

DSVA

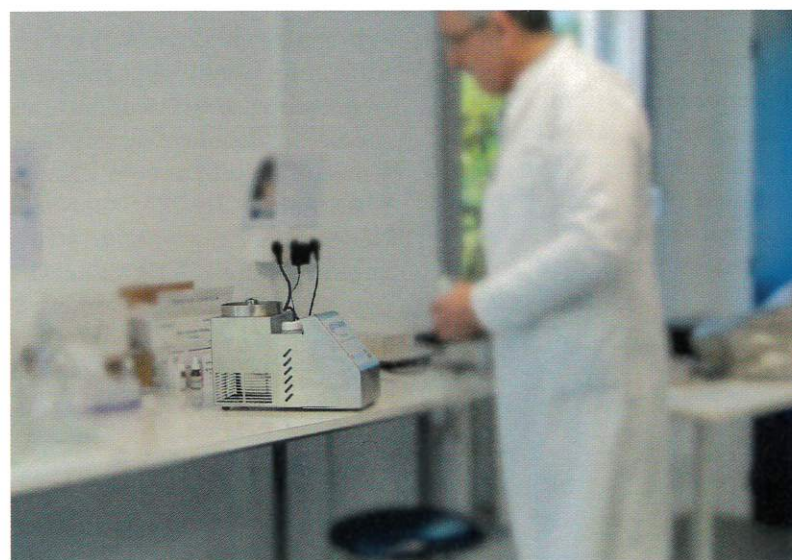
La désinfection des différents organes d'un laboratoire NSB3

Par OLIVIER HAUTION, Devea

Les zones de confinement de niveau 3, appelées NSB3 (niveau de sécurité biologique 3), sont définies dans leur conception ou leur aménagement par arrêté. Toutefois, il n'existe pas de standards précis accompagnant le responsable de ce type de structure dans le contrôle de la contamination et la protection de l'environnement. Aussi la mise en œuvre de procédures adaptées doit tenir compte d'un certain nombre de paramètres en intégrant les contraintes et objectifs inhérents au laboratoire et à ses différents organes. On y trouve notamment des sas de toutes dimensions, ventilés ou non, qui nécessitent la mise en œuvre de protocoles de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA).

Le confinement est défini par l'arrêté du 16 juillet 2007 qui vient en lieu et place du précédent arrêté du 13 août 1996 (tableau A). Il fixe les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement,

d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes (même si ce nouvel arrêté précise que la décontamination des matériels et équipements avant toute intervention de maintenance doit



désormais être effectuée et accompagnée d'une attestation de décontamination). L'annexe 1-c-1 rappelle notamment que doivent être mises en œuvre la « décontamination du matériel et des équipements susceptibles d'être contaminés (centrifugeuse, fermenteur, poste de sécurité microbiologique, dispositif de ventilation et de climatisation...) avant toute autre intervention de maintenance pouvant entraîner un risque biologique pour l'opérateur. [Ainsi que la] communication aux intervenants de maintenance d'un document attestant de

la décontamination » et la « mise en place de procédures écrites définissant des moyens et méthodes de nettoyage et de désinfection appropriés ».

De manière générale, ce texte pose les bases nécessaires à la conception du laboratoire et aux aménagements internes, et définit les bonnes pratiques de laboratoire (inactivation des déchets, port des équipements de protection, etc.) sans pour autant proposer de mesures précises quant à la maîtrise de la contamination et aux protocoles adéquats à ➔

A Nomenclature des zones de confinement

Directive 90/679/CEE JORF Arrêté du 13/08/1996	1	2	3	4
WHO/OMS (3 ^e édition 2005)	B-BL1 B-BSL1	B-BL2 B-BSL2	C-BL3 C-BSL3	MC-BL4 MC-BSL4
CGG*	L1	L2	L3	L4
NIH* Recherche	BL1 BSL1	BL2 BSL2	BL3 BSL3	BL4 BSL4
NIH* Production (GLSP)	BL1-LS BSL1-LS	BL2-LS BSL2-LS	BL3-LS BSL3-LS	BL4-LS BSL4-LS
Simmons-Sotty (CNRS/Inra/Inserm/IPP) 1991	NSB1	NSB2	NSB3	NSB4
NF EN 12128 (1998)	PCL1	PCL2	PCL3	PCL4

* ne concerne que les organismes génétiquement modifiés. BL ou BSL : niveau de bio-sécurité. B basique. C confinement. MC confinement maximum. GLSP Good large scale practice. LS grande échelle. NIH : lignes de conduite pour l'ADN recombinant. PCL : niveau de confinement physique. NSB : niveau de sécurité biologique.

→ mettre en œuvre suivant les différentes situations qui peuvent se présenter. L'arrêté définit des mesures et des moyens minimaux à mettre en œuvre pour chaque niveau de sécurité (NSB2, NSB3, NSB4) dans cinq types de structures comme décrit ci-dessus (annexes III à VI, dont l'annexe V qui correspond aux laboratoires de recherche). Il existe aussi une

norme européenne EN 12128 sur les niveaux de confinement des laboratoires de recherche, de développement et d'analyse.

Le niveau de confinement est défini selon le classement du ou des agents biologiques qui seront manipulés (**tableau B**). Rappelons qu'il peut s'agir d'un micro-organisme (génétiquement modifié ou non), d'une culture cellulaire et d'endoparasites humains susceptibles de provoquer une infection, une allergie ou une intoxication. Le décret n° 94-352 du 4 mai 1994 a défini le classement des agents biologiques en quatre groupes selon l'importance du niveau de dangerosité (l'infection n'est qu'une partie du processus) qu'ils peuvent représenter. Là encore, de nombreuses mesures d'évaluation et de prévention du risque biologique, diverses dispositions concernant la formation, l'information et la surveillance médicale des travailleurs exposés aux agents biologiques pathogènes y sont mentionnées sans toutefois proposer de mesure précise quant à une méthodologie

de mise en œuvre pratique d'un plan de désinfection de la zone. Logiquement inscrit dans le code du travail (actuellement titre II Prévention des risques biologiques, art. R.4421-1 à R.4427-5), le risque biologique est donc au cœur des préoccupations de la zone de confinement sans que ne soit inscrite de démarche précise pouvant aider le responsable de la structure. Rappelons que dans le cadre d'une zone de niveau 3, le personnel manipule des agents biologiques pathogènes pour l'homme et provoquant des maladies graves (et donc à risque élevé pour l'opérateur) avec une propagation possible. Toutefois, il en existe généralement (pas toujours) un traitement (ou une prophylaxie). Évidemment, différents types de structures existent selon leurs activités (laboratoire, animalerie). À noter que les serres sont l'objet d'une réglementation particulière due à la spécificité du classement des bio-agresseurs des végétaux qui sont des agents non pathogènes pour l'homme : le risque est ici environnemental, mais tout aussi néfaste pour la collectivité. Cette variabilité influence significativement les process (procédés et/ou procédures) pouvant être mis en œuvre au sein de la structure. Une directive 2000/54/CE du Parlement européen et du conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail a défini le niveau de confinement nécessaire pour la manipulation de chaque bactérie, virus et champignon ou parasite. L'arrêté du 16 juillet 2007 est l'un des textes de transposition de cette directive, ainsi que les articles du titre II R.4421-1 à R.4427-5 du code du travail, de même que d'autres textes.

B Classification des agents pathogènes

Agents biologiques du groupe de risque	Virus	Bactéries	Parasites Champignons	Risque infectieux	Risque de propagation dans la collectivité	Prophylaxie ou traitement efficace	Niveau de sécurité du laboratoire
2	Rougeole Oreillons Gripes A, B, C	<i>L. pneumophila</i> <i>C. botulinum</i> <i>H. pylori</i>	<i>T. gondii</i> <i>S. mansoni</i> <i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i>	Peuvent provoquer une maladie grave et constituer un danger pour les travailleurs	Peu probable	Disponible	L-NSB2 A-NSB2
3	VIH Hépatite C Hépatite B	<i>B. anthracis</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>B. abortus</i>	<i>T. cruzi</i> <i>P. falciparum</i> <i>H. capsulatum</i> <i>B. dermatidis</i>	Peuvent provoquer une maladie grave et constituer un danger sérieux pour les travailleurs	Probable	Généralement disponible	L-NSB3 A-NSB3

Source : Jean-Charles Paucod, IRBA.

Connaître l'environnement

In fine, le responsable du laboratoire, garant de la mise en œuvre de procédures adéquates, de la formation du personnel et du respect des BPL, doit définir un protocole complet de désinfection de sa structure en s'assurant de sa conformité par une analyse des risques. Il doit ainsi s'attacher à répondre aux contraintes de chaque équipement, que ce soit dans le cadre de son fonctionnement, de sa maintenance ou dans une situation d'urgence. Par extension, il doit envisager une procédure (souvent traitée de manière superficielle dans les textes) appropriée à la zone en elle-même, à savoir les sols, murs et plafonds de l'ensemble de la zone.

L'ensemble des équipements doit donc être considéré. La liste peut se résumer ainsi :

- évier ou lavabo à commande non manuelle permettant la

récupération des effluents à proximité duquel sera placé un distributeur de papier absorbant pour le séchage des mains. Pour un laboratoire de niveau 3, ce lave-mains ne peut se trouver que dans le sas puisqu'il y a obligation de gantage, voire de double gantage lors du travail en laboratoire de niveau 3 ;

- douche pour permettre la décontamination du personnel en cas d'accident (de préférence dans le sas ou à proximité du NSB3) ;
- système permettant l'inactivation des effluents des éviers et des douches ;
- poste de sécurité microbiologique de type II (PSM type II) : la manipulation des agents biologiques se fait sous flux afin de contenir tout risque de propagation lors de la manipulation. Ils répondent forcément aux normes de CE. Il doit surtout répondre aux prescriptions de la norme EN 12469 Critères de performance pour les PSM ;
- cages, moyens de contention,

procédures d'euthanasie appropriées aux espèces animales (animaleries) ;

- moyens de lutte efficace contre les rongeurs et insectes ;
- autoclave à double entrée (ou à proximité immédiate si mise en place de procédures validées et contrôlées) ;
- centrifugeuse et étuve à l'intérieur du local ;
- congélateur permettant de stocker le matériel biologique sur place. Il est conseillé de l'équiper d'une alarme ;
- paillasse sur laquelle reposent des équipements de base ;
- équipements de base (petit matériel de type vortex, bain-marie, centrifugeuse de paillasse...) spécifique au NSB3 et marqué.

procédures d'euthanasie appropriées aux espèces animales (animaleries) ;

- moyens de lutte efficace contre les rongeurs et insectes ;
- autoclave à double entrée (ou à proximité immédiate si mise en place de procédures validées et contrôlées) ;
- centrifugeuse et étuve à l'intérieur du local ;
- congélateur permettant de stocker le matériel biologique sur place. Il est conseillé de l'équiper d'une alarme ;
- paillasse sur laquelle reposent des équipements de base ;
- équipements de base (petit matériel de type vortex, bain-marie, centrifugeuse de paillasse...) spécifique au NSB3 et marqué.

Définir une procédure adaptée

La mise en œuvre d'une procédure de désinfection doit répondre à deux questions fondamentales.

Est-elle efficace compte tenu de mon activité ?

Le type d'agent biologique utilisé est prépondérant dans le choix d'une méthodologie et notamment dans le cadre du choix d'un désinfectant. Les matières actives ne se valant pas, il convient de choisir la formule qui garantira, par la norme revendiquée sur le flacon, celle qui correspondra le mieux à l'activité du laboratoire. Des tests complémentaires *in situ* pourront compléter le dossier scientifique de base du produit si besoin.

L'exemple de la manipulation des MOT (micro-organismes et toxines) présente une particularité qui lui vaut une réglementation propre. Ainsi, les opérations y sont soumises à des conditions et à un régime d'autorisation délivrées par l'ANSM. À ce titre, dans le cadre de MOT, il conviendra au NSB3 de définir une procédure de validation de la désinfection dont la teneur sera contrôlée par ➔

CONFORMAT GAMME INOX – Partenaire de vos équipements en salles propres



Dessiné selon vos exigences

- Etude **sur mesure** de votre demande
- Ajustement des dimensions à vos locaux et plans de validation

Elaboré avec soin

- Découpage et mise en forme des tôles par **commande numérique**
- Assemblage par soudage sous gaz inerte
- Nettoyage et brossage manuel

Livré et installé

- **Installation sur place** possible
- Raccord effluents et aéraulique
- Finition de joint d'étanchéité sol et mur



Source de confiance depuis 30 ans

Tel +33 1 41 19 34 44 // Fax +33 1 47 60 12 76
contact@conformat.com // www.conformat.com



→ L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM).

Un autre exemple assez significatif concerne les structures travaillant le prion. Sa structure protéique en fait un organisme à part qui se traduit par une inefficacité de la plupart des matières actives classiques. En effet, à l'heure actuelle, seules l'eau de Javel et la soude sont à utiliser dans ce type de structure.

Dans une autre mesure, un L-NSB3 manipulant des souches virales doit choisir non seulement des matières actives efficaces mais doit également être capable de mettre en œuvre un protocole de validation d'une désinfection par voie aérienne (DSVA), dont l'action se fait par définition sur matériel biologique asséché. Or, ce sujet a longtemps été écarté par la NFT 72-281 pour des raisons d'ordre technique, les virus supportant assez mal le séchage d'une manière générale. De ces trois exemples simples, nous nous apercevons de la variabilité des contraintes et des objectifs qui se présentent aux responsables de NSB3. Pour chaque situation

et chaque organe, il conviendra donc de s'interroger sur l'efficacité de la procédure.

Est-elle adaptée à mon organisation ?

L'activité d'un NSB3 et les conséquences en termes de désinfection ne se résument pas à (ou aux) souche(s) manipulée(s). En effet, l'utilisation d'une zone de confinement de haut niveau s'inscrit également dans le temps avec un public plus ou moins restreint pouvant intervenir dans la zone, une variation de l'activité dans le temps ou des changements d'étude. Ces variables sont absolument primordiales dans la réflexion sur la mise en œuvre d'un protocole de désinfection adapté et efficace. L'écriture des procédures devra être réalisée de manière à ce qu'elles soient comprises de tous et facilement assimilables afin d'éviter les biais.

La désinfection de routine en NSB3...

Dans sa démarche, le responsable de NSB3 s'attache donc à définir la procédure dite de routine. Il s'agit de définir les produits désinfectants

adaptés à son activité. Ces opérations sont réalisées par les utilisateurs de la zone et doivent intégrer l'ensemble des organes du laboratoire, de la paillasse au PSM en passant par la centrifugeuse. Les matières actives agissent de manières différentes sur les agents biologiques, l'alternance des matières actives (et donc des produits) est généralement admise. Rappelons qu'il s'agit de « rotation vraie », ce qui signifie qu'il faut utiliser des matières actives ayant des mécanismes différents sur l'agent biologique afin d'étendre le spectre d'action. La fréquence de cette alternance varie en fonction de l'activité de la structure. Il faut de toute manière contenir cette alternance à deux désinfectants et l'inscrire de la manière la plus simple possible afin d'éviter toute erreur pouvant induire des interactions dangereuses entre produits.

Reprenant les dernières données issues du guide de l'Aspec *Nettoyage et désinfection des locaux et surfaces extérieures des équipements*, éd. 2015 (tableau C), nous pouvons ainsi considérer les spectres des matières actives qui pourront

être retenues dans la procédure de routine.

L'éthanol est par exemple utilisé dans des structures manipulant des MOT comme *Brucella*. Nous comprenons qu'en routine, même si l'alcool ne présente pas un spectre total, il peut parfaitement convenir à ce contexte. Notons que *Brucella* étant également sensible à l'eau de Javel, aux aldéhydes et aux oxydants (H₂O₂, peracides), d'autres choix auraient pu être retenus. *A contrario*, le choix ne se portera pas vers des ammoniums quaternaires.

Autre exemple avec les mycobactéries, le laboratoire s'orientera vers la Javel, les oxydants ou toute formule revendiquant les normes EN 14348 et EN 14563.

Une fois le choix du désinfectant de routine effectué, sa mise en œuvre est traduite en fonction de l'équipement ou de la zone à traiter. La désinfection du plan du PSM doit de préférence se faire avant et après manipulation. La désinfection d'une centrifugeuse peut se faire ponctuellement car cette zone, hormis une situation de casse de tube, n'est pas à proprement parler exposée. Ainsi les zones de manipulation à risques (manipulation, évacuation des déchets...), sur lesquelles un protocole systématique aura lieu, sont dissociées du reste de la structure. Cette démarche mène donc à la mise en œuvre d'un plan de traitement complet reprenant pour chaque organe et chaque zone (laboratoire, sas...) une méthodologie précise, dite « quotidienne », détaillant deux produits, une fréquence et les moyens adéquats.

... et ses limites

L'activité normale d'un NSB3 implique également des situations qui ne rentrent pas dans le

☉ Spectre des matières actives pour la désinfection de routine

	Bactéries (Gram)		Mycobactéries	Spores bactériennes	Levures ou champignons	Virus
	Positif	Négatif				
Alcool (70°)	++	++	++	0	++	+
Phénols	+++	+	0	0	+	++
Aldéhydes	+++	+++	++	+	+++	++
Ammoniums quaternaires	+++	+	0	0	++	+
Chlore	+++	+++	++	++	++	++
Peracides (ac. peracétique)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Peroxyde d'hydrogène	++	+++	++	++	++	++
Amines (alkyamines...)	+++	+++	++	0	++	++

Tableau issu du guide de l'Aspec « Nettoyage et désinfection des locaux et surfaces extérieures des équipements », éd. 2015.

cadre de la routine et auxquelles le responsable doit impérativement répondre. On peut dissocier trois cas :

- La mise en travaux générale : qu'il s'agisse d'une livraison de laboratoire (neuf) ou d'une mise en conformité d'une structure existante, le NSB3 est une zone dans laquelle les paramètres biologiques doivent être totalement maîtrisés. Il s'agira donc de réaliser un bionettoyage complet de la structure avec des oxydants.

- La maintenance d'un équipement : qu'elle soit décennale ou annuelle, il s'agit de faire intervenir un effectif externe à la structure qui interviendra en zone. La mise en sécurité de l'équipement et la conformité de la zone doivent être validées et sanctionnées comme nous l'avons vu précédemment.

- L'accident lié à une manipulation peut intervenir sous PSM, dans un déplacement au sein des différents équipements ou dans la centrifugeuse (ou autre). Une procédure d'urgence doit être mise en œuvre. Celle-ci doit toujours tenir compte des caractéristiques de l'agent biologique. En effet, généralement les agents biologiques sont inactivés par épandage d'un désinfectant à spectre total puis épongés avant d'être évacués (et suivre le cheminement de destruction des déchets issus de ce type de niveau de confinement). La démarche devra s'attacher à définir précisément le périmètre affecté. La récupération des déchets devra être effectuée de manière méticuleuse afin de ne pas propager davantage l'agent biologique. Certains agents comme le SRAS ont une volatilité élevée. Aussi dans de nombreux cas, il est prudent de compléter la procédure manuelle par une désinfection complète de la zone par un oxydant.

LA DSVa au service du NSB3

Les oxydants (H_2O_2 , peracides) présentent des propriétés intéressantes. Ils permettent de toucher un spectre large avec des temps de contact relativement courts. Ils peuvent être utilisés en manuel ou en DSVa, mais leur usage manuel est parfois considéré comme peu agréable. On le retrouve davantage dans le cadre d'une DSVa (donc en usage hors présence humaine). Comme nous venons de le voir, la désinfection manuelle en routine est possible et nécessaire. Toutefois elle présente certaines limites liées au facteur humain : ensemble des surfaces pas forcément accessible, respect plus ou moins strict des méthodes d'application du désinfectant pouvant influencer sur la quantité de liquide sur les surfaces ou sur la durée du temps de contact, etc.

D'autre part, on peut aisément comprendre que la désinfection manuelle prend du temps et que l'application d'une méthode appropriée sur l'ensemble des surfaces d'un NSB3 demanderait des moyens conséquents.

Enfin, le risque biologique étant de plus en plus au centre des préoccupations de la médecine du travail, il peut paraître particulièrement intéressant d'affecter la désinfection à un automate intervenant en toute circonstance et sans intervention humaine.

En résumé, au-delà du choix d'une matière active, la désinfection par DSVa vient compléter les procédures de routine ou d'urgence et ainsi (re) mettre en sécurité la structure en envoyant un désinfectant à spectre large dans tout ou partie du laboratoire.

Intégrer la DSVa dans son processus de bionettoyage

L'intégration de la DSVa se fait en validant un couple machine/produit au sein de sa structure. Le fournisseur revendiquant la NF T 72-281, il convient de choisir le dispositif correspondant le mieux aux contraintes du laboratoire. Ces contraintes sont de différents ordres :

- **Choix de la matière active** : la plupart des dispositifs sont à base d' H_2O_2 , seul ou avec acide peracétique (+ ac. acétique). Les adjuvants aux ions argent sont de moins en moins utilisés car l'absence de résidu est un des objectifs de cette technique.

- **Dosage produit** : selon la technique (brumisation ou vaporisation), le dosage en H_2O_2 peut varier de 1 à 5 (6 % à 30 %). La mise en œuvre s'en ressent donc fortement et l'impact sur les matériaux est non négligeable.

- **Choix de la technique de l'appareil** : il existe différentes techniques de brumisation (buses, disques...). Il convient de choisir un dispositif éprouvé à dispersion non dirigée (flux non directionnel) offrant une saturation homogène du volume à traiter.

- **Objectifs du responsable** : la démarche peut être de traiter de grandes volumes (« le laboratoire ») ou de traiter de petits volumes (comme des sas personnel de 5 m³ sans prise d'alimentation électrique). Il est également possible de destiner ce type d'équipements de DSVa aux PSM, passe-plats ou armoires (on parle de désinfection d'équipements). Même si la technique de DSVa reste identique, il faut considérer que la désinfection de ces différents éléments impose des spécificités techniques très différentes (taille de l'appareil →

« Les opérations de routine doivent intégrer l'ensemble des organes du laboratoire, de la pailleuse au PSM en passant par la centrifugeuse. »

→ de DSVA, débit du brouillard, source d'énergie).

À titre d'exemple, la DSVA d'un volume de 300 litres (armoire, mini-sas) imposera à l'équipement de DSVA la maîtrise d'un brouillard non mouillant (même à 30 cm d'une paroi), à débit lent et avec alimentation sur batterie.

Afin de valider le dispositif de DSVA, on utilise en pratique des indicateurs biologiques (IB) inoculés de *Geobacillus stearothermophilus* (*G. b*). Cette souche présente des avantages dans sa mise en œuvre car elle n'est pas pathogène, pousse à 55 °C et se trouve facilement dans le commerce. Les IB sont disposés dans le laboratoire ou dans l'équipement à traiter. Une fois le mapping réalisé et la diffusion terminée (trois phases : diffusion, temps de contact et reprise d'air), les IB sont placés en étuve pour une lecture binaire à 5 jours.

Les objectifs de réduction des IB sont fixés par le responsable du NSB3. Il peut par exemple se fixer des objectifs de réduction de 4, 5 ou 6 \log_{10} ou poser des contraintes en termes de temps de contact. Ainsi, la désinfection d'un passeplat de 250 litres devra avoir lieu avec un temps d'immobilisation très court, de l'ordre de 30 minutes (au lieu des 2 heures généralement admises) pour un objectif porté à 6 \log_{10} de réduction de *G. b*.

Cas d'application de DSVA dans des sas

Les zones d'accès du personnel ou de transfert du matériel sont des points pouvant présenter des contraintes particulières :

- les sas personnels sont généralement des volumes aux dimensions réduites (inférieures à 15 m³) ;
- la présence de siphons (douches ou lavabos) peut interférer dans



Exemple de mini-sas traité par Phileas 20D.

l'aéroulque du brouillard généré dans le cadre de la DSVA ;

- les cascades de pression imposent une étanchéité parfaite au niveau des jointures des portes d'accès du sas. La moindre perte peut engendrer des fuites du brouillard vers les basses pressions ;
- les délais d'immobilisation des mini-sas doivent être les plus courts possibles.

Les sas personnels

Des essais ont été menés avec des équipements sur batterie de type Phileas (en l'absence d'accès au secteur) dans des sas de 6,2 m³ (sas d'entrée) et 5,4 m³ (sas 2). Le laboratoire effectuant des travaux sur des MOT sensibles à l'H₂O₂, la matière active retenue fut donc un H₂O₂ seul sans adjuvant, concentré à 6 %. Les deux sas furent traités en même temps pour des raisons pratiques (traitement des deux sas ainsi que du laboratoire), notamment afin de réduire le temps d'immobilisation de la zone et de pouvoir relancer la centrale d'air sur l'ensemble du laboratoire. Rappelons que le choix de l'équipement doit impérativement se porter sur une solution adaptée au volume à traiter. En l'occurrence,

c'est un appareil à débit lent de 400 mL/h, pouvant générer un brouillard non mouillant dont les particules se situent entre 5 et 10 µm, qui a été retenu. La brumisation doit être non directionnelle, eu égard à la proximité des cloisons et mobiliers se trouvant dans le volume. Dans ce cas, le responsable du L-NSB3 s'est fixé comme objectif une réduction de *G. b* de 6 \log_{10} (Apex BI de *G. b* ATCC 12980 à 2,08.10⁶ UFC par cupule). Afin d'affiner la cartographie du test, il a toutefois été ajouté au mapping des concentrations à 4 \log_{10} (Apex BI de *G. b* à 2,78.10⁴ UFC par cupule) et 5 \log_{10} (Apex BI de *G. b* à 2,98.10⁵ UFC par cupule).

Huit indicateurs biologiques ont ainsi été disposés dans les deux sas. La diffusion de respectivement 74,4 mL (sas d'entrée) et 65,04 mL (sas 2) d'O₂Safe 6 % (soit un dosage de 12 mL/m³), suivie d'un temps de contact de 2 heures, a permis à la lecture de 5 et 7 jours de conclure à l'absence de pousse (incubation dans un bouillon de TSB à 58 °C) de l'ensemble des indicateurs exposés.

L'importance du temps d'aération

La reprise de la zone après diffusion doit normalement se faire après 15 volumes d'air neuf. Ce délai peut, selon la technique de DSVA (vapeur, brouillard, nature du désinfectant), la configuration des locaux ou la nature de la CTA (centrale de traitement d'air), varier de manière conséquente (du fait d'un besoin d'air neuf nécessaire supérieur aux 15 volumes standardisés afin de retomber sous la quantité admise de 1 ppm d'H₂O₂). L'usage de vapeur d'H₂O₂ à 30 % peut ainsi amener le temps de renouvellement d'air à près de 1 h dans certains cas.

Les mini-sas

D'autres essais ont été menés sur des mini-sas de 216 litres et 360 litres. Ce type de zone, destinée aux transferts de petits équipements, impose l'usage d'appareils de DSVA sur batterie à faible empattement.

L'objectif est toujours de désinfecter les parois du mini-sas, mais également les accessoires ou matériels qui s'y trouvent dans un laps de temps court (récupération du matériel désinfecté par le personnel). Afin de réduire le temps de contact et compte tenu de la nature des MOT manipulés dans ce laboratoire, le choix du désinfectant s'est porté sur Apasafe, soit un mélange H₂O₂ 5,23 % + acide peracétique 0,21 %. Le mapping a partiellement intégré trois niveaux d'IB (4,1.10⁴ UFC, 3.10⁵ UFC et 2,4.10⁶ UFC), les IB à 6 \log_{10} étant systématiques. L'appareil utilisé fut un Phileas 20D bas débit à 330 mL/h, spécifiquement dédié aux traitements de ces petits volumes.

Dans un premier temps, des pulvérisations multicycles de 30 secondes et des diffusions simples de 30 secondes dans le sas 216 litres ont été comparées.

Ce screening a indiqué une performance par une réduction de 6 \log_{10} de *G. b* avec le protocole 3 × 30 secondes (interphase : 5 minutes, temps de contact : 25 minutes).

Ramené à un protocole monocycle (une seule diffusion) de 30 secondes, une variabilité des résultats a été observée lorsque le temps de contact était réduit à 25 minutes, la répétabilité des résultats (réduction de 6 \log_{10} de *G. b*) étant avérée pour un temps de diffusion corrigé à 30 minutes. Dans le sas 360 litres, une variabilité des résultats avec un temps de

contact de 30 minutes a démontré que la limite du temps de contact se situait juste au-dessus des 30 minutes. Le laboratoire inscrira par la suite dans son protocole un temps de contact de 45 minutes, durée d'immobilisation considérée comme acceptable par le responsable. La DSVA de ces mini-sas ne nécessite pas de ventilation post-diffusion puisque les quantités diffusées sont inférieures à 6 mL, soit 0,3 gramme d' H_2O_2 . Ces quantités sont alors diluées dans un grand volume (à l'ouverture du mini-sas) ne présentant aucun danger pour le personnel.

En conclusion, une réduction de 6 \log_{10} de *G. b* peut être obtenue

sans risque pour les matériaux et les personnels avec des temps de contact bien inférieurs aux 2 heures habituellement retenues.

Discussion

La DSVA permet de compléter les protocoles manuels mis en place par le responsable. Si la validation au moyen de *G. b* est plus précise que l'usage de bandelettes chimiques, elle reste, dans certains cas, insuffisante et doit être confirmée par une validation sur la souche du NSB3. En effet, selon le type de souche et dans le cas de manipulations de MOT entraînant une surveillance de l'ANSM, il est

fortement conseillé (voire impératif dans le cas des MOT) de s'assurer que le dispositif de DSVA est efficace sur les IB manipulés dans le laboratoire. Dans le cas d'utilisation de mycobactéries, la démarche sera plus longue (temps de préparation). Dans une autre mesure, Les laboratoires de virologie devront être capables de mettre en culture des quantités de virus vivant asséchés suffisants (titre initial) afin d'évaluer le réel impact du dispositif sur sa (ou ses) souche(s). Les cas de la désinfection des sas par DSVA montrent combien cette méthode peut apporter en efficacité dans des conditions où

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE

■ **Aspec**, *Le nettoyage et la désinfection : locaux et surfaces extérieures des équipements*, mars 2015.

une approche plus traditionnelle (par pulvérisation) serait particulièrement limitée. Les screenings démontrant une réduction de *G. b* doivent souvent (voire obligatoirement dans le cas des MOT) être confirmés par des tests impliquant spécifiquement les souches manipulées par le NSB3. ■



Votre partenaire pour les solutions pour environnements contrôlés

- Solutions Full Service pour les salles propres et environnements contrôlés
- Spécialistes expérimentés et grande flexibilité pour transformer vos besoins en réponses pour un approvisionnement sur-mesure
- Excellence logistique pour une sécurité d'approvisionnement à 100% et des livraisons Juste-à-temps
- Gamme complète de produits et services de haute qualité
- Réseau mondial de fournisseurs et partenaires

VWR International | basan - la division salles propres de VWR | basan@fr.vwr.com | <https://fr.vwr.com> | Tél: 01 45 14 89 61