



Focus

Guide méthodologique pour la mise en œuvre d'un procédé de désinfection des surfaces par voie aérienne appliqué aux zones confinées

P. Maris (pierre.maris@anses.fr), S. Allix, S. Etienne, B. Garin Bastuji, B. Gassilloud, G. Lecarrou, N. Madani, P. Marianneau, E. Monchâtre-Leroy, F. Rizzo, E. Rousset, K. Sidi-Boumedine et S. Zini. Anses, Maisons-Alfort, France

Introduction

Les laboratoires de microbiologie sont aujourd'hui soumis à de fortes contraintes de sécurité visant à protéger les travailleurs, le public et l'environnement. En particulier, les préoccupations de santé publique liées à la toxicité du formaldéhyde, utilisé comme agent de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA), ont conduit à développer des procédés alternatifs dont l'utilisation et l'efficacité ne sont pas toujours bien maîtrisées. La connaissance des principes de base de la DSVA et l'expérience croisée des utilisateurs sont d'une importance cruciale pour le maintien de la sécurité biologique dans les laboratoires. Aussi, le Comité de maîtrise des risques biologique en laboratoire (CMRBL) de l'Anses a souhaité rassembler dans un guide les d'informations disponibles en la matière et pouvant éclairer l'utilisateur quant à son choix du procédé de DSVA. Il est à noter que les techniques de désinfection abordées dans ce guide concernent exclusivement les procédés de diffusion automatique de dispersas non dirigés, hors présence humaine. Ce guide rappelle les grands principes d'utilisation de la DSVA et présente les principaux textes réglementaires et les normes en vigueur qui s'y rapportent et propose aux utilisateurs des conseils pratiques pour la mise en œuvre de la DSVA.

Généralités sur les procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne

Au regard des objectifs de ce guide, on peut définir la DSVA comme «une opération au résultat momentané permettant de réduire à un niveau acceptable la contamination de milieux ou de surfaces inertes par des micro-organismes, en fonction des objectifs fixés par l'évaluation des risques».

Cette opération est réalisée au moyen d'un procédé automatique, dont les principes actifs sont des agents chimiques présents sous forme gazeuse ou de dispersa. Elle est destinée à la désinfection des surfaces au sein d'un volume donné, quelle que soit l'orientation de ces dernières. En raison de la toxicité des produits de désinfection utilisés, ce type de procédé est essentiellement mis en œuvre dans un laboratoire, strictement hors présence humaine. Cette opération, indispensable, notamment dans le cadre du fonctionnement des laboratoires de sécurité biologique de niveau 3 (NSB3), se justifie en préalable à la maintenance périodique des locaux, mais aussi avant le déplacement d'un appareil hors zone de confinement, avant l'entretien *in situ* d'un appareil ou d'un système contaminé ou après une dissémination accidentelle de matières infectieuses.

La réglementation européenne

Les produits utilisés pour la DSVA sont définis comme des produits « biocides » au sens de la directive européenne Biocides 98/8/CE. L'Union européenne a établi un cadre réglementaire relatif à la mise sur le marché des produits biocides afin d'assurer un haut niveau de protection pour l'Homme, l'animal

et l'environnement. Depuis le 1^{er} septembre 2013, la mise en œuvre de cette directive est soumise au règlement européen n°528/2012 du 22 mai 2012, lequel comprend deux étapes :

- une évaluation des substances actives biocides, aboutissant ou non à leur inscription sur une liste positive européenne ;
- une évaluation des produits qui contiennent la (les) substance active (s), en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), nationale ou européenne, répondant à des exigences communes au niveau européen.

Parmi les 22 types de produits (TP) couverts par le règlement européen, les produits biocides utilisés pour la DSVA relèvent, dans le champ d'application visé par ce règlement, de la catégorie TP2. La mise en œuvre complète de cette réglementation suppose une période transitoire qui oblige actuellement les fabricants à déclarer leurs produits et procédés auprès du ministère en charge de l'écologie.

La réglementation française

La directive Biocides précitée a été transposée en droit français dans les articles R 522-1 à 522-47 du Code de l'environnement. De plus, l'arrêté du 19 mai 2004 définit les conditions relatives au contrôle de la mise sur le marché des substances actives biocides et à l'autorisation de mise sur le marché des produits biocides. Le rôle de surveillance du marché des procédés de DSVA a été confié à l'Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM), dans le respect de l'article L.3114-1 du Code de la santé publique (CSP) qui stipule que : «lorsqu'elle est nécessaire en raison, soit du caractère transmissible des infections des personnes hébergées, soignées ou transportées, soit des facteurs de risque d'acquisition des infections par les personnes admises dans ces locaux ou transportées dans ces véhicules, il doit être procédé à la désinfection par des produits biocides : 1) des locaux ayant reçu ou hébergé des malades et de ceux où sont donnés des soins médicaux, paramédicaux ou vétérinaires ; 2) des véhicules de transport sanitaire ou de transport de corps ; 3) des locaux et véhicules exposés aux micro-organismes et toxines mentionnés à l'article L.5139-1 du Code de la santé publique (Arrêté du 30 avril 2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines).».

Depuis 2007, le gouvernement français publie régulièrement des arrêtés amenant à interdire des substances biocides, sachant que lorsque l'on parle d'interdictions, celles-ci doivent être liées à un TP donné, avec pour conséquences le retrait par les fournisseurs de ces produits pour un usage déterminé. De fait, pour les procédés DSVA qui sont du ressort de la surveillance du marché par l'ANSM, ces interdictions ne concernent aujourd'hui que le secteur hospitalier. Au delà, l'utilisateur devra faire le choix de produits et procédés qui sont sur le marché en fonction des spécificités et des contraintes du ou des laboratoires pour lequel ils sont destinés.



Focus

Les normes européennes et françaises

Au regard des revendications déclarées par les fabricants, chaque produit recevant une AMM doit répondre, en termes d'efficacité, aux exigences décrites dans toutes ou partie des normes suivantes, en prenant en compte, le cas échéant, des exigences additionnelles selon leurs spécificités. A titre d'exemple citons les normes :

- NF EN 14348 pour une activité mycobactéricide ;
- NF EN 14476 et NF EN 14675 pour une activité virucide ;
- EN 1650, EN 1657 pour une activité fongicide ;
- EN 1276, EN 1656 pour une activité bactéricide ;

Il est à noter que cette liste n'est pas exhaustive et est en perpétuelle évolution. La consultation du site Internet de l'Afnor permet d'avoir une information actualisée. Pour les procédés de DSVA sur lesquels ce guide est focalisé, la norme française NF T 72-281 (2009) propose une méthode de détermination des activités bactéricide, fongicide, levuricide et sporicide, des procédés DSVA. Elle s'applique aux procédés automatiques et manuels, non pressurisés (type spray) ou pressurisés (limités à 10 bars). Début 2011, cette méthode a été proposée au niveau Européen () et des discussions sont en cours pour une future normalisation européenne par le comité européen de standardisation (CEN/TC 216 : "Methods of airborne disinfection of surfaces – Determination of bactericidal, fungicidal, yeasticidal, sporocidal and virucidal activity"). Dans le cadre de la révision prochaine de la norme française NF T 72-281, un chapitre sur la détermination de l'activité virucide sera intégré.

Focus sur l'utilisation en DSVA du formaldéhyde et de ses dérivés au regard de la réglementation

Les dispositions du décret n° 2001-97 du 1^{er} février 2001 établissant les règles particulières de prévention des risques cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR) et modifiant le Code du travail, s'appliquent pour le formaldéhyde et toute préparation qui en contient plus de 0,1%. L'arrêté du 13 juillet 2006 (modifiant l'arrêté du 5 janvier 1993 fixant la liste des substances, préparations et procédés cancérogènes au sens du deuxième alinéa de l'article R.231-56 du Code du travail) inclut le formaldéhyde. Bien que le formaldéhyde reste autorisé dans le cadre du TP2, cette position française, et peut-être future position européenne, a relancé les travaux sur la recherche d'alternatives au formaldéhyde. En effet, le formaldéhyde est classé cancérogène de groupe 1 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et classé cancérogène de catégorie 3 avec la phrase de risque R40 (« effet cancérogène suspecté : preuves insuffisantes ») dans la classification européenne.

Principes de la désinfection des surfaces par voie aérienne

La DSVA consiste à appliquer un produit biocide sur des surfaces, en utilisant l'air comme vecteur de diffusion. L'objectif de cette méthode est de désinfecter les surfaces (matériels, murs, sols) par l'émission dans l'atmosphère d'un produit biocide au moyen d'un appareil de dispersion automatisé. Il est important de souligner que ce procédé ne s'applique qu'à la désinfection des surfaces et en aucun cas ne peut s'appliquer à la désinfection directe de l'air. L'appareil doit diffuser le produit biocide de façon à ce que celui-ci entre en contact avec l'ensemble des surfaces du local à désinfecter. Au moins trois types d'appareils de dispersion sont actuellement disponibles

sur le marché et sont fondés sur les procédés de :

- nébulisation : la taille des gouttelettes est inférieure à 5 µm ;
- pulvérisation : la taille des gouttelettes varie de 10 à 50 µm ;
- évaporation flash : le produit biocide (exemple du peroxyde d'hydrogène) chauffé passe à l'état vapeur et est entraîné par un courant d'air dans le local à désinfecter.

Le niveau d'efficacité des produits biocides sera fonction du procédé de diffusion qui aura été choisi. En conséquence, l'évaluation de l'efficacité, de même que la validation au laboratoire d'un procédé, ne valent que pour un couple indissociable « appareil/produit ».

La préparation du local

La préparation du local à désinfecter est une étape préliminaire importante à ne pas négliger. En effet, une préparation insuffisante du local peut conduire à des résultats de désinfection non conformes ou à une dégradation des équipements. Cette phase inclut :

- un nettoyage et un bio-nettoyage ;
- la protection des appareils sensibles ;
- l'ouverture des portes et des tiroirs des meubles ;
- l'installation du matériel de désinfection ;
- la vérification de son état de marche ;
- le paramétrage de la centrale de traitement de l'air (CTA) ;
- la vérification de l'étanchéité du local ;
- le positionnement des indicateurs biologiques (IB) et chimiques.

Les différentes phases de la DSVA

Un cycle de DSVA peut se décomposer théoriquement en quatre phases successives qui peuvent être adaptées selon les besoins :

- la **phase de pré-conditionnement** pendant laquelle des conditions environnementales de température et d'hygrométrie dans le local à désinfecter sont obtenues à des fins d'efficacité optimale du traitement. Cette phase, optionnelle, est dépendante du procédé retenu ;
- la **phase de dispersion** du produit de désinfection par l'appareil dans le local à désinfecter ;
- la **phase de contact** entre le produit et les surfaces à désinfecter ;
- la **phase d'aération** destinée à l'élimination du produit de désinfection avant la réintroduction des opérateurs. Des contrôles d'ambiance peuvent être envisagés afin de mieux préciser le temps d'immobilisation du local à des fins de sécurité pour le personnel. Pour chaque produit les valeurs limites d'exposition (VLE) doivent être connues.

Temps de dispersion, temps de contact et granulométrie des gouttelettes du produit de désinfection

Les temps de dispersion et de contact du produit biocide avec les surfaces à désinfecter sont des paramètres à considérer plus particulièrement :

- le temps de dispersion est le temps nécessaire pour atteindre la concentration cible du produit sur la surface à désinfecter, dans un volume donné ;
- le temps de contact du produit avec les surfaces à désinfecter est le temps nécessaire pour atteindre l'efficacité biocide attendue.

Les appareils automatiques diffusent les produits biocides soit sous forme d'un gaz, soit sous forme de microgouttelettes. Concernant la taille de ces dernières, il a pu être établi une



Focus

relation avec leur temps de chute. L'exemple donné dans le **tableau 1** concerne un local au repos démontrant bien l'augmentation de la stabilité dans l'air au fur et à mesure de la diminution du diamètre de ces gouttelettes.

Tableau 1. Relation entre la taille des gouttelettes de biocide et leur temps de chute

Diamètre des gouttelettes	0,5 µm	1 µm	3 µm	10 µm	100 µm
Temps de chute	41 h	12 h	1,5 h	8 min	5 sec

Il est aussi important de retenir que la granulométrie des gouttelettes est dépendante de la viscosité des produits. Ainsi, pour un même procédé, deux produits de viscosité différente produiront des gouttelettes de granulométrie différente. Enfin, l'efficacité de la DSVa est dépendante de la stabilité dans l'air du produit biocide, lequel doit rester chimiquement stable pendant un temps suffisamment long pour conserver son pouvoir biocide. Un compromis doit être trouvé entre la stabilité chimique du produit pour obtenir une activité biocide optimale et sa dégradation post-désinfection rapide afin d'éviter sa rémanence sur les surfaces, à la fois dangereuse pour le

personnel et dommageable pour les installations. De fait il est important d'obtenir de la part du fournisseur du procédé (couple appareil/produit) des informations précises sur la granulométrie des gouttelettes, la vitesse de propulsion des gouttelettes dans l'air ou la distance maximale atteinte par ces gouttelettes en situation de fonctionnement normal dans un local au repos et le temps de stabilité chimique du produit.

Compatibilité du produit de désinfection avec les matériaux

Dans un laboratoire, les installations, équipements et matériels sont constitués d'une grande diversité de matériaux. De plus, de nouveaux équipements peuvent être régulièrement introduits et de nouveaux aménagements peuvent être entrepris. Il est important de s'assurer que les surfaces à désinfecter sont compatibles avec le produit choisi. En conséquence, il est nécessaire d'obtenir auprès du fabricant les informations relatives à son pouvoir corrosif et sa compatibilité avec les surfaces cibles à désinfecter. En effet, parmi les produits disponibles, beaucoup ont un caractère très acide et/ou oxydant (**Tableau 2**). Compte tenu de ces caractéristiques, il faut être conscient du fait qu'une trop forte condensation favorise la corrosion de nombreux matériaux.

Tableau 2. Exemple de produits biocides utilisés pour la DSVa

Produit	Formes	Conditions d'utilisation	Avantages	Inconvénients
Formaldéhyde	Liquide	3% à 10%	Large spectre d'activité	Fortement irritant, toxique, mutagène, carcinogène par inhalation
Formaldéhyde	Gaz	4 à 10 g/m ³ 18 - 22°C et 70% d'humidité	Large spectre d'activité	
Glutaraldéhyde	Liquide	2% pH optimal : 8	Large spectre d'activité	Irritant, toxique pour la peau et le tractus respiratoire. Activité fortement réduite en présence de souillures.
Dérivés du chlore : Hypochlorite de sodium, Dichloroisocyanurate de sodium, Chloramine T	Liquide	pH optimal : 6-7	Large spectre d'activité	Agressif. Sous-produits de désinfection toxiques. Activité réduite en présence de souillures
Dioxyde de chlore	Gaz	Soluble dans l'eau	Large spectre d'activité, à la différence du peroxyde d'hydrogène gaz, il peut tolérer une large gamme de températures et d'humidités	Produit <i>in situ</i> , corrosif
Acide peracétique	Liquide	Relativement instable : diminution de 0.4% par mois.	Actif à faible concentration en présence de souillures organiques et inorganiques. Activité intéressante sur les biofilms	Irritant pour les yeux et le tractus respiratoire.
Peroxyde d'hydrogène	Gaz Liquide	Utilisable de 5 à 35% environ. Relativement instable.	En fumigation : plus rapide et sûr que le formaldéhyde Plus stable que l'acide peracétique. Plus grande activité de la forme gaz / forme liquide	Suivant le procédé, peut nécessiter une maîtrise de l'humidité à un niveau bas. Certains appareils sont coûteux.



Focus

L'habilitation du personnel et la maintenance du procédé de désinfection

Il est nécessaire d'habiliter les opérateurs du laboratoire à l'utilisation, l'entretien et les contrôles du procédé de désinfection. Concernant le procédé, il est important, avant sa mise en place, d'obtenir des informations précises sur sa maintenance, son entretien et les contrôles appropriés. Sur certains types de matériel complexe, la mise en place d'un contrat d'entretien peut s'avérer nécessaire.

Critères pour la sélection d'un procédé de DSV

L'objectif à atteindre *in fine* lors du choix d'un procédé de DSV est l'obtention d'une efficacité microbicide sur les souches utilisées dans le laboratoire. L'évaluation de l'efficacité microbicide du couple appareil/produit doit se faire dans les conditions d'utilisation définies par le fabricant. Cette efficacité vis-à-vis des cibles connues manipulées dans le laboratoire est mesurable grâce aux indicateurs biologiques retenus comme représentatifs, en terme de résistance des micro-organismes manipulés par le laboratoire. Ces indicateurs biologiques permettront de valider le procédé de DSV utilisé.

Critères du couple appareil/produit

L'adéquation entre la puissance de diffusion du produit biocide par l'appareil et les volumes à traiter doit être appréciée. Les limites inférieures et supérieures de volume que peut traiter l'appareil doivent être précisées par le fournisseur. L'évaluation de l'efficacité microbicide doit se faire sur le couple appareil/produit, dans les conditions d'utilisation revendiquées par le fabricant. C'est pourquoi il est important d'obtenir de la part du fabricant les rapports d'essais complets qui doivent être en cohérence avec les revendications et conditions d'application. Pour toutes modifications techniques sur l'appareil relevant de la responsabilité du fabricant (par exemple, changements de buse, de pompe, etc.) celui-ci devra fournir les rapports d'essais actualisés. En terme de performances, les réductions logarithmiques minimales attendues par les fabricants, selon la norme NF T 72-281 (2009) doivent être respectivement supérieures ou égales à :

- 5 log pour une activité bactéricide ;
- 4 log pour une activité fongicide ;
- 3 log pour une activité sporicide ;
- pour l'activité virucide, si nous reprenons les chutes de titres des autres normes européennes, elle est fixée à un minimum de 4.

En complément de ces niveaux d'exigences normatives, une réflexion devra être menée au sein de chaque laboratoire afin d'adapter ces niveaux de performances aux risques liés aux agents biologiques manipulés.

Critères du laboratoire

La géométrie des locaux est plus ou moins complexe et les locaux plus ou moins cloisonnés. Par ailleurs, l'encombrement peut être très différent d'un local à l'autre, mais aussi dans le même local, d'une période à l'autre, d'une désinfection à l'autre. En conséquence, lors de la validation initiale des conditions d'application de la DSV décrite au chapitre suivant, puis lors des opérations successives de désinfection, une revue des locaux et des équipements est recommandée afin d'apprécier les évolutions et en évaluer leurs éventuels impacts. Afin de favoriser le brassage de l'air pour une meilleure diffusion du produit de désinfection dans les zones les plus difficilement

accessibles, on peut avoir recours à des by-pass aérauliques de désinfection et/ou à des ventilateurs judicieusement positionnés dans les SDAT. Une vigilance particulière doit être portée sur le risque de diffusion hors du local à traiter, eu égard à la toxicité du produit biocide.

Démarche de validation d'un procédé de DSV

La DSV doit faire l'objet de validations systématiques (qualifications biologiques) afin de s'assurer de l'efficacité du procédé. Celui-ci doit faire l'objet d'une validation initiale avant d'être utilisé en routine.

Il est important que les opérateurs et les personnes responsables de l'opération soient qualifiés pour l'application, la vérification et la décision de conformité de la DSV. Chaque laboratoire ayant sa propre organisation et sa propre configuration, il est difficilement envisageable de standardiser cette phase. Seuls seront présentés ici les grands principes.

Procédure de validation initiale

La validation initiale consiste à s'assurer que la DSV est adaptée aux locaux et aux activités concernés et qu'elle répond aux exigences fixées. C'est un pré-requis à la mise en activité d'un laboratoire confiné. Elle est la garantie que, utilisé en routine, le procédé sera optimal. De ce fait, cette procédure doit être validée, documentée et formalisée. Tous les paramètres critiques (température, hygrométrie, temps, etc.) doivent être contrôlés et si possible enregistrés en continu tout au long de la DSV. Toute évolution dans l'aménagement des locaux doit être appréciée afin, éventuellement, de reconsidérer la procédure de validation initiale. La phase de validation initiale comprend un plan détaillé du laboratoire confiné précisant :

- le choix des indicateurs biologiques (IB) ;
- le plan de positionnement des IB ;
- le plan de positionnement des indicateurs chimiques, si besoin et si disponible ;
- le plan de positionnement des DSV et des ventilateurs, si besoin.

Choix des indicateurs biologiques

Le choix de l'IB est primordial car il constitue la preuve de l'efficacité microbicide du procédé mis en œuvre. Parmi les critères biologiques pour le choix de ces indicateurs, doivent être pris en compte :

- la nature des micro-organismes à tester qui serviront d'IB ;
- la nature du support sur lequel ces micro-organismes tests sont déposés ;
- la présence éventuelle de matière interférente.

S'agissant du choix du micro-organisme, l'idéal serait de tester l'activité microbicide du couple appareil/produit sur les micro-organismes réellement utilisés dans le laboratoire. Cependant, certains micro-organismes ne peuvent être testés du fait de leur haut niveau de pathogénicité et/ou pour des raisons techniques (cas des virus par exemple). Dans ce cas, une revue bibliographique conduira à la sélection d'un modèle de microorganismes pertinent et représentatif. Il devra avoir un haut niveau de résistance permettant ainsi de couvrir un large éventail de microorganismes. Pour information, les fournisseurs recommandent classiquement d'utiliser *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus atropheus* comme IB. Ces deux micro-organismes sont utilisés depuis longtemps pour tester les procédés de stérilisation par chaleur humide ou sèche. Cependant, l'utilisation d'IB commerciaux peut parfois



Focus

présenter quelques inconvénients :

- le mode de préparation des IB commerciaux (séchage sur support à partir de suspensions de spores mises dans des solutions aqueuses ou alcooliques) n'est pas toujours représentatif des micro-organismes cibles (tels que les virus) qui peuvent être inclus dans des milieux complexes (milieu de culture, excréments, sécrétions biologiques, fèces, etc.) susceptibles d'interférer avec les produits désinfectants et d'en diminuer l'efficacité ;
- suivant l'opération de DSV, la remise en culture des coupons portant ces IB peut entraîner du produit désinfectant susceptible d'inhiber la germination et ainsi la croissance des formes végétatives.

La solution retenue pourrait être alors de fabriquer ses propres indicateurs biologiques. S'agissant de l'activité virucide, il faudra tenir compte des limites inhérentes à certains d'entre eux (perte plus ou moins forte du titre viral au séchage, production d'un stock viral trop faible, absence de lignée cellulaire pour la production et le titrage du virus, etc.). Le choix des indicateurs biologiques, qu'ils soient commerciaux ou maison, doit aussi tenir compte de la nature du support des micro-organismes : le support recevant l'IB ne doit pas interférer avec le produit de désinfection. Usuellement, on utilise un support en acier inoxydable, ou des lames de verre ou de plexiglas. Le support ne doit pas non plus favoriser une trop grande adsorption du produit de désinfection, lequel sera susceptible d'inhiber la culture des IB. Enfin, le dernier paramètre à prendre en compte dans le choix de ces IB, qui permettront de valider l'efficacité du procédé de DSV, est la présence de matières interférentes. En effet, dans certains cas, comme pour les animaleries de gros animaux ou les salles d'autopsie, l'activité microbicide doit être testée en condition dite « de saleté ». En effet, il existe une interférence entre des désinfectants à forte réactivité chimique (oxydants, aldéhydes, peracides, ammonium quaternaires, etc.) et les milieux organiques divers pouvant contenir les micro-organismes. Pour cela, il est nécessaire de déposer les IB sur un support contenant un milieu organique représentatif des matières organiques (sécrétions, excréments, fèces, sang, etc) intéressant l'opérateur. Usuellement le lait demi-écrémé au 1/20, l'albumine à 1% ou l'extrait de levure à 1% sont utilisés.

Une fois le choix de l'IB effectué, la validation de la DSV se fera par calcul du facteur de réduction de la population microbienne. Cette réduction s'apprécie par comparaison à un IB non exposé au produit décontaminant. En cas d'utilisation d'IB déshydratés, il est à noter que lors du séchage des pertes de titres de 1 à 3 log ne sont pas rares. Les supports peuvent entraîner du produit qu'il faudra neutraliser afin d'éviter une inhibition de croissance des micro-organismes ou un effet toxique sur le système cellulaire. Dans ce dernier cas, une filtration sur gel pourrait être envisagée. Idéalement, il est souhaitable de réaliser

trois fois le processus pour s'assurer de la reproductibilité des résultats et des critères de conformités établis quant aux résultats des IB. Lorsque les résultats ne sont pas satisfaisants, une analyse doit être faite pour comprendre pourquoi des IB ne sont pas totalement inactivés. Les questions suivantes doivent être posées : est-ce lié à un défaut de performance du procédé ou de son application ? Est-ce lié à une différence dans la résistance des IB d'un lot à l'autre ?

Le plan de positionnement des indicateurs biologiques

Celui-ci devra être établi en tenant compte du volume du local, de sa géométrie, de son encombrement, des PSM, des étuves et réfrigérateurs, des niveaux, de zones critiques particulières, etc. Il est recommandé de positionner ces indicateurs horizontalement et verticalement, de telle façon que le contact avec le biocide puisse se faire sur les 2 faces du coupon. Les indicateurs sont placés dans les endroits du laboratoire les plus difficilement accessibles au produit.

Le plan de positionnement des indicateurs chimiques

Lorsqu'ils existent, des indicateurs chimiques permettant de détecter la présence du produit décontaminant doivent être utilisés et positionnés dans les endroits les moins accessibles afin de permettre la détection d'une hétérogénéité éventuelle dans le traitement décontaminant.

Le plan de positionnement des appareils de DSV et des ventilateurs si besoins

Ce plan de positionnement devra faire apparaître la liste des appareils utilisés (nom, numéros de série d'appareil) dans le but de les replacer toujours aux mêmes endroits lors d'une DSV en routine.

Contrôles en routine

A chaque fois que la DSV est mise en œuvre, elle doit faire l'objet d'une qualification biologique. Cependant, en routine, il n'est plus nécessaire de placer les IB dans les endroits les plus difficiles d'accès, on peut se limiter aux zones critiques dont la contamination est la plus usuelle (lieux de manipulation, étuves, réfrigérateurs, stockages, zones de circulation du personnel, etc.). Cette phase de contrôle en routine suppose qu'aucun élément n'ait été modifié depuis la validation initiale (absence de modification du procédé de DSV lors de son entretien ou de sa maintenance – absence de réaménagement dans les locaux – absence de micro-organismes nouveaux manipulés dans le laboratoire, etc.). Si tel n'était pas le cas, une opération de validation initiale doit être réalisée à nouveau. Un point fondamental est la vérification des critères de conformité du cycle de désinfection, celui-ci devant être en totale cohérence avec ceux retenus lors de la validation initiale. C'est pourquoi, il est important que les paramètres de température et d'hygrométrie soient systématiquement enregistrés.



Focus

Conseils pratiques pour la mise en œuvre de la procédure de DSVa

Ce chapitre propose un ensemble de conseils pratiques pour la mise en œuvre d'une DSVa. Cette liste, issue de l'expérience et des réflexions du CMRBL, n'est pas exhaustive.

Phase préparatoire

Pendant la phase préparatoire, les entrées et les sorties de la zone NSB3 se font conformément aux procédures habituelles de travail.

Opérations	Description	Acteur
Rangement et désencombrement	Ranger tout le matériel à sa place si possible dans les placards ou tiroirs. Eliminer papiers et cartons ainsi que le petit consommable non conditionné en double emballage. Vider les baignoires	Personnel habilité NSB3 et formé à la désinfection
Calfeutrage des portes	Calfeutrer les portes extérieures (sas matériel et sas personnel) avec du ruban adhésif, si elles ne sont pas à joints gonflants, pour éviter les micro-fuites	
Protection du matériel qui ne doit pas être décontaminé	Protéger, en l'emballant hermétiquement, le matériel qui ne doit pas être décontaminé et qui ne sera donc pas accessible pendant la période d'ouverture du laboratoire (ex: microscope, matériel informatique, etc.). Scotcher les portes des enceintes contenant du matériel biologique pour en interdire l'accès. Si possible, fermer à clef ou avec des barres de protection ces enceintes.	
Préparation du matériel et des équipements	Afin que le produit décontaminant puisse entrer en contact avec toutes les zones, ouvrir les placards, tiroirs, meubles sous paillasse (s'ils sont vides), étuves, centrifugeuses, etc. Si compatible avec le produit décontaminant, mettre en marche les matériels de confinement (PSM, isolateurs, armoires ventilées, portoir ventilé) pour que le produit décontaminant passe au travers des filtres. Si les matériels de confinement ne sont pas compatibles avec le produit décontaminant, envisager de désinfecter les filtres à part. <i>Attention, la mise en marche des matériels de confinement peut aussi nuire à la diffusion du produit dans les locaux.</i>	
Nettoyage des surfaces	Nettoyer méticuleusement toutes les surfaces (paillasses, plans de travail, PSM, étuves, etc.) au moyen du produit détergent/désinfectant habituellement utilisé au laboratoire pour le nettoyage des surfaces.	
Elimination des déchets	Sortir l'ensemble des poubelles (après rangement, désencombrement et nettoyage) et les autoclaver. Eliminer les déchets liquides (eau des étuves, bain-marie, etc.), soit par autoclavage (cycle liquide), soit <i>via</i> la station de traitement des effluents, en les jetant à l'évier.	Personnel habilité NSB3 et formé à l'utilisation des autoclaves
Affichage	Afficher sur les congélateurs, réfrigérateurs et matériel non décontaminés une note «interdiction d'ouvrir/d'utiliser». Afficher à l'entrée du laboratoire qu'il est interdit de rentrer pendant la phase de désinfection.	Personnel habilité NSB3 et responsable de l'application de la procédure désinfection
Positionnement des indicateurs biologiques et chimiques	Préparer les indicateurs et les positionner selon la procédure validée. Le nombre d'IB sera fonction du volume de la pièce à désinfecter (généralement de 3 à 5 pour 10 m ²).	
Mise en place des appareils de DSVa	Vérifier au préalable que les appareils de DSVa fonctionnent. Les appareils de DSVa sont à positionner en fonction du volume à traiter et de l'encombrement de la pièce. Si possible, les disposer de façon à être visibles de l'extérieur afin de pouvoir vérifier l'état de fonctionnement. Vérifier que le volume de produit décontaminant est suffisant pour assurer le cycle de désinfection.	
Mise en place des ventilateurs	Si le laboratoire n'est pas équipé de « by-pass » de désinfection, utiliser des ventilateurs pour améliorer la diffusion du produit de désinfection : attention : ils doivent être disposés tel que cela a été validé et décrit dans la procédure de désinfection.	
Calfeutrer la porte d'entrée	Sortir de la zone à désinfecter et scotcher la porte d'entrée donnant accès à la zone.	

Phase de désinfection

Dès lors que les opérateurs sont sortis du local, la phase de désinfection peut débuter. Il est alors nécessaire de couper la ventilation ou de la mettre en by-pass.

L'appareil de DSVa va ensuite fonctionner pendant le temps défini au préalable lors de la phase de validation initiale. A l'issue du temps de contact, la ventilation est remise en marche.



Focus

Phase de post-désinfection

À ce stade l'entrée dans le laboratoire l'opérateur doit porter les EPI usuels.

Opérations	Description	Acteur
<i>Temps de ventilation</i>	Généralement deux à cinq heures mais selon le produit et le procédé utilisé, il est préférable de parler en vitesse de renouvellement de l'air. Chaque fabricant de produit décontaminant donne des indications en volume/h.	Personnel habilité NSB3 et responsable de la procédure de désinfection
<i>Vérification de l'absence du produit de désinfection</i>	Mesure de la concentration résiduelle dans l'air du produit désinfectant au moyen de tubes test et/ou d'un appareil de mesure. La mesure de la concentration du produit de désinfection doit donner un résultat conforme aux prescriptions de la fiche de sécurité du produit.	
<i>Vérification de l'efficacité de la désinfection</i>	Récupérer les IB et les mettre en culture ; cette opération est réalisée dans le laboratoire NSB3. Sortir les tubes bouchés après désinfection surfacique et les mettre à incuber. Vérifier tous les jours pendant au moins cinq jours la croissance de l'IB dans les tubes.	
<i>Validation de la désinfection</i>	La désinfection peut être validée dès lors que les IB les plus exposés au produit de désinfection sont restés négatifs après le temps de culture requis et que les indicateurs chimiques sont positifs.	
<i>Certificat de désinfection</i>	Etablir un certificat de désinfection qui pourra être remis à toutes sociétés intervenant dans le NSB3 pour contrôles et maintenances.	Responsable laboratoire + personne en charge de l'installation et du management du risque + Directeur du laboratoire
<i>Autorisation d'ouverture du laboratoire</i>	Ôter les affiches interdisant l'entrée de la zone de confinement.	Personnel habilité NSB3 et procédures désinfection

Protection et sécurité du personnel

Phase préparatoire à la désinfection	Description
<i>Type de protection</i>	Protection contre le risque biologique : EPI habituellement utilisés dans le laboratoire NSB3.
<i>Consignes de sécurité</i>	Placer les affiches «désinfection en cours» Respect des consignes relatives au travailleur isolé : port d'un PTI ou présence de deux personnes obligatoirement à l'intérieur et une personne avertie à l'extérieur en cas d'urgence.
Phase de lancement de la désinfection	Description
<i>Type de protection</i>	Pour la mise en marche de l'appareil : EPI habituels mais avec masque de protection contre la contamination chimique équipé d'un filtre chimique adapté au désinfectant utilisé (par exemple: masque à gaz mono-cartouche avec visière panoramique et filtre chimique).
<i>Consignes de sécurité</i>	Travailler en binôme avec surveillance depuis l'extérieur d'au moins une personne qui peut intervenir en cas de besoin.
Phase de vérification de la désinfection	Description
<i>Type de protection</i>	EPI adapté au risque biologique et masque chimique adapté au désinfectant utilisé (cf. supra).
<i>Consignes de sécurité</i>	Travailler en binôme avec surveillance, depuis l'extérieur, d'au moins une personne qui peut intervenir en cas de besoin

Conclusion

La désinfection des surfaces d'un laboratoire confiné est une opération importante et délicate, tant pour la sécurité des utilisateurs que pour l'environnement du laboratoire. Cette opération doit donc être menée avec rigueur et méthode, l'objectif étant d'atteindre le risque zéro contamination. Eu égard aux nombreux paramètres intervenant dans cette opération, nous avons vu qu'il n'existait pas de procédé, ni de méthode universelle. Seule une très bonne connaissance de la

problématique du laboratoire concerné, de son fonctionnement, à laquelle s'ajoute la formation de personnels qualifiés, seront les garants de la réussite de l'opération. La mise en œuvre d'une opération de DSVa est relativement lourde et coûteuse. Aussi, lorsque celle-ci a été validée, recommandons-nous de rédiger de manière détaillée l'ensemble du protocole afin de pouvoir aisément reproduire l'opération. La traçabilité des documents est importante à réaliser car elle est souvent une aide à la reconstitution de l'historique en cas d'incident.



Focus

Définitions et acronymes

Afnor : Association française de normalisation

AMM : Autorisation de mise sur le marché

Animalerie A3 : animalerie de confinement de niveau biologique 3 conformément à l'arrêté du 16/07/2007

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

Aérosol : suspension de particules solides ou liquides dans un gaz présentant une vitesse de chute négligeable

Agents biologiques : micro-organismes, y compris ceux obtenus par ingénierie génétique, culture de cellules et endoparasites, pathogènes ou non.

Agents biologiques pathogènes : agents biologiques susceptibles de provoquer une infection, une allergie ou une toxicité ou de constituer de toute autre façon un risque pour la santé humaine.

Biocide : on entend par produits biocides les préparations contenant une ou plusieurs substances actives biocides qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, qui sont destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique. Un produit désinfectant utilisé dans le cadre de la DSVA est un produit biocide.

Bio-nettoyage : opération qui associe un nettoyage et une désinfection

By-pass de désinfection : système aéraulique permettant la ventilation du laboratoire en circuit fermé.

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CMR : Cancérogène, mutagène, toxique pour la reproduction

CMRBL : Comité de maîtrise des risques biologiques en laboratoire

Confinement : ensemble de mesures techniques et d'actions visant à maintenir un agent biologique ou une autre entité à l'intérieur d'un espace déterminé.

Contaminant : toute entité particulière, moléculaire, non particulière ou biologique susceptible de produire un effet indésirable sur un produit, un procédé, un organisme ou sur l'environnement en général.

Contamination : phénomène d'interaction par contact entre deux entités, l'une étant le contaminant l'autre la cible, impliquant une perturbation de la cible et dont les conséquences peuvent être diluées dans le temps.

CTA : centrale de traitement de l'air

CSP : Code de la santé publique

Désinfection : Opération consistant en la réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice inerte, atteinte par l'action irréversible d'un produit chimique ou d'un procédé physique sur leur structure ou leur métabolisme, à un niveau jugé acceptable pour un objectif défini.

Selon la norme Afnor NF T 72-101 : la désinfection est «l'opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés »

Désinfection chimique : selon la norme EN 15889-1: «action d'un ou plusieurs produits chimiques dont le principal objectif est d'être microbicide»

DSVA : Désinfection des surfaces par voie aérienne : opération au résultat momentané permettant de réduire à un niveau acceptable la contamination de milieux ou de surfaces inertes par des micro-organismes, en fonction des objectifs fixés par l'évaluation des risques. Cette opération, réalisée au moyen d'un procédé dont les principes actifs sont des agents chimiques sous forme gazeuse ou de dispersa, est destinée à la désinfection des surfaces au sein d'un volume donné, quelle que soit l'orientation de ces dernières.

DI5° : Dose infectant 50% des tissus ou espèces cibles.

Dispersa : dispersion de micro-gouttelettes dans l'air.

EPI : Equipement de protection individuel

IB : Indicateur Biologique

Inactivation : destruction partielle ou totale d'une activité donnée ou destruction du système microbiologique.

Infecté : contaminé par des agents biologiques étrangers qui s'y multiplient et capable ou non de s'y reproduire.

Laboratoire NSB3 : laboratoire confiné de niveau 3 de sécurité biologique

Micro-organisme : toute entité microbiologique, cellulaire ou non cellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique

Non-conformité : non-satisfaction d'une exigence.

NSB3 : Niveau de Sécurité Biologique pour la manipulation des micro-organismes de classe 3 tels que définit par l'arrêté du 18 juillet 1994.

PSM : Poste de sécurité microbiologique : enceinte ventilée destinée à assurer la protection de l'utilisateur et de l'environnement contre les dangers liés aux aérosols dans la manipulation de micro-organismes potentiellement dangereux et dangereux, l'air rejeté dans l'atmosphère étant filtré.

Procédé automatique de désinfection : procédé qui diffuse un gaz ou un dispersat, solide ou liquide, à partir d'une source émettrice, hors présence humaine.

Procédure : description des opérations à effectuer, des précautions à prendre dans un domaine, directement ou indirectement en rapport avec les micro-organismes ou toxines.

PTI : Protection du travailleur isolé

Qualification d'un matériel, d'un équipement, d'un local : opération destinée à démontrer qu'un matériel/équipement/local fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus.

Risque : probabilité de survenue d'un danger causant un dommage et degré de gravité de ce dommage.

REACH : *Registration, evaluation and authorisation of chemicals* : règlement européen sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Il est entré en vigueur le 1^{er} juin 2007.

SDAT : Salles dédiées aux activités techniques : salles dans lesquelles sont manipulés des échantillons, des corps et des animaux, contaminés ou susceptibles d'être contaminés par des agents biologiques pathogènes, ainsi que les salles dans lesquelles sont manipulés, de façon délibérée, des agents biologiques pathogènes.

Temps de contact : temps nécessaire pour atteindre l'efficacité attendue.

Temps de dispersion : temps nécessaire pour atteindre une concentration définie du produit dans un volume donné.

TP2 : Type de produits 2 : désinfectants utilisés dans le domaine privé et dans le domaine de la santé publique et autres produits biocides.

Validation : établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés.

VLE : valeur limite d'exposition

Zone de confinement : zone construite et utilisée (et équipée d'un système approprié de traitement et de filtration de l'air) de manière à éviter que l'environnement extérieur ne soit contaminé par des agents biologiques provenant de cette zone.