

# Risques infectieux au laboratoire de microbiologie et leur maîtrise

Amel ELFRAY RHIM

*Laboratoire Régional de la Santé Publique de Monastir*

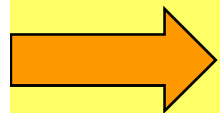
XI<sup>ème</sup> Journée Régionale d'Hygiène  
Hospitalière de Bizerte  
1<sup>er</sup> Décembre 2007

# Introduction

- Apparition de nouvelles pathologies et leur diffusion à une population de plus en plus nombreuse (SIDA et l'hépatite C)
- Recours plus fréquent aux examens biologiques

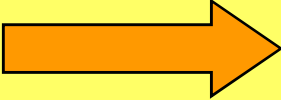
# Introduction

- Les recrudescences de pathologies:
  - autrefois en déclin (la tuberculose, la diphtérie)
  - inquiétantes par leur mode de transmission (les fièvres hémorragiques africaines)
  - posant encore trop d'inconnues (les encéphalopathies à prions)



faire le point sur la sécurité en laboratoire

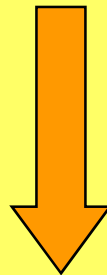
# Introduction

- Le risque biologique  le risque infectieux
- Confrontation entre l'organisme et la multitude d'agents pathogènes

# Risque microbiologique

- De très nombreux microorganismes sont susceptibles d'être présents dans les échantillons biologiques manipulés que ce soit ceux qui font l'objet de l'examen ou que ce soit des germes co-infectants un prélèvement destiné au diagnostic d'une autre affection

- Les caractéristiques de l'agent biologique,
- sa virulence
- son mode d'entrée
- son interaction avec les défenses du sujet



l'apparition d'une pathologie.

# CRITERES DE CLASSIFICATION DES AGENTS PATHOGENES

Groupes	Pathogénécité Chez l'homme	Danger pour le travailleur	Propagation dans la collectivité	Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace	Exemples
1	Non	--	--	--	<i>Lactobacillus</i>
2	Oui	Oui	Peu probable	Oui	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , salmonelles, virus de la grippe....
3	Oui	Oui	Possible	Oui	<i>Salmonella Typhi</i> , VIH, VHB.....
4	Oui	Oui	Risque élevé	non	Variole, virus de la fièvre hémorragique

# Mode de transmission

- La connaissance des voies de transmission est indispensable à l'appréhension des dangers.
  
- Les micro-organismes peuvent contaminer
  - Par voie respiratoire
  - par voie digestive
  - Par voir cutanée ou cutanéomuqueuse

# Contamination par voie respiratoire

- C'est la principale voie d'entrée des agents biologiques, mais aussi la plus insidieuse, qu'elle se fasse par aérosols inhalés ou par ingestion accidentelle.

# Contamination par voie respiratoire

- Réulte de l'inhalation de particules infectieuses véhiculées par les aérosols
- Les aérosols sont des gouttelettes de liquide ou de fines particules solides, détachées d'un produit sous l'action de forces mécaniques

# Contamination par voie respiratoire

- Les aérosols: générés par les centrifugeuses non fermées ou ouvertes avant leur arrêt complet, ou les vortex à tubes non bouchés

# Aerosols

- Rupture de films liquide à l'orifice d'un flacon, extrémité d'une pipette ou au contact d'une anse d'ensemencement
- Mélange gaz-liquide occasionné par l'agitation d'une culture, d'une éprouvette

# Aerosols

- Flambage d'anses d'ensemencement en métal, le passage d'un récipient à la flamme provoque sous l'effet de la chaleur la vaporisation « explosive » de liquides résiduels.
- L'explosion d'une goutte qui tombe sur une surface engendre la formation de gouttelettes secondaires

# Aerosols

- Les forces centrifuges et les vibrations des centrifugeuses sont une source importantes de production d'aérosols.
- Les matériels desséchés, sous forme de lyophilisats, de concrétions adhérents à des dispositifs d'obturations

# Aerosols

- Des résidus de cultures séchant sur des surfaces s'ils sont grattés
- L'ouverture de récipients sous vide (cultures lyophilisées)

# Aerosols

- Plus une particule est petite, plus le mouvement est rapide et plus le risque d'aérosolisation est important.
- Mal quantifiable
- Virulence difficile à établir.
- Mode le plus fréquent en laboratoire.

# Contamination par voie digestive

- Toujours due à une défaillance dans les mesures d'hygiène individuelle ou à des erreurs techniques.

# Contamination par voie digestive

- Accidentelle à la suite d'un pipetage à la bouche dont la pratique doit être formellement proscrite tant pour les solutions chimiques que pour les liquides biologiques.

# Contamination par voie digestive

- Indirecte par portage à la bouche d'objets souillés (stylos, gants, cigarettes...) ou de mains souillées (gestes réflexes, onychophagie..)

# Contamination par voie digestive

- De façon plus courante, par consommation de boissons ou d'aliments contaminés ( sur les paillasses, les réfrigérateurs du laboratoire, ou au contact des mains souillées...)

# Contamination par voie cutanéomuqueuse

- Elle se décompose en trois catégories :
  - **Effraction cutanée**
  - **Projection sur la peau saine**
  - **Projection sur une muqueuse ;**

# Contamination par voie cutanéomuqueuse

- Inoculation à l'occasion d'une effraction cutanée accidentelle: piqûre ou coupure par aiguille, lame, éclat de verre brisé, ainsi que morsures ou griffures dans les animaleries.

## Contamination par voie cutanéomuqueuse

- Projections ou contact direct cutané sur peau lésée ( plaies, excoriation, lésions d'eczéma...) voire sur peau saine pour certaines bactéries qui peuvent traverser la peau( *Brucella*, leptospires)

# Contamination par voie cutanéomuqueuse

- Projection sur les muqueuses, en particulier sur les muqueuses oculaires qui sont très perméables aux transmissions infectieuses du fait de leur forte vascularisation, et dont la désinfection efficace est plus difficile.

# Contamination par voie cutanéomuqueuse

<i>virus</i>	<i>Risque de transmission après</i>		<i>Risque selon le type de liquide</i>		
	exposition cutanée	contact muqueux ou peau lésée	Prouvé	Possible	Nul
<b>VHB</b>	<b>2-40 %</b>	non quantifié mais > VHC et VIH	sang et liquides + sang	sperme, sécrétions vaginales, salive	urines, selles
<b>VHC</b>	<b>2.1 %</b>	non quantifié mais plausible	sang	liquides contenant du sang, sperme, sécrétions vaginales, salive	urines, selles
<b>VIH</b>	<b>0.32 %</b>	0.04%	sang et liquides + du sang	sperme, sécrétions vaginales, LCR, liquide pleural, amniotique	salive, urines

# Circonstances d'exposition au travail

Les personnels de laboratoires de microbiologie:

- Les plus sensibilisés aux risques infectieux en raison de la nature même de leur travail d'identification et de caractérisation des micro-organismes.
- Contraints de protéger les prélèvements qu'ils manipulent d'une contamination secondaire
- Ont une « culture » du risque biologique

# Circonstances d'exposition au travail

1. La réception, l'enregistrement et le tri des prélèvements sont les premières circonstances d'exposition à l'arrivée des échantillons biologiques
  - Etats des tubes , des pots:
    - Modalités de remplissage et de fermeture
    - Fragilités
  - Conditionnement pour le transport
    - Pochettes étanches transparentes à double compartiment pour le bon d'analyse

# Circonstances d'exposition au travail

## 2. Les opérations de centrifugation et décantation

- Sécurité de cette étape dépend :
  - Centrifugeuses et de la compatibilité des tubes de prélèvements avec les nacelles
  - Possibilité de centrifuger dans les tubes primaires
  - Remplissage des tubes et des bouchons

# Circonstances d'exposition au travail

## 4. La manipulation de verrerie incluant les pipettes Pasteur....

- Techniciens
- Aide de laboratoires
- Agents de laverie

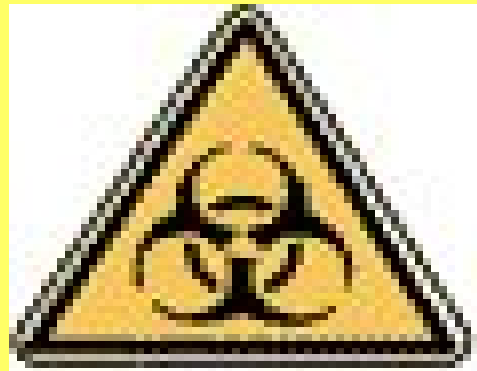
# Circonstances d'exposition au travail

## 3. Les opérations de distribution des échantillons aux différentes pièces techniques

- Risques de collision et de chutes avec les plateaux et les portoirs
- Risques d'autant plus grand que les zones de circulation sont étroites, encombrées et segmentées par des portes

# RISQUES

## STRATEGIE DE MAITRISE DES



# STRATEGIE DE MAITRISE DES RISQUES BIOLOGIQUES

- Les moyens de prévention mis en œuvre au sein du laboratoire, lorsqu'ils respectent les recommandations très strictes existant dans ce domaine, diminuent aujourd'hui considérablement le risque biologique.
- Leur observance doit être le souci de chacun.

# Les niveaux de confinement biologiques

- Les directives internationales se fondent, pour les consignes d'aménagement des laboratoires, sur le principe d'un confinement graduel:
  - Empêcher la dissémination de l'agent biologique dans le milieu de travail
  - Empêcher sa transmission aux travailleurs
  - Limiter sa propagation accidentelle dans l'environnement.

# Les niveaux de confinement biologiques

- Il existe trois niveaux de confinement (P2, P3 et P4) à rapprocher de la classification des agents pathogènes des groupes 2, 3 et 4.
  
- Les mesures techniques concernent :
  - la conception du laboratoire ;
  - les aménagements internes ;
  - les pratiques opératoires.

---

# Règles générales de bonnes pratiques au laboratoire

---

## Règles générales de bonnes pratiques au laboratoire

- **Quel que soit le niveau de sécurité et les postes de travail considérés, un certain nombre de règles sont applicables dans tous les cas.**
- **Ces mesures sont appliquées de façon systématique par toute personne présente dans un laboratoire**

# Règles générales de bonnes pratiques au laboratoire

- Le principe essentiel est d'éviter le contact entre les agents biologiques et l'homme par les mesures générales d'hygiène d'une part et par des mesures techniques d'autre part.

# Construction et aménagement des locaux

- **L'organisation du laboratoire doit permettre la distinction formelle entre les secteurs propres (secrétariat, bureaux, zone de repos....) et les secteurs exposés où sont manipulés des produits biologiques et matériels souillés avec ou sans sas selon le niveau de protection requis**

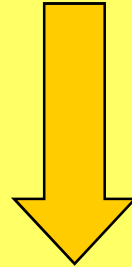
Appliquer les règles universelles de sécurité

Considérer tout prélèvement comme potentiellement contaminé

## PRELEVEMENTS

Conditionnements appropriés  
Étanches s'ouvrant facilement

Accompagnées de leur bons d'examens sous pochette protectrice



## LABORATOIRE

**Secteurs non exposés**

(Secrétariat, bureaux, salles de repos)

## CLOISONNEMENT ET LIMITATION D'ACCES

**Secteurs exposés**

Où il ne faut ni boire ni fumer ni se maquiller

# Les mesures générales d'hygiène

- **Port d'une blouse fermée en tissu non inflammable, propre, couvrante ; en particulier, les manches sont longues afin de protéger les avant-bras. Cette blouse est réservée au laboratoire ; aucun effet civil ne doit dépasser de la tenue.**

# Les mesures générales d'hygiène

- **La blouse peut être complétée d'un pantalon qui améliore la protection.**
- **Elle est changée quotidiennement.**  
**L'entretien de la tenue professionnelle est assuré par l'hôpital.**
- **Avoir les cheveux attachés et les ongles courts et sans vernis.**

# Les mesures générales d'hygiène

- Ne porter aucun bijou aux poignets ou aux doigts, y compris l'alliance.
- Ne rien porter à la bouche : ni chewing-gum, ni objets, crayons et stylos, par exemple.
- Ne pas boire, manger, en dehors des locaux réservés.

# Lavage des mains

**Le lavage des mains est réalisé au minimum :**

- **en début et en fin de journée de travail et avant de quitter le laboratoire**
- **après avoir enlevé les gants car, sous les gants, la flore transitoire se multiplie rapidement**
- **à la fin d'une manipulation réalisée à la paillasse**

# Lavage des mains

- **chaque fois qu'une souillure des mains est constatée**
- **sans oublier l'hygiène de base à respecter lors de tous les gestes quotidiens : avant et après le repas, le passage aux toilettes, tout éternuement ou mouchage.**

# Les mesures techniques

- Les règles générales à appliquer :
  - Ne jamais pipeter à la bouche
  - Utilisation des moyens de protection individuelle (gants, lunettes, masques,...) lorsqu'ils sont nécessaires. La liste de ces situations doit être établie et connue de tous.
  - Choix du matériel adapté et conforme, en limitant dans la mesure du possible le matériel coupant et piquant.
- Certaines manipulations nécessitent de travailler sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM)\* adapté au risque.

# Les mesures techniques

## Poste de sécurité microbiologique (PSM)

- Un PSM est un poste de travail destiné à assurer la protection de l'opérateur et de l'environnement contre les dangers liés aux aérosols lors de la manipulation de substances biologiquement actives, infectées ou dangereuses.
- Il existe trois types de PSM en fonction des objectifs de protection souhaités :

PSM I	PSM II	PSM III
<p><b>protection du manipulateur</b></p> <p><b>protection de l'environnement</b></p> <p>le produit manipulé n'est pas protégé</p> <p><b>Exemple : hotte aspirante pour les coprocultures</b></p>	<p><b>protection du manipulateur</b></p> <p><b>protection de l'environnement</b></p> <p><b>protection du produit manipulé</b></p> <p><b>Exemple : hotte à flux laminaire vertical pour la culture de <i>M. Tuberculosis</i></b></p>	<p><b>protection du manipulateur, totalement en dehors de l'enceinte dans laquelle est manipulé le produit.</b></p> <p><b>protection de l'environnement.</b></p> <p><b>protection du produit manipulé.</b></p> <p><b>Exemple : enceinte étanche pour la culture du VIH</b></p>

# Désinfection des paillasse et du matériel

**Le nettoyage et la désinfection de la paillasse et des matériels réalisés par l'opérateur avant et après chaque manipulation.**

**Protocoles rédigés et affichés concernant la périodicité et les circonstances des opérations.**

# Désinfection des paillasses et du matériel

## l'entretien standard

- **Nettoyage avec un agent tensioactif dilué selon les recommandations du fabricant suivi d'un rinçage à l'eau.**
- **Le détergent puis l'eau sont appliqués à l'aide de matériaux à usage unique qui sont ensuite éliminés avec les déchets à risque infectieux.**

# Désinfection des paillasses et du matériel

- Désinfection avec de l'eau de javel à 1,2 degrés chlorométriques, fraîchement préparée ou un produit détergent désinfectant. La solution est appliquée à l'aide d'un papier absorbant et laissée en contact pendant 10 minutes au minimum.
- Rinçage à l'eau si nécessaire et laisser sécher.

# Désinfection des paillasses et du matériel

- Dans le cas d'une contamination accidentelle, un protocole de désinfection spécifique doit être mis en œuvre.
- Pour ces opérations d'entretien, l'opérateur doit se protéger : port de gants

# La prévention médicale du risque biologique

- **La surveillance médicale spéciale:**
  - **Appréciation du médecin de travail**
  - **Au minimum annuelle**

# La prévention médicale du risque biologique

## ■ La prophylaxie vaccinale

- Afin d'assurer la prophylaxie de certaines maladies infectieuses, le personnel des laboratoires d'analyses médicales est soumis à l'obligation vaccinale contre :

- le tétanos
- la poliomyélite
- la diphtérie

- l'hépatite B
- la tuberculose

## **La vaccination implique:**

- **La responsabilité de l'employeur**
- **La responsabilité du médecin du travail: il assure les vaccinations à l'embauche puis un suivi à intervalles réguliers du calendrier vaccinal.**
- **La responsabilité du salarié**

# Conclusion

- **La sécurité et l'hygiène aux laboratoires ne sont pas un projet ponctuel.**
- **C'est un état d'esprit à instaurer, un processus continu à entretenir, étayé par des supports réglementaires et l'implication de toutes les parties concernées:**
  - encadrement et référents au sein du laboratoire
  - Unité d'hygiène

---

□ CLIN

- **L'application rigoureuse des règles d'hygiène et de comportement permet de**
  - **diminuer les accidents survenant au laboratoire et les infections contractées par le personnel,**
  - **participe à la qualité de la réalisation des examens biologiques.**
- **Le personnel de laboratoire doit être correctement vacciné et doit savoir agir en cas d'accident.**

---

Merci pour votre attention

---

# STRATEGIE DE MAITRISE DES RISQUES BIOLOGIQUES

- La sécurité et la protection de la santé au travail font désormais partie intégrante de l'assurance qualité des examens de laboratoire (GBEA)
- Implication de la hiérarchie et tous les acteurs concernés.

---

## L'évaluation des dangers relatifs à chaque microorganisme nécessite de connaître:

- Le degré de virulence
- La dose infectante
- Les critères de viabilité, de survie à l'extérieur de l'hôte
- La résistance à la dessiccation, aux ultrasons, aux UV et aux désinfectants.

# Les niveaux de sécurité biologique

## ■ Indice composite basé sur:

- Le type d'organisation
- Le mode de construction
- Les moyens de confinement
- L'appareillage du laboratoire
- Les pratiques et modes opératoires à observer pour travailler sur des agents appartenants aux divers groupes de risques

# Les niveaux de sécurité biologique

## ■ **Indice composite basé sur:**

- Le type d'organisation
- Le mode de construction
- Les moyens de confinement
- L'appareillage du laboratoire
- Les pratiques et modes opératoires à observer pour travailler sur des agents appartenants aux divers groupes de risques

---

# Règles générales de bonnes pratiques au laboratoire

- **Les travaux entrepris par les laboratoires sont souvent routiniers et le personnel peut être enclin en raison de l'accoutumance à sous-estimer le danger et s'exposer ainsi à des accidents classiques dont les conséquences peuvent être beaucoup plus graves**

## Résumé des mesures à appliquer en fonction des niveaux de sécurité

MESURES	Niveaux de sécurité		
	2	3	4
CONCEPTION DES LOCAUX			
Signalisation par le pictogramme « risque biologique »	oui	oui	oui
Séparation zone de sécurité/reste des locaux		oui	oui
Fenêtres	Fermées pendant le travail	verrouillées	Étanches anti-effraction
Accès réglementé	Autorisation nécessaire	Accès limité par sas	Accès par sas limité aux opérateurs
Hygiène et décontamination des personnes *lavabo (à commande non manuelle)	oui	Oui + dans sas	Oui dans chaque pièce + dabs
*douche		optionnelle	oui

## Résumé des mesures à appliquer en fonction des niveaux de sécurité

MESURES	Niveaux de sécurité		
	2	3	4
Possibilité de fermeture hermétique à des fins de désinfection	optionnel	recommandé	oui
Filtration HEPA ■ De l'air extrait ■ De l'air entrant	- -	Oui optionnelle	Oui par double filtre oui
Dispositif permettant d'observer les occupants	optionnel	recommandé	oui
Maintien du local en dépression	-	oui	Oui avec gradient
Équipements spécifiques			
Postes de sécurité microbiologique ou équivalents	oui	oui	Oui PSM type III
Manipulation des matériels et animaux infectés en PSM ou système de confinement adapté	optionnel	Oui	oui
Surfaces imperméables à l'eau et faciles à nettoyer	Surfaces de travail	Surfaces de travail et sols	Toutes surfaces exposées
Surfaces résistantes aux acides, bases, solvants et désinfectants	recommandé	oui	oui
Autoclave	Dans le laboratoire ou le bâtiment	Dans l'unité	Autoclave à double entrée dans le local

## Résumé des mesures à appliquer en fonction des niveaux de sécurité (2)

	Niveaux de sécurité		
	2	3	4
<b>MESURES ORGANISATIONNELLES</b>			
Disponibilité de méthodes de désinfection spécifiques	oui	oui	oui
Stockage des agents biologiques en lieu sûr	oui	oui	Oui accès protégé
Lutte efficace contre les vecteurs potentiels (rongeurs, insectes, etc.)	recommandé	oui	oui
Collecte et inactivation des effluents avant rejet	Non exigé	oui	oui
Élimination de la biomasse	inactivation	Inactivation dans l'unité	Cuve d'inactivation avec contrôle d'efficacité

# Lavage des mains

La finalité du lavage des mains est :

- **De protéger l'opérateur d'un risque de contamination** par les liquides biologiques en éliminant les souillures présentes sur les mains et la flore transitoire, acquise lors du contact avec des objets ou des surfaces souillés.
- **De protéger certaines préparations d'une contamination externe**

# Les mesures techniques

- Une attitude réfléchie permet d'optimiser la gestion du temps et de l'espace et contribue à la sécurité.
- Il est important d'organiser le plan de travail et de réunir tout le matériel et les réactifs afin d'éviter ensuite des déplacements inutiles

# Filière d'élimination

- **Piquants tranchants :**

**ils sont éliminés dans des conteneurs jette aiguilles.**

**Le conteneur plein doit être verrouillé et éliminé sans aucune manipulation complémentaire dans le circuit des déchets à risque infectieux à incinérer.**

# Filière d'élimination

- **Tubes à essais en verre réutilisables contaminés :**  
ils sont autoclavés par du personnel de la laverie avant d'être nettoyés.
- **Boîtes de Pétriensemencées et tout le matériel jetable contaminé :**  
jetés dans des sacs plastiques rouges.  
Ces sacs hermétiques sont autoclavés avant de suivre le circuit des déchets à risque infectieux à incinérer.

## **Exemple de protocole de désinfection de paillasse après souillure accidentelle avec un liquide biologique.**

- **Verser un agent tensioactif en évitant les projections.**
- **Essuyer de l'extérieur vers l'intérieur à l'aide d'un papier absorbant éliminé ensuite avec les déchets infectieux.**
- **Verser de l'eau de javel à 3 degrés chlorométriques (un litre de javel 12°Cl plus trois litres d'eau) en recouvrant largement la zone contaminée.**

## Exemple de protocole de désinfection de paillasse après souillure accidentelle avec un liquide biologique

- **Laisser agir 15 minutes.**
- **Essuyer de l'extérieur vers l'intérieur à l'aide d'un papier absorbant éliminé ensuite avec les déchets à risque infectieux.**
- **Pratiquer ensuite un cycle complet de nettoyage - désinfection de la paillasse.**



Photo : Bruno Grandbastien, CHRU de Lille



Photo : Bruno Grandbastien, CHRU de Lille

Bijoux : avant tout geste d'hygiène des mains

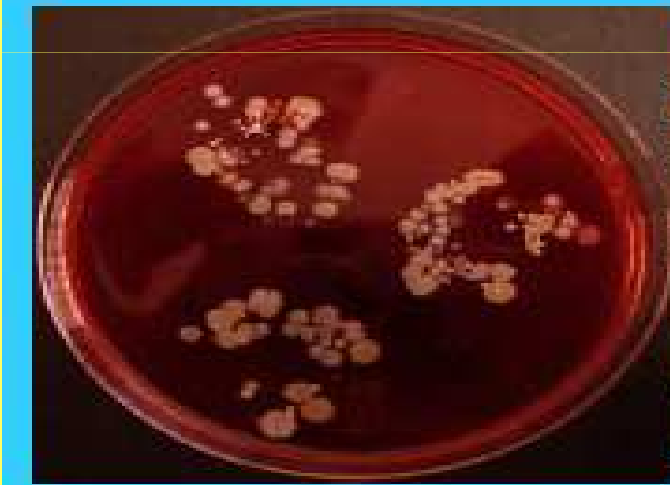


Photo : Bruno Grandbastien, CHRU de Lille

Bijoux : lavage au savon doux

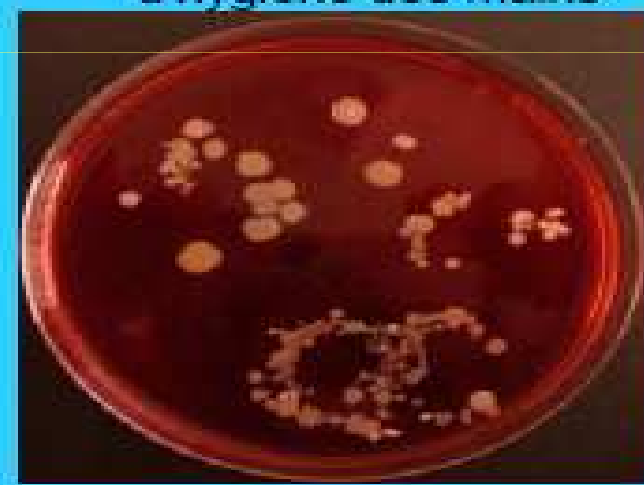


Photo : Bruno Grandbastien, CHRU de Lille

Bijoux : friction SHA



Photo : Bruno Grandbastien, CHRU de Lille



Alliance : avant tout geste d'hygiène des mains



Photo : Bruno Grandbastien, CHRU de Lille

Alliance : lavage au savon doux



Alliance : friction SHA

## **Exemple de protocole de désinfection de pailleuse après souillure accidentelle avec un liquide biologique.**

**A chaque fois que du matériel biologique infectieux ou potentiellement infectieux est renversé accidentellement sur la pailleuse :**

- **Délimiter la zone contaminée.**
- **Mettre des gants.**
- **Absorber le maximum à l'aide d'un papier absorbant éliminé ensuite avec les déchets à risque infectieux.**