



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطلاب الجزائري



Dr Mekkioui Ilhem

L3 Biochimie

FSB-USTHB

2020

Management des laboratoires

Initiation aux Bonnes Pratiques de Laboratoire

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



Objectifs pédagogiques

- Connaître les principales règles d'hygiène et de sécurité
- Prendre en compte les risques dans l'établissement des protocoles techniques (prévention)
- Réagir correctement en cas d'exposition à un risque

Initiation aux Bonnes Pratiques de Laboratoire

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



Objectifs pratiques

- Se protéger
- Protéger les autres
- Protéger l'environnement
- Protéger la qualité des manipulations
- Respecter les réglementations

Les risques ?

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



- Liés à l'environnement de travail
 - Température, bruit, lumière, incendie, ...
- Liés aux manipulations et produits manipulés
 - Risque biologique, toxique, radioactivité, animaux, ...
- Liés aux comportements humains
 - absence de communication, non respect des règles,

Les différents risques

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



- Biologiques
- Chimiques
- Radioactivité
- Froid
- Divers: gaz, électricité, incendie, accident

LES RISQUES BIOLOGIQUES SAHRA MAHILLO AU LABORATOIRE

المصدر الأول للطلاب الجزائري



LES DANGERS LIES AU TRAVAIL DE LABORATOIRE

المصدر الاول للطلاب الجزائري



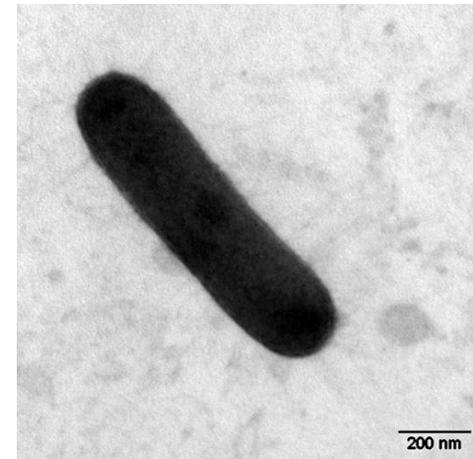
- **BIOLOGIQUE**
- **CHIMIQUE**
- **PHYSIQUE**
- **INCENDIE**
- **ELECTRIQUE**
- **LIES AU LASER**
- **LIES AUX RAYONNEMENTS IONISANTS**

QUELS SONT LES RISQUES?



- **LE RISQUE EST:**

- Agent infectieux ou en partie infectieux
- Présentant un risque pour l'homme, les animaux ou les plantes
- Directement par infection
- Indirectement par perturbation de l'environnement



QUELS SONT LES RISQUES?

Les risques proviennent de la manipulation de:

- **MICRO-ORGANISMES**

- Bactéries
- Virus
- Champignons (+ levures)
- Protozoaires

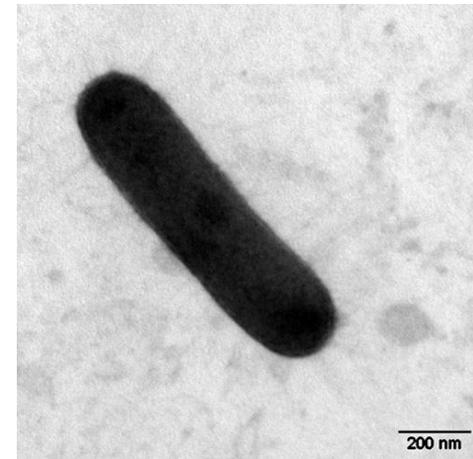
- **O.G.M. (& micro-OGM)**

- **PRION = ATNC**

(Agent Transmissible Non Conventionnels)

- **LIGNEE CELLULAIRE**

(cultures cellulaires humaines
& animales)

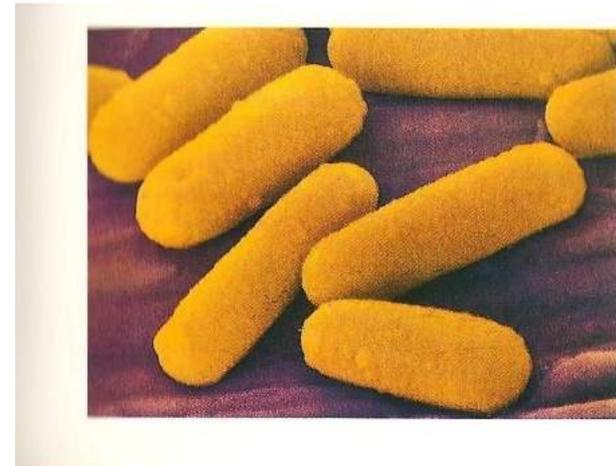
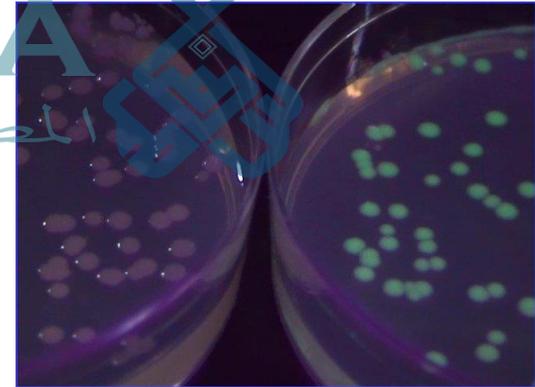


LES AGENTS DE LA CONTAMINATION

• MICRO-ORGANISMES

○ Bactéries

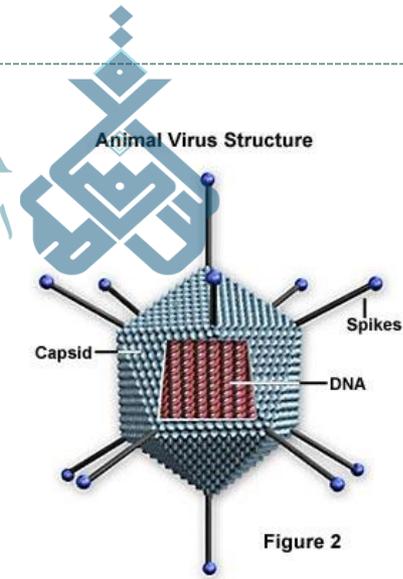
- ✦ Commensale
 - Pneumocoque, colibacille
- ✦ Saprophyte
 - Entérobactéries, Enterocoque, Lactobacilles, Bactéroïdes,...
- ✦ Pathogène
 - Bacille de Koch → tuberculose
 - Salmonella
 - Listeria
 - Légionella
 - Escherichia coli
 - Staphylococcus aureus
 - ...



LES AGENTS DE LA CONTAMINATION

● MICRO-ORGANISMES

- **Virus** (parasite absolu)
 - ✦ Sida, Hépatite B, grippe...
- **Champignon** (moisissures + levures)
 - ✦ mycoses (teigne)
 - ✦ candidoses (Candida albicans)
- **Parasite** (ecto ou endoparasite)
 - ✦ Cestodes (Téniase,...)
 - ✦ Nématodes (Ascaridiose,...)
 - ✦ Protozoaires (Amibiase, Malaria, Toxoplasmose,...)



LES AGENTS DE LA CONTAMINATION

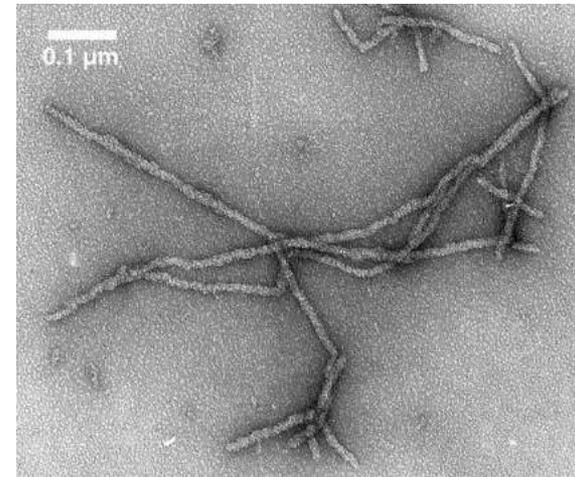
- O.G.M. (& micro-OGM)

- PRION (ATNC)

(constitution protéique dépourvue d'Acide nucléique)

- LIGNEE CELLULAIRE

Cultures cellulaires immortalisées humaines (sang, tissus, organe) ou animales



LES AGENTS DE LA CONTAMINATION

Le risque peut provenir des cellules mais également des techniques liées à leur culture (milieu, immortalisation, quantités utilisées...).

Le risque des lignées est celui d'une réimplantation accidentelle chez le manipulateur induisant ainsi le développement d'une tumeur.

Origine des cellules		Niveau de confinement
Petits animaux de laboratoire (non infectés expérimentalement)		L1
Animaux sauvages (selon l'espèce et l'origine géographique)		L2 minimum
Bovins	tissus nerveux ou lymphoïdes, si statut sanitaire reconnu sans danger	L2
	autres tissus, si statut sanitaire reconnu sans danger	L1
	si soupçon d'encéphalopathie spongiforme	L3
Singes	si contrôles négatifs SIV, Herpès B, hépatites et tuberculose	L2
	si contrôles non faits ou positifs	L3
Hommes	absence de soupçon d'infection par un agent biologique des groupes 3 ou 4	L2
	soupçon d'infection par un agent biologique des groupes 3 ou 4	L3 ou L4

LES DANGERS ou EFFETS DE LA CONTAMINATION

1. **Infestation ou infection**

2. **Toxi-infection**

3. **Allergie**

4. **Implantation d'une tumeur**
(lignée immortalisée)



SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري

LES EFFETS DE LA CONTAMINATION



- **Infestation ou infection:**

- envahissement de l'organisme par des parasites
- + développement des germes pathogènes dans l'organisme



TROUBLES PHYSIQUES

LES EFFETS DE LA CONTAMINATION



- **Toxi-infection:**

Intoxication de l'organisme par des substances chimiques synthétisées par l'agent biologique:

Toxines

LES EFFETS DE LA CONTAMINATION

- **Allergie**

- Origine:

acariens, poils, salives d'animaux, urines, parasites, enzymes, protéines, spores de bactéries ou moisissures ...

- Manifestations:

rhinite, œdème, prurit, troubles asthmatiformes voire choc anaphylactique.

pronostic vital engagé chez les personnes sensibles



LES EFFETS DE LA CONTAMINATION

- **Implantation d'une tumeur**
(lignée immortalisée)

Le potentiel pathogène

D'un agent biologique est lié à 4 facteurs

1. Infectiosité
2. Pathogénicité et virulence
3. Capacité de former des toxines
4. Allergénicité

Le potentiel pathogène



1. Infectiosité

APTITUDES à

- pénétrer (hôte)
- se multiplier (organe / organisme entier)

Le potentiel pathogène



2. Pathogénicité et virulence

- APTITUDE à provoquer des REACTIONS dans l'organisme hôte en s'y multipliant
- Dépend de l'AGENT et de L'HOTE
- Notion de **DOSE INFECTIEUSE** (agent bio.).

Le potentiel pathogène

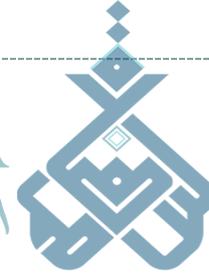
Tableau 1 : Doses infectieuses provoquant la maladie chez 25 à 50 % des personnes (la dose est exprimée en nombre de microorganismes)

Agent infectieux	Maladie	Porte d'entrée	Dose
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	typhus des broussailles	peau	3
<i>Coxiella burnetii</i>	fièvre Q	tractus respiratoire	10
<i>Francisella tularensis</i>	tularémie	tractus respiratoire	10
Rubivirus	rubéole	gorge (gouttelettes)	≥10
		injection sous-cutanée	30
		muqueuse nasale (gouttelettes)	60
<i>Treponema pallidum</i>	syphilis	muqueuse/peau	60
<i>Shigella flexneri</i>	dysenterie	tractus digestif	180
<i>Bacillus anthracis</i>	charbon	tractus respiratoire	≥1300
<i>Salmonella enterica</i> sér. Typhi	typhoïde	tractus digestif	10 ⁵
<i>Vibrio cholerae</i>	choléra	tractus digestif	10 ⁸
<i>Escherichia coli</i>	diarrhée	tractus digestif	10 ⁸
<i>Shigella dysenteriae</i>	dysenterie	tractus digestif	10 ⁹

Le potentiel pathogène

3. Capacité de former des TOXINES

المصدر الأول للطالب الجزائري



1. Sécrétées : **exotoxines**
2. Constitutives : **endotoxines**
3. *Exemples :*

- *SALMONELLOSE = toxi-infection alimentaire (diarrhée, fièvre) provoquée par une toxine thermotolérante qui résiste après destruction des bactéries Salmonelles par la cuisson.*

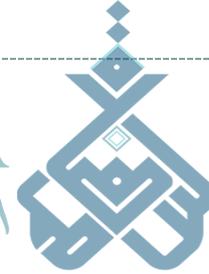
- *AFLATOXINES = mycotoxines d'Aspergillus à haut pouvoir cancérigène.*

- *TETANOS, DIPHTERIE...*

Le potentiel pathogène

4. Allergénicité

المصدر الأول للطالب الجزائري



1. Caractère très largement individuel : sujets sensibles, non sensibles.
2. Aggravation des symptômes
3. Manifestations chroniques augmentant le risque infectieux
 - Spores de *Cladosporium herbarum* : asthme et alvéolite
 - Spores de *Penicillium, fusarium* : effets respiratoires (installations de conditionnement d'air mal entretenues)

Dans quelles activités peut-on se contaminer ?

lors de manipulations

- de microorganismes pathogènes
- d'animaux d'expérimentation
- d'échantillons biologiques
- de cultures cellulaires
- d'O.G.M.

ainsi que lors des opérations :

- d'entretien des locaux
- de maintenance des équipements et du matériel
- de collecte des déchets



SAPHILA MAHLA



المصدر

Quelles sont les personnes exposées ?



- Risque maximal à l'intérieur du local de travail,
- ATTENTION : le risque est **exportable** en dehors de cette pièce, voire en dehors du laboratoire par
 - ✦ **dissémination accidentelle**
 - ✦ **non respect des consignes** de sécurité (blouse, mains,...).

Quelles sont les personnes exposées ?

Par ordre de probabilité décroissante,

- manipulateurs et collègues
(étudiants, personnel technique, enseignants,...)

Mais aussi

- Personnels en charge de l'entretien, de la collecte des déchets, ou de la réparation ou de la maintenance du matériel
- les autres personnes présentes au laboratoire (administratifs), ainsi que les proches (famille) des manipulateurs
- et dans le cas le moins probable, le reste de la population.



EVALUATION DU RISQUE BIOLOGIQUE & CLASSIFICATION

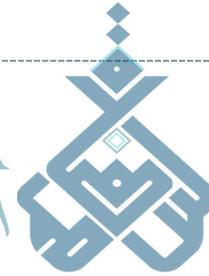
- PRISE EN COMPTE DES FACTEURS SUIVANTS :

- **L'agent biologique :**

- ✦ **type** (virus, bactéries., etc.)
- ✦ **mode de transmission et APTITUDE à provoquer des épidémies**
- ✦ **POTENTIEL PATHOGENE (infectiosité, virulence, dose infectieuse, gamme d'hôtes...)**
- ✦ **effets pathogènes** sur des travailleurs sains
- ✦ Gravité moyenne de la maladie
- ✦ existence de **traitements** efficaces (antibiotiques etc.) contre cet agent.
- ✦ Existence d'une prophylaxie (mesures de prévention)
- ✦ Capacité de survie

- Les **conditions de manipulation** de ces agents : nature & quantité manipulée, matériel utilisé, gestuelle, importance et durée de l'exposition

- La **probabilité** d'être exposé au danger



SAHLAMA HLA
المصدر الأول للطلاب الجزائري

LA CLASSIFICATION DES AGENTS BIOLOGIQUES

SAHLA MAHLA



- Les facteurs précédents permettent de déterminer des **GROUPE DE RISQUES**
- Répartition des organismes en fonction du risque infectieux qu'ils présentent pour la santé individuelle et collective.
- OBJECTIF : choix des mesures de protection (travailleur)
 - 4 groupes de risques définis (Gr. 1, 2, 3 & 4)

LES GROUPES DE RISQUES

- Groupe de risque 1

Risque *faible* pour la personne, *faible* pour la collectivité

- Groupe de risque 2

Risque *modéré* pour la personne, *faible* pour la collectivité

- Groupe de risque 3

Risque *élevé* pour la personne, *faible* pour la collectivité

- Groupe de risque 4

Risque *élevé* pour la personne, *élevé* pour la collectivité

LES GROUPES DE RISQUES

- Groupe de risque 1

Risque *faible* pour la personne, *faible* pour la collectivité

Agent biologique peu susceptible d'infecter une personne saine ou un animal sain.

LES GROUPES DE RISQUES

- Groupe de risque 2

*Risque **modéré** pour la personne, **faible** pour la collectivité*

- Agent pathogène susceptible de provoquer une maladie humaine ou animale,
- Constitue rarement un danger grave pour le personnel de laboratoire, pour la collectivité, pour le bétail ou pour l'environnement.
- L'exposition en laboratoire provoque rarement une infection grave.
- Il existe des mesures préventives et thérapeutiques efficaces,
- Le risque de propagation est limité.

LES GROUPES DE RISQUES

- Groupe de risque 3

Risque *élevé* pour la personne, *faible* pour la collectivité

- Agent pathogène provoquant généralement une maladie humaine grave
- Se transmet rarement par simple contact de personne à personne
- Cause rarement des maladies ne pouvant être traitées par des agents antimicrobiens ou antiparasitaires.

LES GROUPES DE RISQUES

- Groupe de risque 4

Risque *élevé* pour la personne, *élevé* pour la collectivité

- Agent pathogène entraînant généralement une maladie humaine très grave,
- Souvent impossible à traiter,
- Facilement transmissible par simple contact, directement ou indirectement, de personne à personne ou d'un animal à une personne et vice-versa.

GROUPE	DESCRIPTION DU RISQUE	EXEMPLES	NIVEAU de CONFINEMENT
<p>1</p> <p>Risque faible</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de maladie (ind. Sain). - Peu susceptible d'être transmis à l'échelon collectif. 	<p>Escherichia coli K12 Bacillus subtilis Levure (bière), virus polyomyélite, rubéole</p>	<p>L1</p>
<p>2</p> <p>Risque modéré</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Maladie pouvant être sevère et transmissible. -DANGER pour le travailleur - Existence de prophylaxie <u>ET</u> traitement thérapeutiques efficaces. 	<p>Vibrio cholerae, staphylococcus aureus, Listeria, virus de la vaccine, rougeole, hépatite A... Candida albicans, trycophyton</p>	<p>L2</p> 
<p>3</p> <p>Risque fort</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Maladie grave voire mortelle -DANGER sérieux (travailleur) - Transmission limitée : existence d'une prophylaxie <u>OU</u> traitement efficace 	<p>VIH, Virus fièvre jaune, hépatite C, Virus rage, prion <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (tuberculose)</p>	<p>L3</p> 
<p>4</p> <p>Risque majeur</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Maladie mortelle sur le plan individuel et collectif. -DANGER sérieux (travailleur) <u>Aucun</u> traitement connu. <u>Aucune</u> prophylaxie 	<p>Virus de la variole, de la fièvre de Lassa, virus Ebola, Marbourg...</p>	<p>L4</p> 

Risques de Contamination

SAHLA MAHLA



La contamination est la présence d'agents pathogènes dans un milieu donné.

Pour l'homme, elle s'effectue par :

- voie pulmonaire et conjonctivale
- voie cutanée ou cutanéomuqueuse
- voie orale

Risques de Contamination

Voie pulmonaire et conjonctivale : par

المصدر الاول للطالب الجزائري

- Les aérosols (particules solides ou liquides très légères qui sont respirées avec l'air)
- Poussières qui peuvent transporter des micro-organismes, parmi lesquels certains sont pathogènes.

À la paillasse, de nombreux gestes sont générateurs d'aérosols : pipetage, transvasement et mélange de liquide, broyage de tissus, sonication, coupe au microtome, centrifugation, ouverture de tubes, manipulation de litières

Risques de Contamination

Voie cutanée ou cutanéomuqueuse :

المصدر الاول للطالب الجزائري



- contamination se fait soit à travers une peau saine, soit à travers une peau abîmée:

Des microorganismes (Brucella par exemple) peuvent franchir une peau saine ; certains composés chimiques (ex:DMSO) facilitent ce passage.

Une plaie ou une dermatose sont également des voies d'entrée possibles pour un microorganisme pathogène.

- Les piqûres (aiguilles de seringue, pipettes Pasteur),
- Les coupures (verrerie ébréchée, lame de scalpel),
- Les griffures ou morsures d'animaux, sont toutes des occasions de contamination.

Risques de Contamination

Voie orale :

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



lors de pipetage à la bouche, en fumant, en rongant ses ongles ou en suçant ses doigts, ses gants, son stylo ...

RISQUES LIÉS À L'UTILISATION D'OGM

Un **OGM** est un organisme ou un micro-organisme dont le patrimoine génétique a été artificiellement modifié.

Les risques sont évalués **au cas par cas** en fonction de :

- la nature de l'organisme donneur,
- l'hôte,
- le vecteur,
- le fragment d'ADN inséré
- et de leur combinaison,

Il **ne peut pas** y avoir de listes de micro-organismes génétiquement modifiés puisque, en théorie, il y a **une infinité** de possibilités de recombinaisons génétiques.

RISQUES LIÉS À L'UTILISATION D'OGM



Les **niveaux de risques** et les niveaux de confinement correspondants sont analogues à ceux décrits pour les organismes "naturels", bien qu'ils soient baptisés "classes", et répartis en deux groupes :

- **le groupe I** correspond à l'utilisation d'organismes non pathogènes (**classe 1**). Il ne présente aucun danger pour l'individu et l'environnement.
- **le groupe II (classe 2,3 et 4)** correspond à l'ensemble des autres organismes et microorganismes construits, avec un risque croissant allant de **2 à 4**.

RISQUES LIES A L'UTILISATION DU PRION



Prion : Acronyme de « **Protein infection** »

- Les **prions** sont des agents infectieux d'un nouveau type.
- Particules protéiques infectieuses responsables de certaines maladies dégénératives du système nerveux central qui posent de sérieux problèmes de santé mondiale car :

RISQUES LIES A L'UTILISATION DU PRION

SAHLA MAHLA

- Il **n'existe** à l'heure actuelle **aucune thérapeutique**.
- Leur **diagnostic** est **impossible** avant l'apparition de la phase clinique de la maladie.
- Les prions **résistent** à un grand nombre de méthodes habituelles **de désinfection et de décontamination** (chaleur, alcool éthylique, aldéhyde formique, ultraviolets, radiations ionisantes).
- L'agent pathogène semble **franchir la barrière d'espèce**.

PREVENIR LES RISQUES

SAHLA MAHLA



L'essentiel de **la prévention** consiste à :

- Éviter la **pénétration** des agents biologiques dans l'organisme humain
- Éviter leur **dispersion** sur le lieu de travail et dans l'environnement
- En respectant **les gestes**
- Les règles de **confinement** adaptés
- En **inactivant les déchets**.

MESURES TECHNIQUES DE PRÉVENTION

SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطالب الجزائري

Le niveau de sécurité biologique résulte de la conjonction de trois domaines d'actions :

- Les **locaux** et leur **niveau de confinement**.
- Les **matériels** et **équipements**.
- Les pratiques de travail : les règles « **BPL** », la **gestuelle**, la **décontamination**.

LE CONFINEMENT

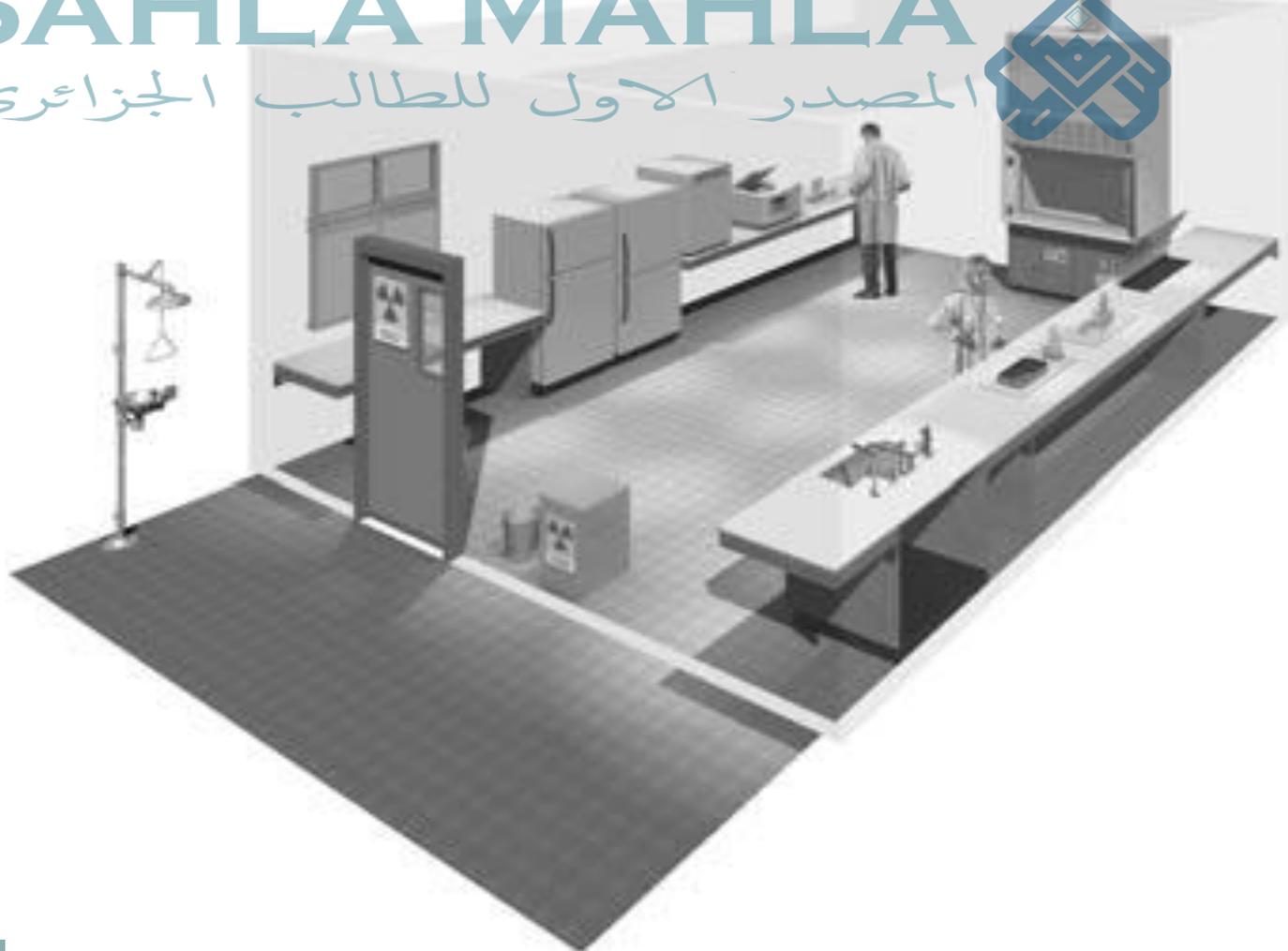
- Ensemble des actions consistant à « *capter le risque au plus près de la source et en empêchant sa dissémination* ».
- Agir à trois niveaux
 - 1^{ère} enveloppe = **le poste de sécurité microbiologique (PSM)**,
 - 2^{nde} enveloppe = les **locaux**,
 - 3^{ième} enveloppe = le **manipulateur** (sa gestuelle, son organisation et son suivi médical).

Niveau de confinement 1

- S'applique au laboratoire de base pour la manipulation des **agents du groupe de risque 1**.
- Le niveau de confinement 1 n'exige aucune caractéristique de conception particulière autre que celles propres aux laboratoires fonctionnels et bien conçus.
- Il n'est pas nécessaire de prévoir des enceintes de sécurité biologique.
- Les manipulations peuvent se faire sur des paillasse à découvert.
- Les pratiques normales des laboratoires de microbiologie de base assurent le confinement nécessaire.

Laboratoire de niveau de sécurité 1

SAHLA MAHLA
المصدر الأول للطلاب الجزائري



Bonnes Pratiques de Laboratoire



1. Les principes de bonnes pratiques dans les laboratoires microbiologiques doivent être appliqués.
2. Pipeter avec la bouche est formellement interdit. Utiliser les pipettes mécaniques (poires, pro-pipettes, pipettes automatique, ...)
3. Les aiguilles de seringues et les canules doivent être utilisées avec précaution pour éviter les accidents. Elles doivent seulement être utilisées en cas d'absolue nécessité et éliminées comme des déchets spéciaux (objets tranchants coupants).
4. La création d'aérosol doit être évité autant que possible.

Bonnes Pratiques de Laboratoire



5. La présence d'aliments, de boissons et de tabac est interdite dans le laboratoire.
6. Les mains sont lavées avant de manipuler et avant de quitter le laboratoire.
7. On porte des vêtements (blouse de travail) uniquement pour le laboratoire
8. Le laboratoire est tenu propre, en ordre et sans la présence de matériel n'étant pas en relation avec le travail.
9. L'identité des souches utilisées est régulièrement contrôlée pour vérifier leur potentiel pathogène.

Bonnes Pratiques de Laboratoire



10. Les cheveux longs doivent être attachés de manière à ne pas entrer en contact avec les mains, les spécimens, les récipients ou les appareils.
11. L'accès au laboratoire est limité au personnel autorisé.
12. Les portes des laboratoires doivent être fermées en tout temps,
13. Les blessures ouvertes, coupures, égratignures et écorchures doivent être recouvertes de pansements étanches.

Niveau de confinement 2

- Manipulation **des agents du groupe de risque 2**.
- Les principaux risques d'exposition associés : l'ingestion, l'inoculation et l'exposition des membranes muqueuses.
- Les agents pathogènes manipulés dans un niveau de confinement 2 ne sont généralement **pas transmissibles par voie aérienne**,
- Il est important **d'éviter la production d'éclaboussures et d'aérosols** (qui peuvent se répandre sur les paillasse et se révéler dangereux pour la santé s'ils sont ingérés après contamination des mains).

Niveau de confinement 2



- Les principaux ***dispositifs de confinement*** sont :
 - ✓ les enceintes de sécurité biologique et
 - ✓ les centrifugeuses à rotors scellés ou munis de godets de sécurité.
- Le personnel doit porter des ***équipements de protection personnels*** appropriés (gants, sarraus, lunettes, etc.).
- Des éviers seront prévus pour se laver les mains.
- Des installations de décontamination (autoclaves) limiteront le risque de contamination environnementale.

Bonnes Pratiques de Laboratoire

Les recommandations suivantes s'ajoutent à celles de la classe 1

1. La zone de travail en classe 2 doit être indiquée avec le sigle « Biohazard ».
2. L'accès au laboratoire est restreint aux personnes désignées par le responsable de projet.
3. Les portes et les fenêtres doivent être maintenues fermées pendant les manipulations.
4. Les mesures suivantes sont prises lorsque le travail peut produire des aérosols :
 - il faut travailler sous une hotte ventilée avec un flux d'air protégeant l'utilisateur
 - les appareils ne doivent pas libérer des aérosols à l'extérieur. Les éventuels gaz libérés doivent passer à travers un filtre HEPA.
5. Des récipients incassables doivent être utilisés pour les prélèvements et les transports. Les échantillons doivent être enfermés durant le stockage et le transport.

Bonnes Pratiques de Laboratoire

6. Les mains seront lavées après avoir manipulés des échantillons infectieux et lorsque l'on quitte le laboratoire. On porte des gants pendant les manipulations.
7. Les surfaces de travail doivent être désinfectées lorsque le travail est terminé.
8. Les appareils en contact avec des agents infectieux seront désinfectés avant de les nettoyer.
9. En cas de renversement de microorganismes pathogènes humains, la zone contaminée sera fermée et décontaminée.
10. On portera des vêtements de protection spécifiques pour le laboratoire (blouses) ; ils seront enlevés en quittant la zone de travail.

Bonnes Pratiques de Laboratoire

11. Les liquides contaminés et les déchets solides seront traités de façon à inactiver le matériel biologique. Ils pourront être traités par exemple en les stérilisant 20 minutes à 121 °C. Une température de 134 °C sera utilisée pour les organismes très stables à haute température et pour les spores.
12. Le laboratoire est tenu propre, en ordre et sans la présence de matériel n'étant pas en relation avec le travail.
13. L'identité des souches utilisées est régulièrement contrôlée pour leur potentiel pathogène.

Niveau de confinement 3



- Manipulation des agents du **groupe de risque 3**.
- Les agents pathogènes sont transmissibles par **voie aérienne**
- Ont souvent une **dose infectieuse faible**, mais suffisante pour provoquer **une maladie grave**, voire **mortelle**.
- Des barrières primaires et secondaires additionnelles limiteront la libération d'organismes infectieux en laboratoire et dans l'environnement.
- Protection respiratoire appropriée, des filtres HEPA pour traiter l'air évacué du laboratoire et un accès strictement contrôlé au laboratoire.

Niveau de confinement 3

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطلاب الجزائري



Bonnes Pratiques de Laboratoire



Les recommandations suivantes s'ajoutent à celles des classes 1 et 2

1. Le laboratoire sera séparé du reste du bâtiment par une zone d'accès contrôlé (accès restreint aux personnes autorisées) avec un double sas. Un système interdira l'ouverture simultanée des 2 portes en même temps, sauf en cas d'incendie.

Bonnes Pratiques de Laboratoire



Les recommandations suivantes s'ajoutent à celles des classes 1 et 2

1. Le laboratoire sera séparé du reste du bâtiment par une zone d'accès contrôlé (accès restreint aux personnes autorisées) avec un double sas. Un système interdira l'ouverture simultanée des 2 portes en même temps, sauf en cas d'incendie.

Bonnes Pratiques de Laboratoire

2. Les surfaces des murs, des planchers et des plafonds seront lisses et faciles à nettoyer.
3. Les personnes travaillant dans la zone de niveau 3 doivent être visibles à travers des fenêtres placées dans les séparations entre les zones



Bonnes Pratiques de Laboratoire



4. Une dépression stable sera réalisée dans les laboratoires où les pathogènes sont manipulés et dans les locaux mitoyens.
5. L'air sortant du laboratoire passera sur un filtre à haute efficacité arrêtant 99,999 % des particules inertes ou vivantes ayant un diamètre supérieur à 0,3 μm .
6. Il n'y aura pas de raccordement au gaz de ville.

Bonnes Pratiques de Laboratoire

7. La manipulation d'échantillons pathogènes doit s'effectuer dans des hottes de sécurité de classe II s'il y a production d'aérosol entraînant un risque d'infection aérogène.



Bonnes Pratiques de Laboratoire

8. Tout matériel contaminé doit être décontaminé avant de sortir du L3 par voie chimique ou par autoclave. Le L3 devra d'ailleurs être équipé d'un autoclave à double entrée.
9. On ne portera que des vêtements destinés au L3 : Blouses à manches longues boutonnées à l'arrière protégeant les vêtements de ville, gants collés sur la blouse, surbottes, éventuellement masque et lunettes. Ces vêtements de protection ne quitteront le L3 que s'ils sont stérilisés.
10. Les membres du laboratoire connaîtront les risques liés au travail en L3 et la conduite à tenir en cas d'accident.

Bonnes Pratiques de Laboratoire

11. Les documents, cahiers de laboratoire, bloc notes seront désinfectés avant leur sortie. Au mieux, ils resteront dans le laboratoire, les informations étant transmises à l'extérieur via un fax ou un ordinateur en réseau.

12. Un téléphone ainsi qu'un bouton d'alarme seront présents dans le laboratoire.

13. Les matériaux biologiques qui sortiront du P3 à l'état viable seront placés dans un récipient incassable et scellé qui sera lui-même placé dans un 2ème récipient incassable et scellé.

Niveau de confinement 4

- Manipulation d'agents transmissibles par **aérosol**
- **Faible dose infectieuse**
- Entraînent des maladies graves, souvent mortelles
- En général aucun traitement ou vaccin n'est disponible.
- Il représente une unité fonctionnellement isolée et, si nécessaire, structurellement indépendante des autres unités.
- Le périmètre du laboratoire sera scellé afin d'isoler complètement l'agent infectieux.
- Le chercheur portera une combinaison de surpression pour être isolé de l'agent pathogène,
- L'agent sera maintenu dans une enceinte de sécurité biologique de niveau 3.
- L'air et les autres effluents produits en laboratoire seront décontaminés.



Niveau de confinement 4

BSL-4 Facilities Worldwide

المصدر الاول للطالب الجزائري

● black: existing BSL-4 (or equivalent) facility
○ white: planned BSL-4 facility

North and South America:
•Winnipeg, Canada
•Hamilton, MT
•Boston, MA
•Frederick, MD
•Richmond, VA
•Atlanta, GA
•Galveston, TX
•San Antonio, TX
•Sao Paulo, Brazil

Europe:
•Lyon, France
•London, England
•Porton Down, England
•Potters Bar, England
•Marburg, Germany
•Hamburg, Germany
•Rome, Italy
•Minsk, Belarus
•Valdeolmos, Spain
•Solna, Sweden
•Mittelhäusern, Switzerland

Africa, Asia and Australia:
•Moscow, Russia
•Novosibirsk, Siberia
•Hyderabad, India
•Bhopal, India
•Taiwan, China
•Tokyo, Japan
•Grahamstown, South Africa
•Franceville, Gabon
•Geelong, Australia
•Melbourne, Australia



Bonnes Pratiques de Laboratoire

- 
1. Des protocoles doivent prévoir toutes les urgences, notamment les détériorations des combinaisons pressurisées, les pannes d'arrivée d'air, le mauvais fonctionnement des douches chimiques et autres urgences.
 2. Tenir à jour un registre de toutes les entrées et sorties du laboratoire de confinement, avec mention des dates et des heures.
 3. Les cultures et les stocks d'agents infectieux doivent être conservés en lieu sûr, à l'intérieur du laboratoire de confinement. Tenir à jour un inventaire des agents pathogènes.
 4. Une vérification quotidienne des systèmes de confinement (flux d'air directionnels, quantité de désinfectant disponible pour la douche chimique, etc) et des équipements de survie (approvisionnement d'air de réserve, etc.) doit être effectuée avant d'entrer en L4.
 5. Le personnel doit retirer ses vêtements de ville et ses bijoux et enfiler une tenue et des chaussures de laboratoire prévues à cette fin avant d'entrer en L4

Bonnes Pratiques de Laboratoire



6. Les employés doivent porter des combinaisons pressurisées qui doivent régulièrement être inspectées (fuites, etc.).
7. Les employés qui portent des combinaisons pressurisées ne doivent pas quitter le laboratoire sans prendre une douche chimique d'une durée appropriée. Les produits désinfectants doivent être adaptés aux agents manipulés, être dilués selon les instructions et fraîchement préparés, le cas échéant. Cette exigence ne s'applique pas aux installations de confinement de niveau 4 utilisant des enceintes de sécurité biologique de classe III.
8. Les employés doivent prendre une douche avant de quitter le laboratoire de confinement.
9. Les appareils ne peuvent sortir du laboratoire de confinement sans avoir été correctement décontaminés.
10. Une personne compétente sera toujours disponible à l'extérieur du laboratoire de niveau 4, prête à intervenir en cas d'urgence, lorsque quelqu'un y travaille.

LES CONSIGNES GÉNÉRALES AFFICHER

SAHLA MAHLA



- Les consignes d'urgence avec les numéros de téléphone,
- Les méthodes de décontamination (avec l'antibiogramme si la souche bactérienne est connue),
- Les consignes d'hygiène personnelle (se laver les mains, ne pas sucer son stylo, ne pas se ronger les ongles, ne pas manger, ne pas fumer, ne pas se maquiller dans le laboratoire, ne porter la blouse que dans le laboratoire,....),
- Il est strictement interdit de pipeter à la bouche dans un laboratoire, pour éviter toute contamination directe par voie orale.

METTRE À DISPOSITION



- Des équipements de protection individuelle éventuellement à usage unique (blouses, gants, surbottes, masques, lunettes....),
- Du matériel à usage unique, des dispositifs de pipetage automatique,
- Des boîtes-tirelires résistantes pour recueillir les aiguilles, les objets tranchants ou coupants,
- Des poubelles adaptées pour entreposer les déchets,
- Des désinfectants appropriés.

POSTE DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE (PSM)

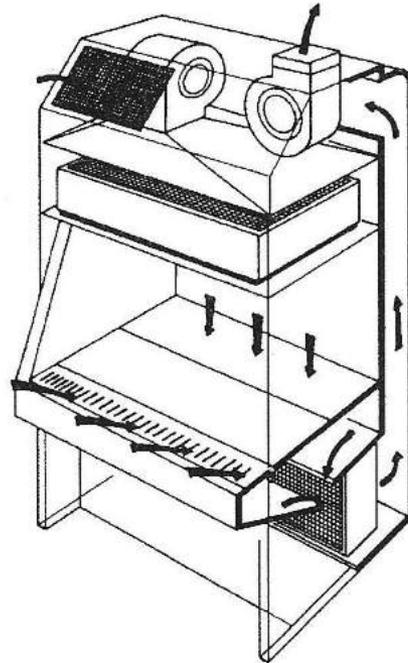
- Le PSM = assure la PROTECTION (est un EPC)
المصدر الاول للطالب الجزائري
- de **l'opérateur**
- et de **son environnement** suivant type PSM (types 1, 2 ou 3)

contre les risques d'une contamination biologique.

- Attention PSM \neq hottes de laboratoire ou postes de travail à flux laminaire horizontal

Fonctionnement du PSM

- Captage par flux d'air
- Filtre HEPA
- Soumis à contrôles réglementaires



Fonctionnement du PSM

- Filtre HEPA
- Le **filtre HEPA** est un filtre à air, acronyme de l'anglais *High Efficiency Particulate Air* signifiant [filtre] à particule aériennes à haute efficacité ; on utilise également l'expression « filtre *THE* » (pour Très Haute Efficacité).
- La dénomination HEPA s'applique à tout dispositif capable de filtrer, en un passage, au moins 99,97 % des particules de diamètre supérieur ou égal à $0,3 \mu\text{m}^2$.

POSTE DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE (PSM)

- TYPE 1 protège

- Environnement (E)

- OPERATEUR (O)
SAUF bras & mains

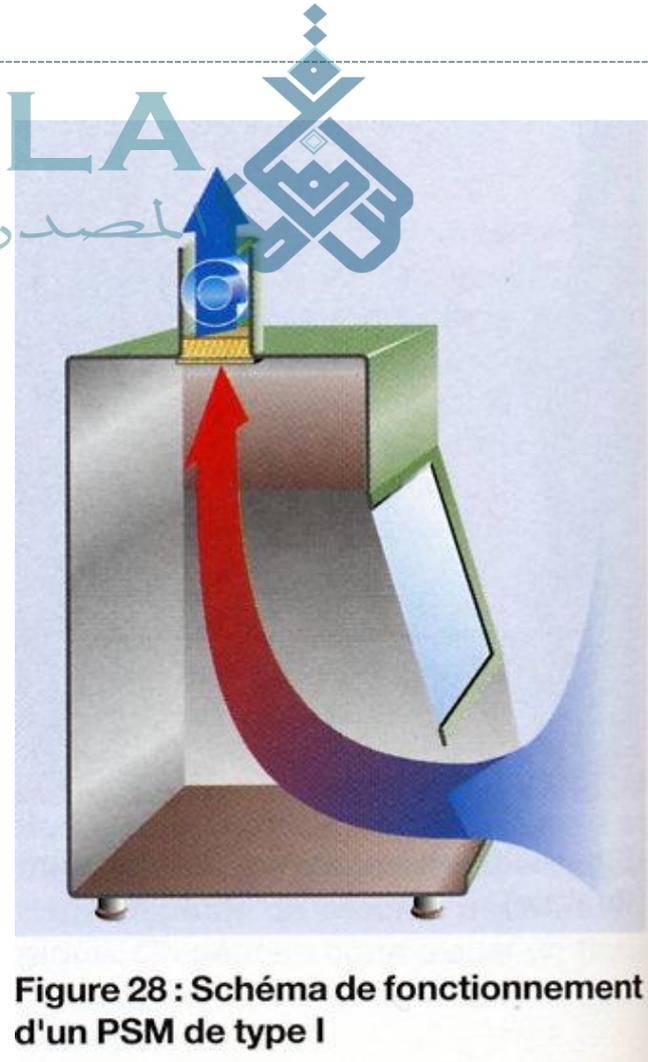


Figure 28 : Schéma de fonctionnement d'un PSM de type I

POSTE DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE (PSM)

- TYPE 2 protège

- Environnement (E)

- OPERATEUR (O)

SAUF bras & mains

- Produits de la Manipulation (M)

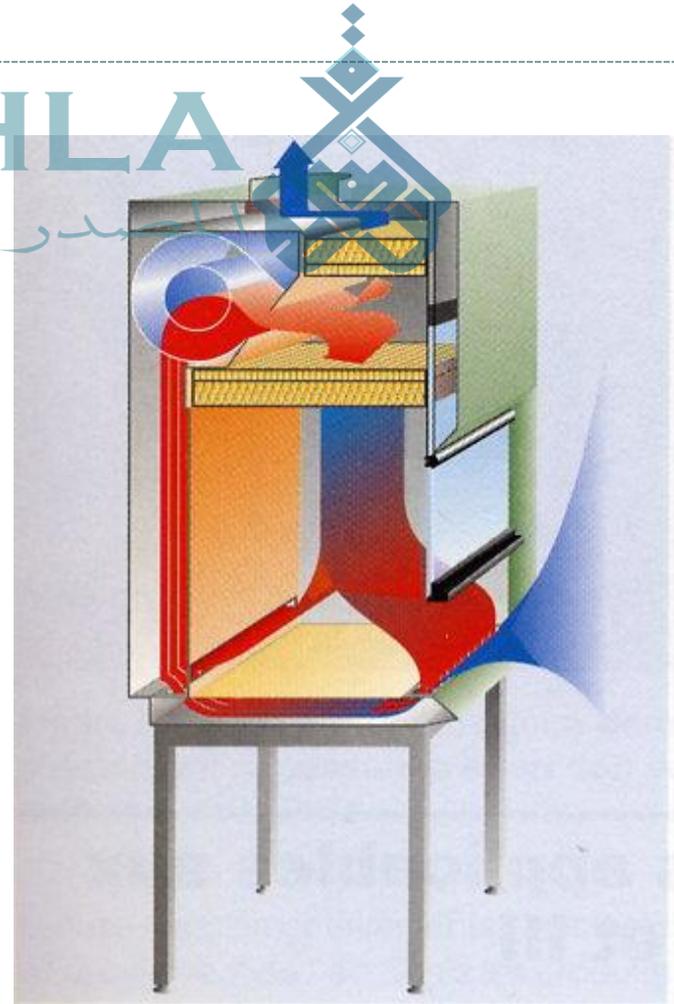


Figure 29 : Schéma de fonctionnement d'un PSM de type II

POSTE DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE (PSM)

- TYPE 3 « boîte à gants » protège

- Environnement (E)

- OPERATEUR (O)
TOTALEMENT

- Manipulation (M)

(T3= système clos en
dépression)

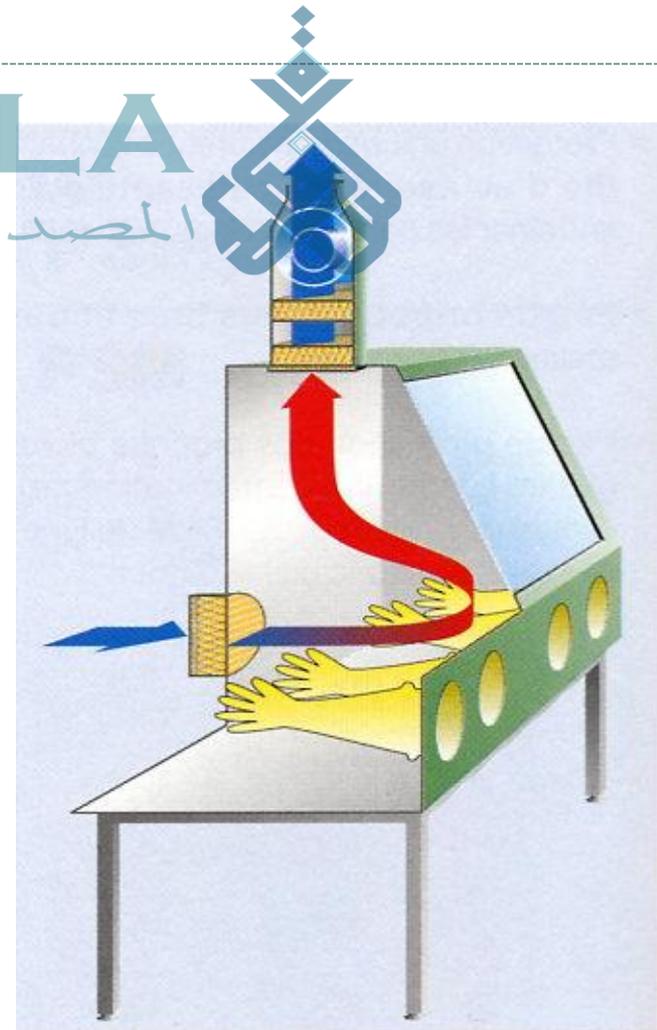


Figure 30 : Schéma de fonctionnement d'un PSM de type III

LA DECONTAMINATION

SAHLA MAHLA



✓ L'un des principes fondamentaux de la biosécurité est :

la décontamination de toutes les matières contaminées avant leur élimination

LA DECONTAMINATION

Cette opération comprend:

- **STERILISATION**

Destruction complète de tous les microorganismes, y compris les spores bactériennes

- **DESINFECTION**

Destruction et élimination de types précis de microorganismes



LA DECONTAMINATION

On décontaminera :

- **Les plans de travail** : quotidiennement en L2, après chaque manipulation en L3 ; ou après un incident de manipulation
- **Les locaux** : après un incident de manipulation ou avant une opération de maintenance par une entreprise extérieure.
- **Le gros matériel** : avant une réparation ou une opération de maintenance par une entreprise extérieure
- **La vaisselle ou du petit matériel souillés** : avant leur lavage

La DECONTAMINATION

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



Deux familles de méthodes :

- **Méthodes PHYSIQUES**
- **Méthodes CHIMIQUES**

La DECONTAMINATION

les méthodes physiques

- Rayonnements UV
- Filtration
- Chaleur sèche
 - Fours Poupinel / Pasteur (160-180°C, 1 à 2 heures)
 - flambage
- Chaleur humide
 - Autoclavage : système clos pressurisé 121°C, 20min.
 - Systèmes ouverts :
 - ✦ Vapeur fluante
 - ✦ Pasteurisation (80°C, 30')

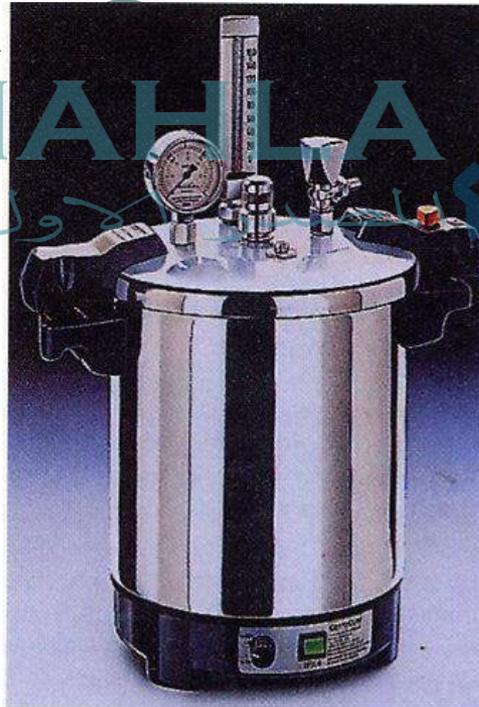


Figure 33 : Exemples d'autoclaves de paille



Figure 34 : Autoclave à double entrée. Chargement du matériel contaminé dans un laboratoire de niveau de sécurité 3



Figure 35 : Autoclave à double entrée. Sortie du matériel stérilisé à l'extérieur du laboratoire de niveau de sécurité 3

La DECONTAMINATION les méthodes chimiques

Les familles :

- Dérivés phénoliques
- Composés tensioactifs
 - Ammonium quaternaires, alkylamine
- Alcools
 - Éthanol, propanol, isopropanol...
- Aldéhydes
 - Formaldéhyde, glutaraldéhyde
- Agents oxydants
 - Peroxyde d'hydrogène, acide peracétique
- Composés halogénés
 - Hypochlorite de sodium



Les Critères de choix

- Spectre action
 - Durée action
 - Concentration efficace
 - Capacité mouillante
 - Stabilité (pH, T°C)
 - Compatibilité chimique
 - Compatibilité matériaux
- Risques
 - Incendie / explosion
 - Santé / environnement

SPECTRE D'ACTIVITE DE QUELQUES DESINFECTANTS

SAHLA MAHLA
الجزائري

	Batéries Gram -	Batéries Gram +	Spores de bactéries	Myco-bactéries	Virus avec enveloppe, lipophiles	Virus sans enveloppe, partiellement lipophiles	Virus sans enveloppe, hydrophiles	Champignons, levures
Aldéhydes	++	++	+	+	+	+	+	++
Alcools	++	++	-	+	+	+	(+)	(+)
Peroxydes	++	++	++	++	++	++	++	++
Halogénés	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Dérivés phénoliques	(+)	(+)	-	+	+	+	(+)	+
Composés cationiques	(+)	+	-	-	(+)	+	-	(+)
Guanidine	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	-
Tensioactifs amphotères	+	+	-	+	-	-	-	+

++ : très efficace

+ : efficace

(+) : efficace dans certaines conditions

- : inefficace

EXEMPLES D'UTILISATION DE DESINFECTANTS

Composés actifs

Domaines d'utilisation

Aldéhydes

formaldéhyde
glutaraldéhyde
glyoxal

désinfection des appareils,
des surfaces et des
liquides

Alcools

éthanol
propanol
isopropanol

désinfection des mains
désinfection des appareils

Composés peroxydes

peroxyde d'hydrogène
acide peracétique
peroxomonosulfate de
potassium

désinfection des surfaces
et des liquides

Ammoniums quaternaires

benzalkonium

désinfection des appareils

Tensio-actifs amphotères

désinfection des appareils

Guanidine

désinfection des appareils

La décontamination par voies chimiques

Eau de Javel

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- L'activité est partiellement inhibée par les protéines (+++) et l'eau calcaire (+)
- Incompatible avec les acides forts, les détergents cationiques, le formaldéhyde en solution concentrée
- Caustique (extrait) ; modérément irritant pour la peau, les yeux et les voies respiratoires (solutions diluées). Port de gants et de lunettes pour la manipulation de la solution concentrée

La décontamination par voies chimiques

Eau de Javel

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



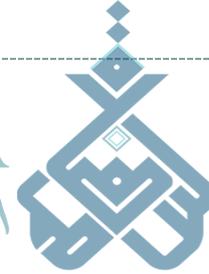
- L'extrait se dégrade avec le temps (vérifier la date de péremption).
- La solution diluée se conserve plus d'une semaine à température ambiante et sans présence des protéines.
- En présence de protéines (par exemple dans un bécher dans lequel on met à tremper des pipettes Pasteur), refaire la dilution deux fois par semaine

La décontamination par voies chimiques

Ethanol

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



- Son action est peu sensible à la présence de protéines.
- Incompatible avec les oxydants forts (dichromates, permanganates, perchlorates, eau oxygénée en solution concentrée), et les hypochlorites (eau de Javel en solution concentrée)
- Irritant pour les yeux
- Utilisation : utiliser une solution aqueuse à 70 % pendant 15 minutes pour décontaminer par exemple les plans de travail ou les pots et rotors de centrifugation

La décontamination par voies chimiques

Glutaraldéhyde

- Son action n'est pas sensible à la présence de protéines;
- Action maximale à pH alcalin, mais le produit se dégrade en moins de deux semaines
- Incompatible avec les bases fortes ou les oxydants forts (permanganates, dichromates)
- Les solutions alcalines de glutaraldéhyde réagissent avec l'éthanol, les cétones, les amines et hydrazines
- Fortement irritant pour la peau, les yeux et les voies respiratoires même en solution diluée.
- Allergisant essentiellement de type cutané (dermatite de contact), mais aussi respiratoire (rhinites, asthme).
- Préparer les dilutions avec des gants et sous sorbonne

La décontamination par voies chimiques

Glutaraldéhyde



Utilisation :

- S'utilise surtout sur du matériel métallique (ne supportant pas la javel) ou le matériel non autoclavable.
- Employer une solution de glutaraldéhyde 2%, bicarbonate de sodium 0,3%, en trempage au minimum pendant 15 minutes, et 2 heures au moins s'il s'agit d'inactiver des spores.
- Opérer par trempage dans un bac avec couvercle et sécher dans un local bien ventilé ou sous sorbonne