

1. Consignes générales

Mesures générales de sécurité

(OPTM, art. 8)

L'employeur est tenu de prendre, pour assurer la sécurité et la santé des travailleurs contre les risques liés aux microorganismes, toutes les mesures commandées par l'expérience, applicables en l'état de la technique, et adaptées aux conditions données.

Il est notamment tenu:

- a.** de choisir les microorganismes présentant le potentiel de risque le plus bas possible;
- b.** de veiller à limiter au niveau le plus bas possible le nombre de travailleurs utilisant des microorganismes ou exposés à de telles entités;
- c.** de définir des processus de travail et des mesures techniques de façon à éviter ;
- d.** le plus possible la propagation de microorganismes sur le lieu de travail;
- e.** de fixer les procédures concernant la prise, l'utilisation et le traitement d'échantillons d'origine humaine ou animale;
- f.** d'établir des plans à mettre en œuvre pour combattre et réduire le dommage en cas d'accidents et d'incidents mettant en jeu des microorganismes;
- g.** de collecter, de stocker et d'éliminer les déchets de telle façon que les travailleurs ne soient pas mis en danger.

Il doit prendre des mesures de protection collectives ou, si cela est impossible ou seulement partiellement possible, des mesures individuelles. Il veille en particulier à ce que:

- a.** des équipement et vêtements de protection appropriés soient mis à la disposition des travailleurs;
- b.** les équipements de protection nécessaires soient placés correctement dans un endroit déterminé, vérifiés et nettoyés si possible avant et, en tous les cas, après chaque utilisation, et à ce qu'ils soient réparés ou remplacés avant toute nouvelle utilisation, s'ils sont défectueux;
- c.** les vêtements de travail et équipements de protection personnels qui ont éventuellement été contaminés par des microorganismes soient enlevés lorsque le travailleur quitte la zone de travail et rangés à l'écart des autres vêtements, avant que ne soient prises les mesures prévues à la lettre d;
- d.** les vêtements de travail et équipements de protection personnels qui ont éventuellement été contaminés par des microorganismes soient nettoyés et, au besoin, désinfectés.

Il doit veiller, par des mesures d'hygiène, à ce que les travailleurs intéressés ne soient pas mis en danger et à ce que des microorganismes ne soient pas transmis à des personnes hors

du lieu de travail. Il fera par ailleurs en sorte que les travailleurs disposent d'installations sanitaires appropriées, comprenant les produits de nettoyage et moyens de décontamination nécessaires.

Il doit en outre signifier aux travailleurs qu'il est interdit de manger, de boire, de fumer, de priser ou d'utiliser des produits cosmétiques dans les locaux où ils risquent d'être contaminés par des microorganismes pathogènes, et il veille à ce que cette interdiction soit respectée. Les denrées alimentaires ne doivent pas être entreposées dans de tels locaux.

Mesures de prévention

Un certain nombre de mesures préventives peut être pris pour limiter les risques d'accident.

Citons notamment :

- a. La formation des collaborateurs, formation à la fois théorique (connaissance de base en matière de sécurité biologique) et formation pratique aux bonnes pratiques de laboratoire. Cette formation devra être réactualisée et répétée ;
- b. L'installation d'équipements techniques appropriés (p.ex. poste de sécurité microbiologique PSMII ou PSMIII selon les besoins) ;
- c. L'aménagement de locaux confinés ;
- d. La fourniture d'équipement adapté de protection individuelle (EPI), p.ex. blouse, gants, lunettes, ... ;
- e. La mise en place de mesures de prévention médicale (visite d'aptitude, vaccination, surveillance médicale, ...)
- f. La mise en place d'un plan d'entretien des appareils et des équipements, ainsi que d'un programme de nettoyage, désinfection des locaux et poste de travail.

Bonnes pratiques de laboratoire

A chaque classe de risque correspond un certain nombre de mesures de précaution qui doivent être appliquées.

Mesures de sécurité générales

(OUC, art. 10, al. 2 et tableaux 1 à 4 annexés à l'OUC)

En fonction du type d'installation et de la classe d'activité, les mesures de sécurité suivantes correspondant aux niveaux de sécurité 1 à 4, doivent être prises en plus des mesures générales.

Mesures du tableau n°	Type d'installations ou sont effectuées les activités
1	Laboratoires de recherche et de développement, analyses de matériel clinique
2	Locaux de culture et en serres
3	Unités réservées à des animaux
4	Installations de production

Les mesures de sécurité doivent correspondre aux techniques actuelles en matière de sécurité.

Extrait du tableau 2 : mesures applicables aux activités effectuées dans les laboratoires de recherche et de développement

Mesures de sécurité	Niveau de sécurité		
	1	2	3
Bâtiment			
Zone de travail séparée	--	--	+
Zone de travail étanche pour fumigation	--	--	(+)
Panneau de risque biologique	--	+	+
Limitation de l'accès à la zone de travail	--	+	+
Accès via un sas	--	--	+
Fenêtre de sécurité pour observation du laboratoire	--	--	+
Pression atmosphérique inférieur dans le laboratoire	--	--	+
Filtration HEPA de l'air entrant et sortant	--	--	+ (air sortant)
Equipement			
Surfaces résistantes aux acides, aux bases, aux solvants et aux désinfectants	+ (paillasse)	+ (paillasse)	+ (paillasse et sol)
Poste de sécurité microbiologique	--	(+)	+
Mesures de sécurité			
Mesures contre la formation des aérosols	--	+ (minimiser)	+ (empêcher)
Autoclave	--	+ (dans le bâtiment)	+ (dans le laboratoire)
Douche	--	-	(+)
Organisation du travail			
Tenue spéciale dans la zone de travail	+ (blouse)	+ (blouse)	+ (vêtement de protection)
Gants	--	+ (si contact inévitable)	+

Désinfection régulière des postes de travail	--	+	+
Inactivation des microorganismes dans les effluents des éviers, des canalisations et des douches	--	--	(+)
Inactivation des microorganismes du matériel, des déchets et des appareils contaminés	-- (élimination inoffensive)	+	+

Un certain nombre de restrictions existe pour les obligations présentées dans ce tableau. Consulter les annexes de l'OUC et de l'OPTM pour plus de détails.

Mesures de classe 1 = Niveau de sécurité biologique 1 = P1

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.
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.
10. Pour tout autre information, consulter la guide de la CFSB (Commission fédérale de sécurité biologique).

Mesures de classe 2 = Niveau de sécurité biologique 2 = P2

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.
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 et rangés dans un endroit séparés des vêtements de ville.
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 (1,2 bar). Une température de 134 °C (1,5 bar) 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. Les accidents seront rapportés immédiatement à la personne en charge de la sécurité biologique (BSO), qui prendra les initiatives appropriées, p. ex. appeler un médecin... Un protocole doit être établi.
14. L'identité des souches utilisées est régulièrement contrôlée pour leur potentiel pathogène.
15. Pour tout autre information, consulter le guide de la CFSB.

Mesures de classe 3 = Niveau de sécurité biologique 3 = P3

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.
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
4. Une dépression stable (6 mm de colonne d'eau) 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 , y compris pour les sorties de vide.
6. Il n'y aura pas de raccordement au gaz de ville, ni système de vide centralisé.
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.
8. Tout matériel contaminé doit être décontaminé avant de sortir du P3 par voie chimique ou par autoclave. Le P3 devra d'ailleurs être équipé d'un autoclave à double entrée.
9. Un programme de lutte contre les insectes et les rongeurs sera effectué par le personnel lui-même ou après décontamination du local si l'opération est réalisée par des personnes ne manipulant pas des germes pathogènes ou qui ne sont pas surveillés médicalement.
10. On ne portera que des vêtements destinés au P3 : 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 P3 que s'ils sont stérilisés.
11. Les membres du laboratoire connaîtront les risques liés au travail en P3 et la conduite à tenir en cas d'accident.
12. 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.
13. Un téléphone ainsi qu'un bouton d'alarme seront présents dans le laboratoire.
14. 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 2^{ème} récipient incassable et scellé.

Mesures de classe 4 = Niveau de sécurité biologique 4 = P4

Ce niveau ne se rencontrant pas dans nos hautes écoles, il ne sera pas développé ici.

Il nécessite des infrastructures, des protocoles et une formation particulières.

Recommandations pour le travail avec des cultures de cellules

(CFSB, août 1999)

Le travail avec des cultures de cellules primaires devrait généralement être effectué dans des mesures de sécurité de la classe de risque de l'activité 2. Après repiquage, on peut travailler avec une lignée cellulaire dans des mesures de sécurité de la classe de risque de l'activité 1, mais uniquement si elle a été testée au préalable et qu'on a pu prouver qu'elle ne contient aucun agent pathogène pour l'homme ou l'animal, conformément aux recommandations pour la production de vaccins, et si le but de l'expérience permet le travail dans des mesures de sécurité de la classe de risque de l'activité 1. Le travail dans des mesures de sécurité de la classe de risque de l'activité 1 peut aussi être envisagé dans le cas de lignées classiques très bien caractérisées et largement utilisées, telles que CHO, Vero et Hela. Dans des laboratoires où l'on manipule des agents pathogènes susceptibles d'infecter les cellules, cet allègement des mesures de sécurité ne devrait toutefois pas être envisagé.

Il incombe aux chefs/cheffes de projet d'obtenir l'information concernant la source de la culture cellulaire primaire, qu'elle soit humaine ou animale, afin d'évaluer le risque de contamination par des agents pathogènes justifiant d'un niveau de sécurité supérieur au niveau de sécurité 2 (p. ex. pour le VIH). Il leur incombe également de déterminer si les conditions de culture sont susceptibles de permettre à ces agents pathogènes de se propager.

Il incombe aux responsables de la sécurité biologique et à la CFBS de répondre aux questions et d'aider les chefs/cheffes de projet de l'expérience à définir les mesures de sécurité à appliquer dans des cas particuliers.

Ces recommandations se basent sur les considérations suivantes:

La plupart des tests diagnostiques et des protocoles de recherche mettant en œuvre des cellules eucaryotes sont actuellement conduits dans des mesures de sécurité conçues pour protéger les échantillons des contaminations externes (notamment en utilisant les postes de sécurité microbiologique de classe II). Aujourd'hui, cette approche peut être qualifiée de bonne pratique de laboratoire parce qu'elle permet d'éviter, par exemple, une contamination par des mycoplasmes. En appliquant quelques précautions supplémentaires simples, ces mesures peuvent être reclassées en mesures de sécurité de la classe de risque de l'activité 2 à part entière.

Il n'existe aucun indicateur clinique ou microbiologique simple permettant de garantir l'absence de tout agent pathogène dans les cellules primaires d'un organisme vivant. De nombreux agents pathogènes pour l'homme ou l'animal peuvent présenter un risque pour les travailleurs. La mise en œuvre de batteries de tests visant à exclure ces agents pathogènes peut s'avérer très coûteuse et ne se justifie que lorsque les cellules sont destinées à être utilisées à grande échelle à des fins industrielles.

Les conditions de culture dans lesquelles s'effectue une expérience donnée ne favorisent que la réplication d'un nombre limité d'agents pathogènes.

La situation des lignées cellulaires ou des clones dérivés de cellules primaires ne diffère pas fondamentalement de celle des cellules primaires. Les connaissances concernant une lignée cellulaire progressent en fonction du temps écoulé depuis son explantation, de sorte que la probabilité que la lignée puisse être contaminée diminue. Il faut toutefois toujours garder à l'esprit qu'il existe un risque de contamination accidentelle.

Il est difficile d'établir une différence qualitative nette entre le diagnostic et la recherche. Pour de nombreux agents pathogènes, il existe une recoupe entre la quantité (nombre ou concentration) d'organismes pathogènes utilisés dans les protocoles de diagnostic et les protocoles de recherche. La probabilité d'être en présence d'agents pathogènes quels qu'ils soient est toutefois plus grande lorsqu'on travaille dans le domaine du diagnostic qu'en recherche.

Texte intégral : Elaboré par la CFSB avec le concours d'autres experts; mai 1998/août 1999 http://www.efbs.admin.ch/uploads/media/f-richtlinie-zellkulturen-1999_01.pdf

Autres commentaires concernant les cultures cellulaires

La probabilité de pénétration, d'intégration et de division de cellules en culture suite à un accident est un risque difficile à évaluer. Pour cette raison, les cellules d'origine humaine, mais également simienne, devront être traitées comme un échantillon biologique à risque.

Extrait de « Risques biologiques », 2002 1ère éd, CNRS

<http://www.sg.cnrs.fr/cnps/guides/risquebio.htm>