

Les bonnes pratiques Microbiologiques et le confinement

Version (2017)

Bureau de la dirigeante principale de la gestion des risques

uOttawa.ca



uOttawa

Le travail avec des microorganismes nécessite l'utilisation de bonnes pratiques microbiologiques et de principes de confinement. Ces termes sont souvent mal utilisés et mal compris. La description la plus simple de ces termes est la suivante :

- les bonnes pratiques microbiologiques sont utilisées pour s'assurer que les microorganismes manipulés restent dans « l'éprouvette », sans que d'autres organismes ne puissent s'y introduire et contaminer le travail;
- les principes de confinement sont aussi utilisés pour s'assurer que les microorganismes manipulés restent dans « l'éprouvette ». Par contre, leur objectif premier est de s'assurer que si certains d'entre eux s'en échappaient (soit accidentellement ou lorsque le travail est terminé), ils seraient peu susceptibles de présenter un danger pour le personnel de laboratoire et de se propager à l'extérieur de ce dernier.

Les principes relatifs aux bonnes pratiques microbiologiques et au confinement sont indiqués ci-dessous.

Les bonnes pratiques microbiologiques

L'utilisation de techniques aseptiques et d'autres bonnes pratiques microbiologiques permettent d'atteindre deux objectifs importants. Ces objectifs sont :

- la prévention de la contamination du laboratoire par les organismes manipulés; et
- la prévention de la contamination du travail par des organismes dans l'environnement.

Le premier objectif est d'une importance primordiale en matière de sécurité au travail tandis que le second constitue l'un des principaux critères de qualité de la recherche. L'incitation à appliquer ces principes est donc élevée.

Les principes de bonnes pratiques microbiologiques doivent s'appliquer à tous les types de travaux mettant en jeu des microorganismes (y compris les travaux de modification génétique), quel que soit le niveau de confinement. En outre, l'utilisation d'une technique aseptique est d'une valeur inestimable pour prévenir la contamination des cultures tissulaires.

La technique aseptique est fondée sur la mise en place d'un microenvironnement spécial (propre) dans lequel il est possible de faire croître et de conserver le microorganisme d'intérêt ainsi que d'éviter tout contact avec le monde extérieur. Ce microenvironnement est habituellement un type de culture ou de récipient, tel qu'un flacon, une bouteille (flacon bijou, bouteille McCartney ou bouteille universelle, etc.) ou une boîte de Petri, dans lequel les organismes sont maintenus dans un milieu gélosé solide ou en suspension dans un bouillon, un diluant ou un autre liquide.

Les principes de la technique aseptique sont :

1. avant leur utilisation, tous les composants du système (l'intérieur du récipient, le milieu et les objets utilisés dans les procédés de manipulation) doivent être stériles; et
2. lors des étapes d'inoculation, d'incubation et de traitement, une attention particulière est nécessaire pour prévenir la contamination croisée. Il faut pour cela :
 - maintenir le récipient fermé, sauf pour la période minimale requise pour l'introduction ou le retrait de matières;
 - travailler avec un bec Bunsen et flamber l'ouverture du récipient (c.-à-d. le passer rapidement dans la flamme du bec Bunsen) chaque fois que les couvercles sont retirés. Le courant d'air chaud ascendant créé par le bec Bunsen empêche les particules ou l'air contaminés de tomber dans le récipient à culture lorsque le couvercle est retiré;
 - utiliser des techniques de manipulation qui réduisent au minimum la possibilité de contamination croisée, p. ex. retirer les couvercles avec l'auriculaire de sorte qu'ils ne sont pas déposés sur les tables de laboratoire; et
 - s'assurer que tous les objets qui pourraient entrer en contact avec la culture, tels que les pointes des pipettes et des anses, sont stériles avant leur utilisation, qu'ils ne sont pas contaminés par simple contact avec la table de laboratoire, les doigts, l'extérieur de la bouteille ou autre durant la manipulation et qu'ils sont décontaminés ou éliminés de façon sécuritaire immédiatement après leur utilisation.

En plus de la technique aseptique, les bonnes pratiques microbiologiques englobent un large éventail d'autres méthodes de travail qui minimisent la contamination croisée bidirectionnelle entre les travaux et le lieu de travail. Cela comprend, par exemple :

1. L'utilisation de techniques de manipulation qui minimisent la possibilité de produire des aérosols :

- mélanger en roulant ou en brassant doucement plutôt que d'agiter vigoureusement (pour éviter la formation de mousse);
- pipetter en plaçant la pointe dans un liquide ou sur une surface avant d'en éjecter le contenu (pour éviter la formation de bulles et les projections);
- placer les récipients à proximité les uns des autres lors du transfert de liquides entre eux (pour éviter les projections provenant de la chute de gouttes);
- utiliser les anses seulement lorsqu'elles seront refroidies après le flambage (pour éviter les crépitements);
- s'assurer de ne pas remplir excessivement les carters des centrifugeuses (pour éviter les fuites dans la centrifugeuse); et

- en tout temps, transporter et entreposer les cultures et autres objets (bouteilles et plaques à culture) dans des râteliers ou dans d'autres contenants (pour éviter les chutes et les bris accidentels).

2. Le maintien d'un laboratoire propre et bien rangé :

- seuls les articles nécessaires pour effectuer la tâche en cours doivent être présents sur la table de laboratoire (pour éviter un encombrement inutile qui pourrait augmenter la possibilité de renversements ainsi que pour minimiser les problèmes liés au nettoyage en cas de déversement);
- planifier et prévoir les travaux de sorte que tous les composants nécessaires pour une expérience se trouvent à portée de la main (de sorte que le technicien puisse s'asseoir à la table de laboratoire et travailler confortablement);
- à la fin de chaque expérience, nettoyer et ranger la table de laboratoire et toujours se laver les mains. En cas notamment de déversement, toujours nettoyer immédiatement et se laver les mains;
- éviter de placer des objets sur le plancher (pour éviter les trébuchements et limiter les problèmes liés au nettoyage en cas de déversement);
- nettoyer les bains-marie de laboratoire régulièrement (pour limiter la contamination microbienne de l'eau);
- nettoyer régulièrement les rayonnages ouverts, les tables de laboratoire et les appuis de fenêtre, etc., ainsi que les articles qui s'y trouvent (pour éviter l'accumulation de poussières et de débris, ranger les articles peu utilisés dans des armoires ou dans des tiroirs);
- nettoyer régulièrement les planchers (pour éviter l'accumulation de poussières et de débris, en particulier dans les zones difficiles d'accès);
- trier régulièrement les articles entreposés dans les réfrigérateurs et les congélateurs, sur les rayonnages et sur les tables de laboratoire, etc., et jeter les articles dont vous n'avez plus besoin (pour éviter l'encombrement); et
- maintenir la propreté des éviers (les lavabos et les robinets doivent être nettoyés tous les jours).

3. La désignation dans le laboratoire de zones pour l'entreposage des articles à différentes étapes de leur cycle d'utilisation et, si nécessaire, l'utilisation de systèmes visuels (p. ex. de ruban-indicateur de stérilisation) pour en indiquer le statut :

- par exemple : propre/propre et en attente de stérilisation/propre et stérile, prêt à l'emploi/utilisé et non décontaminé/utilisé et en cours de décontamination/utilisé et prêt pour le nettoyage (les systèmes de ce

genre permettent la compartimentalisation des activités de travail en zones propres et souillées);

- chaque membre du personnel de laboratoire doit connaître le système afin d'éviter toute confusion; et
- le système doit être logique et simple à mettre en pratique au travail (sinon, il ne fonctionnera pas).

Aspect important des bonnes pratiques microbiologiques et souvent négligé par les non-spécialistes, les microbiologistes d'expérience manipulent tous les microorganismes et toutes les cultures comme s'ils s'agissaient d'agents pathogènes (même s'ils travaillent avec des organismes du groupe de risque 1) en recourant systématiquement à des techniques aseptiques et à d'autres bonnes pratiques microbiologiques. Tout en tentant de faire croître un organisme en particulier (non pathogène), il convient de toujours tenir compte de la possibilité de culture involontaire d'un contaminant (pathogène).

En outre, bien qu'il soit peu probable que des organismes du groupe de risque 1 provoquent des maladies, plusieurs d'entre eux risquent de provoquer des infections opportunistes, et leur potentiel pathogène pourrait être modifié dans les conditions de croissance du laboratoire.

Des vérifications de la pureté doivent être intégrées aux protocoles expérimentaux et effectuées systématiquement à diverses étapes des expériences. Pour ce faire, il faut :

- remplir une anse de liquide provenant du récipient, puis étaler (ou repiquer) ce liquide dans un milieu nutritif solide non sélectif pour obtenir des colonies uniques;
- incuber le tout à une température convenable (généralement 30 °C, puisque cette température permet la croissance de contaminants provenant de l'environnement en général ainsi que des sources humaines); et
- examiner les étalements après l'incubation pour y déceler des preuves de contamination (selon les types de colonies).

Il est aussi possible d'obtenir une indication de la pureté d'une culture liquide en effectuant un examen microscopique. L'avantage de cette méthode est que le résultat est instantané. Pour ce faire, placer le contenu d'une anse de la culture sur une lame de microscope, puis procéder à son examen en préparation humide (à l'aide d'un microscope à contraste de phase) ou fixé sur la lame et coloré par la méthode de Gram. Les organismes contaminants devraient être clairement visibles.

Les vérifications de la pureté sont particulièrement utiles pour évaluer les compétences en matière de bonnes pratiques microbiologiques. Le personnel de laboratoire ne maîtrisant pas les techniques aseptiques aura fréquemment des problèmes de contamination tandis que les microbiologistes chevronnés n'auront de problèmes qu'occasionnellement. Il est important de reconnaître que les mauvaises pratiques entraînant la contamination des cultures

provoquent aussi la propagation de cette contamination dans l'ensemble du laboratoire.

Trois prétextes préférés sont couramment utilisés pour justifier le manque d'application de normes rigoureuses de bonnes pratiques microbiologiques :

« Je travaille seulement avec la bactérie *E. coli* et elle se multiplie si rapidement que sa croissance surpasse celle de tous les autres organismes. Je n'ai donc pas besoin de m'inquiéter de la contamination des cultures. »

« J'utilise un milieu contenant des antibiotiques. Je n'ai donc pas à m'inquiéter de la contamination des cultures puisque seule ma souche se multipliera parce qu'elle contient des marqueurs de résistance aux antibiotiques. »

« Je porte des gants pour me protéger parce qu'on se retrouve toujours avec des matières sur les mains, et de cette façon, je n'ai pas besoin de me laver les mains. »

Ces idées sont totalement erronées, reflètent des pratiques de laboratoire médiocres et de mauvaises attitudes, indiquent l'application de normes de sécurité insuffisantes et compromettent la qualité de la recherche.

Le confinement

Le travail sur des microorganismes (réalisé en suivant de bonnes pratiques microbiologiques) est effectué dans des laboratoires de confinement. Il existe quatre niveaux différents de confinement, et le niveau de confinement utilisé pour la manipulation d'un microorganisme en particulier est déterminé par le groupe de risque auquel l'organisme appartient.

Les principes de confinement s'appliquent tant à la conception de base et aux installations du laboratoire qu'aux pratiques de travail adoptées par l'ensemble du personnel de laboratoire. Le but du confinement est non seulement d'éviter que des microorganismes ne s'échappent du laboratoire, mais aussi de veiller à la sécurité du personnel. Dans ce dernier cas, ce résultat est obtenu en bloquant les voies d'infection.

Les pratiques de travail essentielles au confinement et leur raison d'être sont décrites ci-dessous. Les contraintes supplémentaires qui s'appliquent au niveau de confinement 3 ne sont pas incluses, car peu de travaux sont effectués à ce niveau à l'Université. Une formation spécialisée en matière de pratiques de travail sécuritaires est requise pour tout le personnel travaillant dans des laboratoires de niveau 3.

1. Restreindre l'accès — Seules les personnes ayant de bonnes raisons d'accéder au laboratoire sont autorisées à y entrer :

- Maintenir la porte du laboratoire fermée (l'affiche indiquant que l'accès est restreint est alors visible et les gens seront moins enclins à y entrer sans raison).
- Limiter l'accès au laboratoire au personnel de laboratoire et aux autres personnes autorisées afin de minimiser le nombre de personnes susceptibles d'entrer en contact avec des contaminants (et de les propager).

2. Porter des vêtements de protection — Tous les vêtements contaminés doivent demeurer dans le laboratoire et ne pas être déplacés vers d'autres zones du bâtiment ou rapportés à la maison :

- Les blouses de laboratoire, qui doivent idéalement être munies d'un système de fermeture sur le côté ou à l'arrière, doivent être portées dans le laboratoire et retirées au moment de quitter le laboratoire.
- Les blouses de laboratoire doivent être rangées ou entreposées séparément dans les locaux du laboratoire afin qu'aucun contaminant ne soit transféré aux objets personnels par contact étroit dans les casiers, etc.

3. Bloquer les voies d'infection grâce au suivi constant de simples précautions :

- Par ingestion – Ne jamais mettre quoi que ce soit dans la bouche :
 - Il est strictement interdit de manger, de mâcher, de boire, de fumer, de conserver des aliments ou de se maquiller dans le laboratoire.
 - Il est également interdit de pipetter des liquides avec la bouche, de lécher des étiquettes, de mâchouiller des stylos et de se ronger les ongles, de couper ou de déchirer des objets avec ses dents, de se lécher les doigts ou de cracher pour humidifier quelque chose, etc., dans le laboratoire.
 - Il faut immédiatement se désinfecter les mains ou les laver lorsqu'une contamination est soupçonnée, après avoir manipulé des matières infectieuses ainsi qu'avant de quitter le laboratoire (les contaminants qui se trouvent sur les mains sont couramment transférés à la bouche durant les activités quotidiennes).
- Par voie percutanée — Éviter le risque de plaies perforantes et toujours recouvrir les lésions cutanées :
 - autant que possible, éviter d'utiliser des objets tranchants. Si cela n'est pas possible, les procédures de manipulation doivent minimiser la probabilité de plaies perforantes. Si possible, remplacer les articles en verre (y compris les pipettes) par des modèles en plastique.
 - Les objets tranchants utilisés doivent être jetés directement dans un contenant pour objets tranchants.
 - À moins que des mesures sécuritaires n'aient été mises en place, les aiguilles ne doivent pas être retournées dans leur étui. Il ne faut jamais trop remplir les contenants pour objets tranchants. Les objets tranchants utilisés qui dépassent des contenants sont très dangereux pour le personnel chargé de les manipuler.
 - Le terme tranchant désigne tout article acéré, et ne se limite pas aux aiguilles et aux scalpels. Parmi les articles qui pourraient facilement endommager la peau, on compte ceux en verre (y compris les lames et couvre-objets de microscope), les ampoules, les pinces à bec pointu, les instruments de dissection, les ciseaux, les anses à inoculation qui ne forment pas de cercles fermés et les tamis utilisés pour le travail de microscopie électronique. Cette liste n'est pas complète et il faut évaluer tous les articles pour déterminer si leurs rebords sont tranchants. Les objets en verre fissurés ou ébréchés doivent toujours être immédiatement éliminés.

- Tout le personnel de laboratoire doit recouvrir les coupures et les éraflures par des pansements imperméables.
- Pour éviter que le personnel ne propage des contaminants qui peuvent se répandre par l'intermédiaire de diverses sources à tout le personnel de laboratoire, de bonnes pratiques d'hygiène, dont le lavage régulier des mains, doivent être pratiquées en tout temps; à la fin de chaque séance (ou journée) de travail, les tables de laboratoire et l'équipement doivent être nettoyés et désinfectés.
- Il est recommandé de porter des lunettes de sécurité ainsi qu'une combinaison en plastique s'il y a risque d'éclaboussures.
- Le port de gants offre une protection supplémentaire si le microorganisme manipulé peut provoquer une infection par voie percutanée. Dans ce cas, il est recommandé de porter deux paires de gants jetables durant la manipulation des échantillons (les dommages légers à des gants minces passent souvent inaperçus jusqu'à ce que la peau présente des signes de contamination). Si le gant extérieur est percé ou très contaminé durant l'utilisation, il doit être jeté. Si le gant intérieur est aussi endommagé ou contaminé, il faut le jeter, se laver les mains et enfiler des gants propres.
- Lorsque le travail est terminé, les gants doivent être retirés et jetés, et il faut se laver les mains. Les gants jetables ne doivent pas être réutilisés, puisque la contamination risque de se propager lorsque ceux-ci sont renfilés.
- Par voie d'inhalation — Prendre des précautions pour minimiser la production d'aérosols :
 - De bonnes pratiques microbiologiques doivent être suivies pour éviter la production d'aérosols.
 - Dans le cas de manipulations comme l'agitation ou le mélange vigoureux et la rupture par ultrasons, etc., il faut utiliser une enceinte ou un équipement de sécurité microbiologique conçu pour confiner les aérosols.
 - Il faut travailler dans une enceinte de sécurité microbiologique dans le cas d'un microorganisme provoquant des infections par les voies respiratoires.
 - Les enceintes de sécurité microbiologique n'offrent de protection que pour les contaminants en suspension dans l'air. Il faut donc toujours suivre de bonnes pratiques microbiologiques durant le travail dans une enceinte, puisqu'aucune protection n'est offerte contre la contamination de la peau (il existe donc la possibilité d'infection par voie percutanée et par ingestion comme il est décrit ci-dessus).

4. Aménager les postes de travail pour travailler en toute sécurité :

- Il doit y avoir suffisamment d'espace sur la table de laboratoire pour que le poste de travail ne soit pas encombré et que les pratiques de travail ne soient pas compromises en raison du manque d'espace.

5. Désinfecter pour éviter la propagation des contaminants :

- Des désinfectants efficaces doivent être disponibles pour la désinfection régulière ainsi que pour utilisation immédiate en cas de déversement.
- Les tables de laboratoire doivent être désinfectées après utilisation.
- Toutes les surfaces doivent être désinfectées immédiatement à la suite d'un déversement.
- Toutes les surfaces doivent être désinfectées avant d'accorder l'accès au personnel de l'entretien.
- Tous les contenants à spécimens, toute la verrerie et tout l'équipement ayant servi doivent être immergés dans un désinfectant convenable avant leur nettoyage ou leur élimination. La verrerie et autre matériel utilisés en attente de stérilisation doivent être entreposés de façon sécuritaire. Les pipettes doivent être complètement immergées dans le désinfectant, le cas échéant.

6. Utiliser des procédures d'élimination des déchets qui garantissent l'élimination sécuritaire du matériel contaminé :

- La sécurité de tous les déchets doit être assurée par stérilisation en autoclave ou par désinfection avant leur élimination.
- Le matériel à stériliser en autoclave doit être transporté jusqu'à l'autoclave dans des contenants robustes antidéversement.

7. Signaler tous les accidents afin que des mesures appropriées soient mises en place pour minimiser la probabilité de maladies (et pour minimiser les risques de les propager à sa famille, à ses amis et à d'autres personnes à l'extérieur du laboratoire) :

- Signaler immédiatement tous les accidents et incidents à la personne responsable du travail, qui les consignera.
- Un dossier complet de l'accident doit être préparé et transmis au secteur Santé et sécurité au travail. En cas d'exposition potentielle, il faut immédiatement en informer le groupe de Santé et sécurité au travail (SST) du Bureau de la dirigeante principale de la gestion des risques (BDPGR) de l'Université d'Ottawa.
- En cas d'accident entraînant une blessure, il faut favoriser le saignement de la blessure et nettoyer la zone avec de l'eau et du savon, sans frotter. La blessure doit être recouverte d'un pansement imperméable. Laver immédiatement la peau, la conjonctive ou les muqueuses contaminées.
- Il convient de veiller particulièrement à ce que les autres personnes présentes dans le laboratoire ne participent pas au nettoyage du déversement accidentel (surtout dans le cas d'un accident au cours duquel survient un bris de verre) si elles ne sont pas conscientes des risques potentiels ni formées en matière de pratiques de travail sécuritaires.
- Lorsqu'un accident entraîne une fuite de matières contaminées, les procédures de nettoyage doivent être évaluées soigneusement et des pratiques de travail sécuritaires doivent être adoptées.

8. Le personnel doit être formé en matière de pratiques et de techniques de travail sécuritaires, et bien les maîtriser, pour assurer sa propre sécurité ainsi que celle des autres personnes dans le laboratoire :

- Le personnel doit pouvoir reconnaître de quelle façon une exposition peut avoir lieu, et comment on peut l'éviter.

Il est important de souligner que le port de gants et l'utilisation d'enceintes de sécurité microbiologiques sont des mesures de contrôle supplémentaires pour certains travaux de confinement de niveau 2, selon la voie d'infection du microorganisme manipulé. Il n'est pas nécessaire de les utiliser pour tous les agents pathogènes du groupe de risque 2. Il ne faut pas confondre le port de gants et l'utilisation d'enceintes pour les besoins du travail (tels que les travaux de culture tissulaire) et leur utilisation pour la protection du travailleur, bien que dans certains cas, les enceintes remplissent une double fonction consistant à protéger le travail ainsi que le travailleur.