimination.

II.23. APPAREILS AUTOMATIQUES (GENERATEURS D'ULTRASONS, AGITATEURS VORTEX)

1. Il faut utiliser des appareils confinés pour éviter la dissémination de gouttelettes ou d'aérosols ;
2. Les effluents seront recueillis dans des récipients fermés pour autoclavage ultérieur et élimination ;
3. L'appareillage doit être désinfecté à l'issue de chaque séance de travail, en suivant les instructions du fabricant

II.24. DECONTAMINATION

Les hypochlorites et les **désinfectants puissants sont recommandés pour la décontamination**. Une solution d'hypochlorite fraîchement préparée doit contenir 1g/litre de chlore actif lorsqu'elle est destinée à l'usage général et 5g/litre si elle est utilisée pour nettoyer du sang répandu. Le glutaraldéhyde peut être utilisé pour décontaminer les surfaces.

II.25. PRECAUTIONS A PRENDRE AVEC DU MATERIEL POUVANT CONTENIR DES PRIONS

Les prions (également désignés sous le nom de « **virus lents** ») sont associés aux **encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST)**.

Lorsqu'on envisage des travaux sur du matériel biologique susceptible de contenir un agent associé à des EST, le choix du niveau de sécurité biologique va dépendre de la nature de l'agent et des échantillons à étudier et il doit se faire en consultation avec les autorités nationales compétentes.

Comme il est difficile d'inactiver complètement les prions, **il convient d'insister sur la nécessité d'utiliser autant que possible des instruments jetables et de prévoir un dispositif de protection également jetable pour couvrir le plan de travail de l'enceinte de sécurité biologique**.

La principale précaution à observer par l'opérateur consiste à **éviter l'ingestion de matériel contaminé** ainsi que toute piqûre cutanée. Ces agents n'étant pas détruits par les procédés habituels de désinfection et de stérilisation utilisés au laboratoire, il convient de prendre les précautions complémentaires suivantes :

1. Il est vivement recommandé d'utiliser des équipements spécialement dédiés à ces travaux, c'est-à-dire qui ne sont pas partagés avec les autres laboratoires de l'établissement ;
2. Le port de vêtements protecteurs (sarraus et tabliers) et de gants (gants d'autopsie complétés par des gants en mailles d'acier) est obligatoire ;
3. Il est vivement recommandé d'utiliser du matériel jetable en matière plastique, qui puisse être traité et éliminé comme déchets secs ;
4. Les appareils automatiques de traitement des tissus ne seront pas utilisés en raison des difficultés de désinfection ; Il est envisageable d'utiliser à la place des bocaux et des béciers ;
5. Toutes les manipulations seront effectuées dans une enceinte de sécurité biologique ;
6. On veillera scrupuleusement à éviter la formation d'aérosols ainsi que les coupures et les piqûres cutanées ;
7. Les tissus fixés au formol seront considérés comme encore infectieux, même après fixation prolongée ;
8. Les échantillons histologiques contenant des prions sont largement inactivés par un traitement de 1h à l'acide formique à 96 % (24) ;
9. Les déchets résultant de la manipulation y compris les gants, les sarraus et les tabliers jetables devront être autoclavés dans un stérilisateur à vapeur pour charge poreuse, à la température de 134–137 °C, soit pendant un seul cycle de 18 minutes, soit pendant six cycles successifs de 3 minutes chacun, puis incinérés ;
10. Les instruments et le matériel non jetable, comme les gants à mailles d'acier par exemple, doivent être rassemblés pour être décontaminés ;
11. Les déchets liquides infectieux contaminés par des prions doivent être traités pendant 1 heure par une solution d'hypochlorite de sodium contenant 20 g/litre de chlore actif (2 %) (concentration finale) ;

12. Les techniques basées sur la vaporisation de paraformaldéhyde ne font pas baisser le titre des prions et ces derniers sont également résistants au rayonnement ultraviolet. Il faut néanmoins continuer à décontaminer les enceintes en utilisant les méthodes traditionnelles (par ex. fumigation au formaldéhyde) pour inactiver les autres agents pathogènes qui seraient présents ;
13. Les enceintes de sécurité biologique et autres surfaces contaminées par des prions peuvent être décontaminées en leur appliquant pendant 1 heure une solution d'hypochlorite de sodium à 20 g/litre de chlore actif (2 %) ;
14. Les filtres à particules de haute efficacité (filtres HEPA) doivent être incinérés à une température minimum de 1000 °C une fois retirés. Avant d'incinérer le filtre, il est recommandé de procéder comme suit :
- ✓ Vaporiser une laque capillaire sur la face exposée du filtre avant de l'ôter ;
 - ✓ b. « **ensacher** » le filtre pour l'enlever ;
 - ✓ Retirer le filtre du volume du travail en veillant à ce que la chambre de distribution et les gaines inaccessibles ne soient pas contaminées.
15. Les instruments doivent être immergés pendant une heure dans une solution d'hypochlorite de sodium à 20 g/litre de chlore actif (2 %), puis bien rincés à l'eau avant l'autoclavage ;
16. Les instruments qui ne peuvent pas être autoclavés peuvent être nettoyés en les trempant à plusieurs reprises pendant 1 heure dans une solution d'hypochlorite de sodium à 20 g/litre de chlore actif (2 %). Un rinçage soigneux est ensuite nécessaire pour éliminer les résidus d'hypochlorite.

II.26. DESINFECTION ET STERILISATION

La connaissance des principes de base de la désinfection et de la stérilisation est d'une importance cruciale pour la sécurité biologique au laboratoire. Comme des objets très souillés ne peuvent pas être désinfectés et stérilisés rapidement, il est tout aussi important de connaître les éléments de base du nettoyage préalable à la désinfection (pré nettoyage). **C'est la nature du travail expérimental et des agents pathogènes manipulés qui détermine les besoins particuliers en matière de décontamination.**

Le temps de contact nécessaire avec un désinfectant donné est propre à chaque substance et à chaque fabricant. C'est pourquoi toutes les recommandations relatives à l'utilisation des désinfectants doivent être conformes aux spécifications indiquées par le fabricant.

II.26.1. DEFINITIONS

Dans le domaine de la désinfection et de la stérilisation on a recours à une terminologie très variée. Les termes suivants sont parmi les plus couramment employés en sécurité biologique :

- ✓ **Anti-infectieux** : Agent qui tue les micro-organismes ou en inhibe la croissance et la multiplication ;
- ✓ **Antimicrobien** : Terme souvent employé comme synonyme d'« **anti-infectieux** » ;
- ✓ **Antiseptique** : Substance qui inhibe la croissance et le développement des microorganismes sans nécessairement les tuer. On applique en général les antiseptiques sur le revêtement cutané ;
- ✓ **Biocide** : Terme général qui désigne tout agent capable de tuer des micro-organismes ;

- ✓ **Décontamination** : Tout processus destiné à éliminer ou tuer des micro-organismes. Ce terme désigne également l'élimination ou la neutralisation de produits chimiques ou radioactifs dangereux ;
- ✓ **Désinfectant** : Substance chimique ou mélange de substances chimiques utilisés pour tuer des micro-organismes, mais pas nécessairement les spores. Les désinfectants sont généralement appliqués sur des surfaces ou objets inanimés ;
- ✓ **Désinfection** : Destruction, par des moyens physiques ou chimiques, de germes mais pas nécessairement de leurs spores ;
- ✓ **Germicide chimique** : Substance chimique ou mélange de substances utilisés pour tuer les micro-organismes ;
- ✓ **Microbicide** : Substance chimique ou mélange de substances chimiques destinés à tuer les micro-organismes. Ce terme est souvent utilisé à la place de « **biocide** », « **germicide** » ou « **anti-infectieux** », dont il est synonyme ;
- ✓ **Sporocide** : Substance chimique ou mélange de substances chimiques destinés à tuer les micro-organismes et leurs spores ;
- ✓ **Stérilisation** : Processus par lequel on tue ou élimine les micro-organismes et les spores de toute nature.

II.26.2. NETTOYAGE DU MATERIEL DE LABORATOIRE

Le nettoyage consiste à **enlever les souillures**, les **matières organiques** et les **taches**. On peut procéder par brossage, aspiration, dépoussiérage à sec, lavage à l'eau ou avec une éponge humide imprégnée d'eau savonneuse ou additionnée d'un détergent. La crasse, les excréments et les matières organiques peuvent abriter des micro-organismes et gêner l'action microbicide des décontaminants (antiseptiques, germicides chimiques ou désinfectants).

Un nettoyage **préalable est nécessaire pour assurer une bonne désinfection** ou une bonne **stérilisation**. Beaucoup de produits germicides ne sont actifs qu'à la condition d'être appliqués à des objets préalablement nettoyés. Ce pré nettoyage doit être effectué avec précaution pour éviter de s'exposer aux agents infectieux.

Il faut qu'il y ait compatibilité chimique entre le matériel utilisé et les germicides qui seront utilisés ultérieurement pour le désinfecter. Il est assez courant d'utiliser le même germicide chimique pour le nettoyage préalable et la désinfection.

II.26.3. GERMICIDES CHIMIQUES

De nombreuses substances chimiques peuvent être utilisées comme désinfectants ou antiseptiques. Chaque préparation doit toutefois être choisie avec soin en fonction des besoins spécifiques du laboratoire, parmi des produits commerciaux toujours plus nombreux et divers.

L'activité germicide de nombreux produits chimiques s'accélère et s'améliore lorsque la température s'élève. D'un autre côté, une température élevée peut provoquer une évaporation plus rapide et entraîner également la décomposition du produit. C'est pourquoi des précautions particulières doivent être prises pour le stockage et l'utilisation de ces produits dans les régions tropicales où leur durée de conservation risque de se trouver réduite en raison de la forte température ambiante.

Beaucoup de germicides peuvent être nocifs pour l'homme et l'environnement. Il faut donc les choisir, les stocker, les manipuler, les utiliser et les éliminer avec le plus grand soin, en respectant les instructions du fabricant. Lorsqu'on prépare des dilutions de germicides chimiques, il est recommandé,

pour des raisons de sécurité individuelle, de porter des gants, un tablier et une protection oculaire.

Il n'est généralement **pas nécessaire** d'utiliser un germicide chimique pour le **nettoyage habituel des sols, des murs, des équipements et du mobilier**. On peut toutefois avoir avantage à le faire dans certains cas, par exemple pour juguler une flambée épidémique.

Une utilisation judicieuse des germicides chimiques contribue à la sécurité du lieu de travail en réduisant le risque de contamination par des agents infectieux. Dans la mesure du possible, on s'efforcera d'utiliser un nombre limité de produits pour faire des économies, faciliter l'inventaire des stocks et réduire la pollution de l'environnement. Ci-dessous, quelques exemples des germicides, les informations générales les concernant et leur mode d'emploi :

- ✓ **Chlore (hypochlorite de sodium)** : Le chlore, un oxydant à action rapide, est un **germicide chimique à large spectre** universellement disponible. Il est généralement **vendu sous forme d'eau de Javel**, une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium (NaOCl) que l'on peut diluer avec de l'eau pour obtenir différentes concentrations de chlore actif. **Comme désinfectant général, on utilisera une solution à 1 g/l de chlore actif. Pour nettoyer un produit répandu qui présente un risque biologique ou en présence de grandes quantités de matières organiques, il est recommandé d'utiliser une solution plus concentrée, contenant 5 g/l de chlore actif.** Les solutions d'hypochlorite de sodium à usage domestique (eau de Javel) contiennent habituellement 50 g/l de chlore actif et doivent donc être diluées au 1 : 50 ou au 1 : 10 avant d'être utilisées, pour obtenir une concentration finale respectivement égale à 1 g/l et 5 g/l. **L'eau de Javel n'est pas recommandée comme antiseptique, mais on peut l'utiliser**

comme désinfectant à usage général et pour faire tremper le matériel contaminé non métallique. En cas d'urgence, elle peut également être utilisée pour désinfecter l'eau de boisson, à la concentration finale de 1 à 2 mg/l de chlore actif. **Le chlore est extrêmement toxique.** Il ne faut donc entreposer et utiliser les solutions d'hypochlorite que dans des locaux parfaitement ventilés. On ne doit pas non plus les mélanger à des acides pour éviter un dégagement rapide de chlore. Nombre de dérivés du chlore peuvent se révéler dangereux pour l'organisme humain et pour l'environnement, aussi faut-il éviter l'usage inconsidéré de désinfectants chlorés, comme l'eau de Javel par exemple

- ✓ **Chloramines** : Les Chloramines existent sous forme de poudres contenant environ 25 % de chlore actif. Dans la mesure où le chlore est libéré plus lentement qu'avec les hypochlorites, la concentration initiale doit être plus élevée pour que l'efficacité soit comparable à celle des hypochlorites. En revanche, **les chloramines en solution sont moins inactivées par les matières organiques que les hypochlorites et elles sont recommandées à la concentration de 20 g/l**, que la situation soit « propre » ou « sale ». Les solutions de chloramines sont pratiquement inodores. Il faut toutefois rincer abondamment les objets qui y ont été plongés pour éliminer tout résidu de l'agent gonflant ajouté aux poudres de chloramines T (tosylchloramide sodique).
- ✓ **Dioxyde de chlore (ClO₂)** : est un germicide, un désinfectant et un oxydant puissant et rapide qui agit à des concentrations plus faibles que le chlore sous forme d'hypochlorite. De tous les oxydants biocides, le dioxyde de chlore est le plus sélectif.
- ✓ **Formaldéhyde (HCHO)** : Est un gaz capable de **tuer tous les micro-organismes, y compris les spores**, aux températures supérieures à

20°C. Par contre, il est inactif contre les prions. L'action du formaldéhyde est relativement lente et nécessite une humidité relative d'environ 70 %.

On peut également l'utiliser comme désinfectant liquide (formol à 5 % dans l'eau). **On suspecte le formaldéhyde d'être cancérigène.** C'est de toute façon un **gaz dangereux**, aux **propriétés irritantes**, doté d'une odeur âcre. Ses vapeurs peuvent irriter les **yeux** et les **muqueuses**.

- ✓ **Glutaraldéhyde** ($\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) : **Est actif contre les bactéries végétatives, les spores, les champignons ou les virus lipidiques et non lipidiques.** Il lui faut toutefois plusieurs heures pour venir à bout des spores bactériennes. **Il est toxique et irritant pour la peau et les muqueuses, aussi faut-il éviter tout contact avec ce composé.** On doit l'utiliser sous une sorbonne ou dans une zone parfaitement ventilée.
- ✓ **Alcools** : L'éthanol (alcool éthylique, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) et le propanol-2 (alcool isopropylique, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) **ont des propriétés désinfectantes similaires.** Ils sont **actifs contre les bactéries végétatives, les champignons et les virus lipidiques mais sans effet sur les spores.** Leur activité contre les virus non lipidiques est variable. Pour que l'efficacité soit maximale, la concentration utilisée doit être voisine de 70 % (v/v) dans l'eau : les concentrations supérieures ou inférieures risquent de ne pas avoir un pouvoir germicide aussi élevé. **Mélangé à d'autres agents, l'alcool est plus efficace que lorsqu'il est seul** : c'est le cas par exemple de l'alcool à 70 % contenant 100 g de formaldéhyde par litre ou de l'alcool contenant 2 g par litre de chlore actif. On peut utiliser une solution aqueuse d'alcool à 70 % pour désinfecter la peau, les paillasses et les enceintes de sécurité biologique ou encore pour y faire tremper de petits instruments chirurgicaux. **Les alcools sont volatils et inflammables aussi ne faut-il pas les utiliser à proximité de**

flammes nues. Les solutions de travail doivent être entreposées dans des récipients appropriés pour éviter l'évaporation. Les alcools peuvent provoquer un durcissement du caoutchouc et dissoudre certains adhésifs.

- ✓ **Peroxyde d'hydrogène et peracides :** Comme le chlore, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée, H₂O₂) et les peracides sont des oxydants énergiques et peuvent constituer de puissants germicides à large spectre. Ils sont également moins nocifs que le chlore pour l'organisme humain et pour l'environnement. **On peut utiliser le peroxyde d'hydrogène pour décontaminer les paillasses et les enceintes de sécurité biologique, et les solutions les plus concentrées peuvent convenir pour la désinfection du matériel médical ou dentaire qui ne supporte pas la chaleur.** Tout objet traité avec ces produits doit être rincé à fond avant d'être mis en contact avec les yeux ou les muqueuses. Le stockage doit toujours se faire à l'abri de la chaleur et de la lumière.

1.26.4. DECONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT LOCAL

La décontamination des locaux du laboratoire, de son mobilier et de son équipement **nécessite l'emploi d'une association de désinfectants liquides et gazeux.** Les surfaces peuvent être décontaminées au moyen d'une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) ; une solution contenant 1 g de chlore actif par litre peut convenir pour l'assainissement général des locaux, mais des solutions plus concentrées sont recommandées en cas de situation à haut risque. Pour la décontamination des locaux du laboratoire, les solutions prêtes à l'emploi contenant 3 % de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peuvent parfaitement remplacer les solutions d'hypochlorite.

I.26.5. LAVAGE ET DECONTAMINATION DES MAINS

Dans la mesure du possible, il faut porter des gants chaque fois que l'on manipule du matériel présentant un risque biologique. **Toutefois, cette mesure ne remet pas en cause la nécessité, pour le personnel de laboratoire, de se laver régulièrement et convenablement les mains. Le lavage des mains est indispensable lorsque l'on a manipulé des animaux ou du matériel présentant un risque biologique ou encore avant de quitter le laboratoire.** Dans la plupart des cas, un lavage soigneux des mains à l'eau et au savon est suffisant pour les décontaminer, mais l'usage de savons germicides est recommandé dans les situations à haut risque. Il faut bien se savonner les mains en **frottant soigneusement** pendant au moins une dizaine de secondes, puis les rincer à l'eau claire et les sécher avec du papier ou une serviette propre (on peut éventuellement utiliser un séchoir à air chaud).

I.26.6. DESINFECTION ET STERILISATION PAR LA CHALEUR

La chaleur est l'agent physique le plus couramment utilisé pour éliminer les germes pathogènes. La chaleur « **sèche** », qui **n'est absolument pas corrosive**, est utilisée pour traiter de nombreux instruments et accessoires de laboratoire qui sont capables de supporter une **température de 160 °C** ou davantage pendant **2 à 4 h**. Le brûlage et l'incinération sont également des formes de traitement par la chaleur sèche

L'autoclavage est la manière la plus efficace d'utiliser la chaleur « **humide** ». **L'ébullition ne tue pas nécessairement tous les micro-organismes et les germes pathogènes**, mais on peut y recourir comme traitement stérilisateur minimum lorsque d'autres méthodes (désinfection ou décontamination chimique, autoclavage) ne sont ni utilisables ni disponibles. Les

objets stérilisés doivent être manipulés et rangés de manière à rester stériles jusqu'au moment de leur utilisation.

1.27. INCINERATION

L'incinération est une méthode utile pour se **débarrasser des carcasses d'animaux, des pièces anatomiques ou autres déchets de laboratoire, avec ou sans décontamination préalable.**

Pour donner **satisfaction**, il faut que **l'incinérateur comporte un dispositif efficace de régulation de la température et une chambre de combustion secondaire.** Un grand nombre d'incinérateurs, notamment ceux qui ne comportent qu'une seule chambre de combustion, ne permettent pas de traiter de manière satisfaisante le matériel infectieux, les carcasses d'animaux et les matières plastiques. En effet la destruction risque de ne pas être totale et l'effluent qui sort par la cheminée peut polluer l'atmosphère du fait de la présence de micro-organismes ou de substances et fumées toxiques. Cela étant, il existe, pour les chambres de combustion, de nombreux types de configuration qui donnent satisfaction, mais **l'idéal est d'obtenir une température d'au moins 800 °C dans la chambre primaire et d'au moins 1000 °C dans la chambre secondaire.**

Les matières et objets à incinérer, même s'ils ont été préalablement décontaminés, doivent être transportés dans des sacs, de préférence des sacs plastiques. Le personnel préposé à l'incinération doit avoir reçu des instructions appropriées concernant le chargement et le réglage de la température de l'incinérateur. A noter que le bon fonctionnement d'un incinérateur dépend très largement d'un panachage judicieux des matières et objets traités.

II.28. CONSIGNES POUR NETTOYER DES PRODUITS REPANDUS

Au cas où du matériel biologique infectieux ou potentiellement infectieux viendrait à être répandu, on appliquera les consignes suivantes :

- ✓ Porter des gants et des vêtements protecteurs, y compris une protection oculaire et faciale, si nécessaire ;
- ✓ Recouvrir le liquide avec des serviettes en tissu ou en papier pour éviter qu'il ne continue à se répandre ;
- ✓ Verser un désinfectant approprié sur les serviettes et la zone environnante (en général une solution d'hypochlorite à 5 % fait l'affaire, toutefois si l'accident survient à bord d'un aéronef, il faut utiliser un composé d'ammonium quaternaire) ;
- ✓ Appliquer le désinfectant par zones concentriques en commençant par les bords du secteur contaminé et en se dirigeant vers le centre ;
- ✓ Au bout d'une durée appropriée (par ex. 30 min), éliminer les produits. En présence de **débris de verre** ou autres **objets pointus ou tranchants**, se servir d'une **pelle** ou d'un **morceau de carton rigide** pour les rassembler et les placer dans un récipient imperforable en vue de leur élimination ;
- ✓ Nettoyer et désinfecter l'emplacement où le liquide a été répandu (si nécessaire, répéter les opérations 2 à 5) ;
- ✓ Jeter les matériaux et produits contaminés dans une poubelle étanche et imperforable ;
- ✓ Une fois la désinfection achevée, informer les autorités compétentes que le site est décontaminé

II.29. ELIMINATION

L'élimination des déchets de laboratoire ou des déchets médicaux est soumise à diverses dispositions réglementaires régionales, nationales ou internationales sur la manipulation, le transport et l'élimination des déchets qui présentent un risque biologique. En règle générale, les cendres extraites des incinérateurs peuvent être traitées comme des cendres domestiques et prises en charge par les services locaux d'enlèvement des ordures. Les déchets autoclavés peuvent être éliminés par incinération sur un site hors de la zone du laboratoire ou enfouis dans une décharge autorisée.

Chapitre III. **GESTION DES RISQUES AU LABORATOIRE**

III.1. DEFINITION

Le risque est la probabilité que survienne une exposition à une substance ou une situation dangereuse (événement) ayant un effet néfaste sur la santé (conséquence).

Bref : **risque = probabilité d'un événement X conséquences**

Risque biologique : il est lié à la présence d'agents biologiques pathogènes en milieu de travail.

Le **travail en laboratoire** impose aux employés des règles de sécurité et de prévention pour limiter les risques biologiques et leur éventuelle propagation. **Sensibilisation et prévention** sont les maîtres mots de la gestion des **risques professionnels** représentés par les travaux en laboratoire.

III.2. EVALUATION DES RISQUES

Le terme « **risque** » est une **fonction de l'éventualité qu'un événement indésirable survienne et les conséquences de cet événement**. Pour assurer la sécurité de la communauté, il est primordial de réduire les risques par divers moyens tels que des mesures administratives, des mesures d'ingénierie, des pratiques et des procédures. Des évaluations des risques sont effectuées à l'égard d'un grand nombre d'éléments du programme de biosécurité, notamment la sécurité du personnel, de la communauté et de l'environnement, les exigences en matière de biosûreté, les besoins en matière de formation et la conformité réglementaire.

Une évaluation du risque est un processus structuré et systématique permettant **d'identifier la nature du risque et de l'analyser** ; cette évaluation devrait servir de base pour gérer le risque ou pour voir comment le diminuer.

Le **travail avec des agents infectieux**, ou du matériel contenant possiblement de tels agents, **doit être évalué pour les risques qu'il pose aux travailleurs**, à la **communauté** et à **l'environnement**. L'évaluation du risque ne doit pas seulement tenir compte de l'agent, mais aussi de l'hôte (travailleur) et de l'environnement (activité/ communauté).

La **biosécurité** dans les installations de laboratoires décrit les principes et pratiques visant à prévenir la dissémination involontaire ou l'exposition accidentelle à des toxines ou des agents biologiques alors la **biosûreté** décrit le contrôle physique de toxines ou d'agents biologiques à l'intérieur de ces installations en vue de prévenir leur perte, leur vol, leur utilisation abusive, un accès non autorisé ou une dissémination intentionnelle non autorisée.

Les **appréciations** des risques servent à **identifier les mesures concrètes de biosécurité et de biosûreté nécessaires** pour contenir et travailler en toute sécurité avec des toxines et des agents biologiques spécifiques dans un laboratoire, une animalerie ou une installation de production. **Cette appréciation repose sur l'identification et la classification des agents pathogènes manipulés** en se basant sur son installation particulière, son infrastructure et l'environnement dans lequel la toxine ou l'agent biologique sera manipulé.

Les **échantillons doivent être prélevés en appliquant des mesures de sécurité biologique et de confinement** appropriées afin de prévenir toute contamination de l'environnement, des préposés aux animaux et du

personnel effectuant les prélèvements ainsi que toute contamination croisée des échantillons eux-mêmes.

Le matériel biologique doit être emballé de façon à contrôler rigoureusement les fuites, puis étiqueté en respectant scrupuleusement les réglementations en vigueur concernant le transport et la réception de ce dernier.

Un **soin particulier** doit être apporté à la **collecte**, au **confinement** et au **stockage** des échantillons, ce qui inclut les mesures de sécurité biologique qui doivent être en place afin de prévenir toute contamination de l'environnement ou toute exposition de l'homme à des matières potentiellement infectieuses.

III.3. GROUPE DE RISQUES

La répartition des matériaux et organismes comportant des risques biologiques par groupe de risque **sert à classer ces derniers en fonction du risque qu'ils présentent pour la santé**. Les facteurs qui déterminent ces groupes de risque sont basés sur les caractéristiques particulières de l'organisme :

- ✓ Sa pathogénicité;
- ✓ Sa dose infectieuse ;
- ✓ Son mode de transmission ;
- ✓ Ses hôtes ;
- ✓ L'existence de mesures préventives efficaces ;
- ✓ L'existence d'un traitement efficace.

Ces classifications présupposent l'existence de circonstances normales dans le laboratoire de recherche ou la culture du micro-organisme en volumes restreints à des fins diagnostiques ou expérimentales. **Les agents biologiques sont classés en quatre groupes en fonction de l'importance du risque**

d'infection qu'ils présentent. Cette classification par groupe de risque n'est applicable qu'aux travaux de laboratoire :

Groupe de risque 1 (risque faible ou nul pour les individus ou la collectivité) Microorganisme qui, selon toute probabilité, ne peut causer de maladie humaine ou animale ;

Groupe de risque 2 (*risque modéré pour les individus, faible pour la collectivité ou la santé publique*) Germe pathogène capable de provoquer une maladie humaine ou animale mais qui ne présente vraisemblablement pas un sérieux danger pour le personnel de laboratoire, la collectivité, le bétail ou l'environnement. Ces agents pathogènes peuvent causer des maladies graves chez l'être humain ou les animaux, mais sont peu susceptibles de le faire.

Une exposition en laboratoire est susceptible d'entraîner une infection grave, mais qui peut être traitée ou prévenue efficacement ; par ailleurs le risque de propagation de l'infection est limité.

Groupe de risque 3 (*risque important pour les individus, faible pour la collectivité ou la communauté*) Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale, et qui peut avoir des répercussions économiques graves mais qui ne se transmet généralement pas d'un individu à l'autre. Il existe un traitement et des mesures préventives efficaces.

Groupe de risque 4 (*risque important pour les individus comme pour la collectivité ou la santé publique*) Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale et peut se transmettre facilement d'un individu à l'autre, soit directement, soit indirectement et dans bien de cas ces germes peuvent causer la mort. Il n'existe généralement ni traitement, ni mesures préventives efficaces.

III.4. PROCESSUS DE L'EVALUATION DES RISQUES

L'évaluation du risque nécessite la prise en compte des aspects relatifs à la biosûreté et à la biosécurité dont les principaux sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Biosécurité	Biosûreté
Revoir les propriétés fondamentales de l'agent Qu'est-ce qui est connu pour cet agent ? Est-il associé à des infections, à de la toxicité, à des allergies ou est-il cancérigène?	Revoir les propriétés fondamentales de l'agent Quel est le potentiel d'un usage malicieux ? Quelles sont les conséquences potentielles d'un usage malicieux?
Situer dans un groupe de risque en biosécurité	Situer dans un groupe de risque d'usage malicieux
Les activités de laboratoires planifiées modifient-elles ces risques	Les activités de laboratoires planifiées ou la menace pour l'environnement modifient-elles ces risques?
Déterminer les mesures appropriées en biosécurité.	Déterminer les mesures appropriées en biosûreté

III.5 RISQUES CHIMIQUES

Le personnel des laboratoires est exposé à des produits chimiques dangereux tout autant qu'à des germes pathogènes. **Il est donc primordial qu'il ait une bonne connaissance des effets dangereux de ces germes pathogènes et ces produits chimiques, de leurs toxicités, de leurs voies d'exposition et des risques que comportent leur manipulation et leur stockage.** On peut obtenir auprès des fabricants ou des fournisseurs des fiches de sécurité chimique ou d'autres types d'information sur les risques de nature chimique. Le personnel des laboratoires où de tels produits sont employés doit avoir accès à cette documentation sous une forme ou une autre, qui peut par exemple être incluse dans le manuel de laboratoire ou le guide d'hygiène et de sécurité.

III.5.1. VOIES D'EXPOSITION

On peut être exposé à des produits chimiques ou à des microorganismes dangereux ou par :

- ✓ Inhalation;
- ✓ Contact;
- ✓ Ingestion;
- ✓ Piqûre d'aiguille;
- ✓ Lésion cutanée.

III.5.2. STOCKAGE DES PRODUITS CHIMIQUES

Il ne faut conserver au laboratoire que la quantité de produits nécessaire pour l'usage quotidien. Les stocks doivent être entreposés dans une réserve constituée d'une pièce ou d'un bâtiment spécialement destinés à cet effet. **Les produits chimiques ne doivent pas être rangés par ordre alphabétique.**

III.5.3. RENVERSEMENT ACCIDENTEL DE PRODUITS CHIMIQUES

La plupart des fabricants de produits chimiques pour laboratoires fournissent des affiches indiquant la conduite à tenir en cas de renversement de divers produits. Ces affiches ainsi que le matériel et les produits à utiliser en pareil cas se trouvent également dans le commerce. Elles devront être apposées bien en vue dans le laboratoire. Le matériel suivant doit également être fourni :

- ✓ Nécessaires pour traiter les produits répandus ;
- ✓ Vêtements protecteurs, tels que gants en caoutchouc épais, surchaussures ou bottes en caoutchouc, masques respiratoires ;
- ✓ Pelles et écopés ;
- ✓ Pincés pour saisir les morceaux de verre ;
- ✓ Serpillières, linges et serviettes en papier ;
- ✓ Seaux ;

- ✓ Carbonate de sodium (Na_2CO_3) ou mono hydrogénocarbonate de sodium (bicarbonate, NaHCO_3) pour neutraliser les acides et les produits corrosifs ;
- ✓ Sable (pour recouvrir les bases répandues) ;
- ✓ Détergent non inflammable

En cas de renversement important d'un produit chimique, procéder de la manière suivante :

- ✓ Prévenir le délégué à la sécurité compétent ;
- ✓ Faire évacuer le personnel qui n'est pas indispensable ;
- ✓ Donner des soins aux personnes qui ont pu être contaminées ;
- ✓ Si le produit répandu est inflammable, éteindre toutes les flammes nues, fermer l'arrivée de gaz dans la salle et les zones voisines, ouvrir les fenêtres (si possible) et débrancher les appareils électriques susceptibles de produire des étincelles ;
- ✓ Eviter de respirer les vapeurs émises par le produit répandu ;
- ✓ Ventiler les locaux en chassant l'air vers l'extérieur, si l'opération est sans danger ;
- ✓ Se procurer le matériel nécessaire pour nettoyer (voir ci-dessus).

III.6. AUTRES TYPES DE RISQUES AU LABORATOIRE

Risque d'incendie

Risques électriques

Bruit

III.7. MINIMISER LES RISQUES DE CONTAMINATION

- ✓ Lorsqu'on manipule des objets à haut risque d'être contaminé (ex : poubelle) il est obligatoire de porter des gants pour les manipuler ;
- ✓ Le sarrau et les gants servent à se protéger. Par contre, nous devons aussi empêcher de contaminer les autres en sortant avec notre sarrau et nos gants à l'extérieur du laboratoire

En tout temps, le lavage des mains est obligatoire avant de sortir du laboratoire.

Chapitre IV. **GESTION DES DECHETS AU LABORATOIRE**

III. INTRODUCTION

On entend par déchets tout ce dont on doit se débarrasser.

La gestion des déchets vise la manipulation, l'élimination sûre et fiable des déchets biologiques produits dans l'installation

Une bonne gestion des déchets garantit la sécurité des patients et des personnels, limite les impacts sur l'environnement et permet de maîtriser le budget d'élimination des déchets.

La gestion des déchets biomédicaux comporte plusieurs étapes : identification, tri, emballage, entreposage et traitement

I. **Identification** s'effectue selon quatre classes :

- ✓ **Les pièces anatomiques humaines (AH)** : Toute partie du corps ou d'un de ces organes, à l'exception des phanères, du sang et des liquides biologiques :
- ✓ **Les déchets anatomiques animaux (AA)** : Un corps, une partie du corps ou d'un de ses organes, à l'exception des phanères, du sang et des liquides biologiques ;
- ✓ **Les déchets non anatomiques infectieux (NAI)** : Boîtes de culture cellulaire infectée, pétris avec bactéries ou tout autre objet potentiellement contaminé par des agents infectieux :
- ✓ **Les objets piquants, tranchants (OPT)** : Tout objet pouvant causer une blessure cutanée et qui a été en contact avec du sang, un liquide ou un tissu biologique ou des agents infectieux. Ils

doivent être disposés dans des contenants rigides prévus à cette fin.

2. Le **tri** à la source des déchets est effectué par le personnel du laboratoire. Une étiquette est jointe au sac pour identifier le local ainsi que la classe du matériel biologique. Il faut séparer les déchets liquides de déchets solides, les déchets biodégradables et non biodégradables.
3. L'**emballage** doit être résistant pour éviter toutes fuites. L'utilisation de sacs doublés est recommandée pour les déchets biomédicaux
4. L'**entreposage** des déchets biomédicaux est fait dans un espace à accès limité et un registre d'entreposage est tenu à jour
5. Le **traitement** des déchets biomédicaux est fait par incinération. Les déchets anatomiques doivent être déposés dans le grand congélateur pour déchets biomédicaux par les manipulateurs et sont éliminés via une firme externe spécialisée et accréditée qui procèdera à leur incinération. Les déchets non anatomiques peuvent toutefois être décontaminés par l'utilisateur. Cependant, il faut s'assurer que la décontamination soit faite de façon efficace

Nb. Le responsable du laboratoire doit s'assurer de la crédibilité et de la compétence des prestataires sollicités pour le traitement des déchets générés dans son installation.

IV. TYPE DE DECHETS PRODUITS AU LABORATOIRE

Au laboratoire, il y a cinq catégories de déchets à considérer :

- ✓ Produits dangereux
- ✓ Contenants de verre
- ✓ Échantillons
- ✓ Déchets non dangereux
- ✓ Matières recyclables

1. **Produits dangereux** : Aucun produit dangereux ne doit être jeté aux égouts ou aux poubelles ; Ceux-ci doivent être éliminés d'une spécialisée dans des contenants particuliers, il est important que les utilisateurs indiquent clairement sur chaque contenant la liste et la concentration des produits et doivent aussi prendre soin de ne pas mélanger des produits incompatibles.
2. **Contenants de verre** : Les contenants de verre vides doivent être placés dans la poubelle prévue à cette fin. Le verre brisé, les pointes de pipette en verre et autres objets coupants doivent être placés dans un contenant en plastique ou en carton pour éviter les blessures à ceux qui auront à les manipuler.
3. **Échantillons** : Pour les échantillons à jeter, on doit aussi se questionner si ce sont des produits dangereux ou pas avant de les éliminer dans des poubelles appropriées.
4. **Déchets non dangereux** : Pour tous les déchets de laboratoire non dangereux, utilisez les poubelles domestiques. **Aucun liquide et produit dangereux ne doivent être jetés dans les poubelles domestiques.**
5. **Matières recyclables** : Dans certains laboratoires, les produits tels que les cartons, papiers, piles, les produits métalliques et ferreux et les matériaux de construction) peuvent être recyclables et pour cela, bien que soient des déchets, ne devraient pas se retrouver dans les poubelles mais plutôt sont stockés dans un endroit approprié et pour des laboratoires ces déchets sont éliminés suivant leur type et nature.

Nb. Le matériel biologique infectieux ou pouvant contenir des agents infectieux (les cultures de micro-organismes, les prélèvements cliniques, etc.) doivent être emballés et transportés de façon à protéger de tout risque d'infection les personnes responsables du transport et à prévenir tout risque de dissémination accidentelle dans l'environnement

ANNEXE

CODE DE BONNES PRATIQUES

Ce code est une liste des méthodes et techniques de laboratoire les plus importantes pouvant constituer la base d'une bonne technique microbiologique. Dans beaucoup de laboratoires ou programmes nationaux relatifs aux laboratoires, ce code peut être utilisé pour mettre par écrit des pratiques et des modes opératoires destinés à assurer la sécurité du travail en laboratoire.

Tout laboratoire doit disposer d'un manuel ou d'un guide (manuel pratique, manuel de bonnes pratiques, guide de sécurité au laboratoire, manuel de sécurité, etc.) dans lequel sont répertoriés les dangers effectifs et potentiels et qui indique comment procéder pour les éliminer ou du moins les réduire au minimum. Les bonnes techniques microbiologiques sont un élément essentiel de la sécurité au laboratoire.

L'emploi d'équipements et d'appareils de sécurité ne sauraient s'y substituer et ne peut intervenir qu'à titre complémentaire. Les principes les plus importants sont indiqués ci-dessous :

Accès

1. Le pictogramme international de danger biologique doit être apposé sur les portes des salles où des micro-organismes appartenant au groupe de risque 2 ou aux groupes supérieurs sont manipulés.



2. Le personnel doit avoir accès en tout temps au **Manuel de biosécurité en laboratoire** ;
3. Il est interdit de boire, de manger, de fumer, de conserver des aliments, des objets ou des ustensiles personnels, de se maquiller et de mettre ou d'enlever des lentilles cornéennes dans le laboratoire. Le port de bijoux n'est également pas recommandé;
4. Les cheveux longs doivent être attachés de manière à ne pas entrer en contact avec les mains, les spécimens, les récipients ou les appareils ;
5. Les blessures ouvertes, coupures, égratignures et écorchures doivent être recouvertes de pansements à l'épreuve de l'eau ;
6. Aucune personne étrangère au service ne doit être autorisée à pénétrer dans les zones de travail du laboratoire ;
7. Les portes du laboratoire doivent rester fermées (cette règle ne s'applique pas aux aires ouvertes à l'intérieur d'un laboratoire) ;
8. Les enfants ne doivent pas être autorisés à entrer dans les zones de travail du laboratoire.
9. Le laboratoire doit être gardé propre et en bon ordre. L'entreposage excessif dans les aires de travail peut nuire lors d'une évacuation et accroître le risque d'accident. Tout ce qui n'est pas relié au travail et qui est difficile à décontaminer (journaux, livres, correspondance) devrait être restreint ; le

travail d'écriture et de rédaction des rapports devrait se faire dans des lieux séparés des zones de manipulation des matériaux et organismes comportant des risques biologiques.

10. Les membres du personnel de même que les visiteurs, stagiaires et autres personnes entrant ou travaillant dans le laboratoire doivent porter des vêtements protecteurs bien fermés et des chaussures à bouts fermés.