Institut Scientifique de Santé Publique

Section Biosécurité et Biotechnologie

Enceintes de Sécurité Microbiologique

Service Public Fédéral (SPF) Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement

Team Contained use, Section Biosécurité et Biotechnologie
Institut Scientifique de Santé Publique

Bibliothèque Royale de Belgique, numéro de dépôt : **D/2006/2505/20**
28 mars 2006

Adresse de correspondance :
Rue J.Wytsman, 14, B-1050 Bruxelles
http://www.iph.fgov.be

Adresse visiteurs :
Av. de la Couronne, 153 B-1050 Bruxelles
http://www.biosafety.be

Auteurs: **Dr P. Herman**
Dr Ir K. Pauwels

Chef de Section ff: **Dr Ir M. Sneyers**

Avertissement: le contenu de ce document repose sur les données disponibles dans la littérature et les normes en vigueur. Il s'agit de recommandations de biosécurité et non pas de mesures contraignantes ou normatives.

Enceintes de Sécurité Microbiologique

Tables des matières

1. Introduction

2. Généralités, définitions et spécifications techniques

- **2.1. ESM de classe I**
- **2.2. ESM de classe II**
- **2.3. ESM de classe III**

3. Choix d'une enceinte de sécurité microbiologique

4. Utilisation d'une enceinte de sécurité microbiologique

- **4.1. Localisation de l'ESM**
- **4.2. Procédure de mise en fonction et d'arrêt de l'ESM**
- **4.3. Maintenance et "certification"**
- **4.4. Déversements accidentels ("Spills")**
- **4.5. Nettoyage et désinfection**
- **4.6. Décontamination**
- **4.7. Equipement de protection individuel**
- **4.8. Alarmes**

5. Références et liens utiles

Annexe 1: Filtre absolu à haute efficacité
Annexe 2: Lampes UV

1. Introduction

Une enceinte de sécurité microbiologique (ESM) est un équipement de sécurité courant dans la plupart des laboratoires de recherche, les laboratoires de microbiologie et l'industrie pharmaceutique. L'objectif de ces pages est de prÈsenter aux responsables de laboratoires, aux Ètudiants et au personnel de laboratoire en général les différents types d'ESM aussi appelées "postes de sécurité microbiologique" existants. Leur description, ainsi que des consignes d'utilisation pour ceux qui manipulent des (micro-)organismes génétiquement modifiés (OGM) et/ou pathogènes font l'objet des pages référencées ci-dessous.

2. Généralités, définitions et spécifications techniques

Les Enceintes de Sécurité Microbiologique sont des chambres de manipulation utilisées pour assurer la sécurité du manipulateur et de l'environnement lors de manipulations susceptibles de générer des aérosols infectieux. Elles devraient être conçues afin de satisfaire à des performances et certifiées sur base d'au moins une norme internationale en vigueur.

On distingue trois classes d'ESM, les ESM de classe I, de classe II et de classe III.

2.1. ESM de classe I: enceinte de manipulation partiellement ouverte sur le devant et construite de manière à minimiser, grâce à un système d'aspiration créant une dépression, l'échappement d'aérosols générés à l'intérieur de celle-ci. La circulation de l'air est similaire à celle d'une hotte chimique. Toutefois, l'air évacué en partie haute doit être filtré au travers d'au moins un filtre HEPA avant rejet. Le flux d'air entre à une vitesse comprise entre 0,7 et 1 m/s et n'est pas filtré. Ce type d'enceinte assure une protection du manipulateur et de l'environnement mais pas de l'échantillon manipulé. La face frontale est constituée d'une paroi transparente qui délimite une ouverture fixe et comprise entre 20 et 25 cm. L'air sortant peut Ître rejeté directement dans le laboratoire ou à l'extérieur via un système d'évacuation.

2.2. ESM de classe II: enceinte de manipulation partiellement ouverte sur le devant, dans laquelle s'écoule verticalement un flux d'air laminaire descendant stérile et construite de manière à minimiser, grâce à une dépression créant un flux d'air entrant en façade ("barrière d'air" ou "veine de garde"), l'échappement d'aérosols générés à l'intérieur de celle-ci. Le courant laminaire d'air qui s'écoule dans le volume de travail est aspiré au voisinage du plan de travail ou au travers de celui-ci lorsqu'il est perforé. L'air sortant en partie haute doit Ître filtré au travers d'au moins un filtre HEPA et peut être rejeté directement dans le laboratoire ou à l'extérieur via un système d'évacuation. Ce type d'enceinte assure une protection du manipulateur, de l'environnement et de l'échantillon manipulé. La norme européenne relative aux critères de performance pour les postes de sécurité microbiologique (norme EN12469) prévoit des dispositions pour la sécurité environnementale.

Complément d'information: la chambre de manipulation est alimentée par un flux d'air filtré (filtre absolu), uniforme et unidirectionnel, dirigé vers le bas. La laminarité du flux est assurée par la géométrie de la chambre de manipulation et celle de la chambre de surpression en amont du filtre et par une répartition homogène de la vitesse du flux : 0,4 m/s ± 20% en tous points. Le flux est repris dans les bandeaux d'aspiration à l'avant et à l'arrière du plan de travail puis soufflé par le ventilateur dans la chambre de surpression et dirigé vers le filtre de rejet ou à nouveau dans la chambre de manipulation après filtration. L'éclairage est situé en dehors de la chambre afin de ne pas perturber le flux laminaire. La vitesse de l'air laminaire est comprise entre 0,25 et 0,45 m/s (idéalement 0,40 m/s) et celle du flux d'air entrant entre 0,38 et 0,70 m/s (idéalement 0,50 m/s). La face frontale est constituée d'une fenêtre glissante, amovible ou fixe en verre sécurit avec une ouverture de 20 ou 25 cm lors des manipulations. Contrairement aux enceintes de classe I, l'échantillon est protégé des contaminations croisées pouvant venir du volume de travail par le flux laminaire vertical filtré et des

contaminations extérieures par le fait que l'air entrant en façade est directement piégé dans des orifices placés en partie avant du plan de travail. Selon le modèle choisi, ces enceintes seront équipées de un ou de deux motoventilateurs et de lampes UV.

Types d'ESM de classe II: type A et B

- Dans les ESM de type IIA, l'air potentiellement contaminé est transféré vers la partie supérieure et le ventilateur sans filtration. Dans certains dispositifs selon l'emplacement du/des ventilateur(s), le conduit de transfert vers la partie supÈrieure est sous pression positive des fuites d'air contaminé pourraient donc survenir dans le laboratoire ou dans le volume de travail (conception d'enceinte déconseillée). Dans les autres réalisations, le conduit est sous pression négative et les fuites d'air sont alors évitées.

- Dans les ESM de type IIB, le conduit de transfert ne transporte que de l'air filtré et sous pression négative. L'intérêt des ESM de classe II type B réside dans le fait qu'ils permettent la manipulation de substances toxiques volatiles.

2.3. ESM de classe III : ce type d'ESM fournit la protection la plus élevée pour le personnel et est utilisée pour la manipulation de micro-organismes de classe de risque 4. Toutes les voies de pénétrations sont scellées de manière à les rendre étanches à l'air. L'air entrant est filtré sur filtre HEPA et l'air sortant passe également au travers de filtres HEPA. Le flux d'air est assuré par un système d'évacuation extérieur à l'enceinte, ce qui a pour effet de maintenir une pression de l'air négative à l'intérieur de l'enceinte (200 Pa recommandés par la norme EN 12469). L'accès à la surface de travail se fait au travers de gants épais en caoutchouc qui sont fixés aux orifices de l'enceinte. L'ESM de classe III doit être équipé d'une boîte pouvant passer au travers de l'enceinte. Cette boîte doit pouvoir être stérilisée et est munie d'un filtre HEPA. En l'absence de cette boîte, l'ESM de classe III doit pouvoir être connectée à une autoclave à double entrée de manière à pouvoir décontaminer le matériel entrant et sortant de l'enceinte. Les ESM de classe III conviennent pour les manipulations dans les laboratoires de niveau de confinement 3 et 4.

Complément d'information: L'unité de pression dans le système international est le Pascal (Pa)[1]. La pression est le témoin du poids d'un fluide (air, eau ou solide). Pour la pression on utilise indifféremment le pascal, le bar et plus rarement le millimètre de mercure. Définition en mécanique des fluides : contrainte qui, agissant sur une surface plane de 1 mètre carré, exerce sur cette surface une force totale de 1 Newton. Pression uniforme qui, agissant sur une surface plane de 1 mètre carré, exerce perpendiculairement à cette surface une force totale de 1 Newton.

3. Choix d'une enceinte de sécurité microbiologique

Avant de choisir une enceinte de sécurité microbiologique (ESM), il s'agit d'établir une évaluation du risque biologique afin de déterminer la classe de risque de l'activité. Le type d'ESM choisi dépendra de la classe de risque du micro-organisme manipulé, de la nature des manipulations envisagées et de la nécessité ou non de protéger le matériel biologique manipulé. La classe de l'ESM (I, II ou III) n'est pas directement liée à la classe de risque de l'activité projetée.

En pratique, une ESM doit être choisie en fonction de la protection nécessaire: protection du "produit" et/ou protection du personnel contre les micro-organismes génétiquement modifiés ou non de la classe

[1] 1 Pa = 1 Newton/m2. 1 millibar (mbar) = 1 hecto pascal (hpa). La pression atmosphérique au niveau de la mer est en moyenne de 1013 mbar ou 760mm de mercure.

de risque 1 à 4. La protection du personnel contre les composés toxiques volatils et les radionuclides ou une combinaison des deux doit aussi être envisagée. Dans tous les cas de figure la protection de l'environnement sera assurée. Le tableau 1 présente le type d'ESM recommandé pour chaque usage. Le plus souvent les ESM sont équipés de lampes UV.

Tableau 1: les différentes classes d'ESM et le type de protection offerte

Classe d'ESM		**Protection**		
		Matériel biologique Manipulé	Manipulateur	Environnement
Classe I	*Hotte aspirante*	✘	✓	✓
Classe II	*A1, A2*	✓	✓	✓
	B1, B2			
Classe III	*"boîte à gants"*	✓	✓	✓

Exemples d'utilisation des ESM en fonction des organismes pathogènes manipulés:

- L'utilisation d'une ESM de classe I ou II est recommandée pour les manipulations visant la primo identification et l'identification des espèces du complexe *M. tuberculosis* (voir: http://www.biosafety.be/CU/ClinLab/ClinLabFR.html)
- La manipulation de cultures cellulaires. Les risques d'infections secondaires liés à la manipulation de cultures cellulaires, justifient l'utilisation d'une ESM de classe II. (voir "animal cell cultures": http://www.biosafety.be/CU/animalcellcultures/mainpage.html)
- La manipulation d'adénovirus recombinants
(voir: http://www.biosafety.be/CU/Annexes/virFR.html#P21)
- La production de vecteurs lentiviraux recombinants
(voir: http://www.biosafety.be/CU/Annexes/virFR.html#P23)

Utilisation des ESM en fonction du niveau de confinement adopté:

- L'utilisation d'une ESM n'est pas obligatoire dans un laboratoire de niveau de confinement L1, ni dans une animalerie de niveau de confinement A1.
- L'utilisation d'une ESM (classe I ou II) est optionnelle (sera rendue obligatoire ou non en fonction d'une évaluation au cas par cas) dans un laboratoire de niveau de confinement L2, ou dans une animalerie de niveau de confinement A2.
- L'utilisation d'une ESM (classe I ou II) est obligatoire dans un laboratoire de niveau de confinement L3, ou dans une animalerie de niveau de confinement A3.
- L'utilisation d'une ESM (classe III, si classe II: combinaison intégrale avec surpression interne) est obligatoire dans un laboratoire de niveau de confinement L4, ou une animalerie de niveau de confinement A4.

Remarque: Les hottes à flux d'air horizontaux ou verticaux de type "clean-air work stations", hottes chimiques etc., ne sont pas des ESM et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme tel.

4. Utilisation d'une enceinte de sécurité microbiologique

Voici quelques recommandations, basées sur le bon sens, concernant les précautions d'emploi d'une ESM de Classe II, la plus répandue des ESM dans les laboratoires de recherche, les laboratoires de microbiologie et de l'industrie pharmaceutique. Ces recommandations sont présentées dans le **tableau 2** sous la forme "Faire/ne pas faire". Cette liste n'est pas exhaustive mais énumère les points cruciaux. Le manipulateur joue un rôle prépondérant dans sa propre protection et celle du matériel biologique qu'il manipule. Ces recommandations ne font pas mention des "bonnes pratiques de laboratoire" ni de la formation du personnel qui sont essentielles mais qui sortent du cadre de ces pages.

Tableau 2 : "Faire/ne pas faire" lors de l'utilisation d'une ESM

"Faire"	"Ne pas faire"
Bien distinguer les différentes classes d'ESM avant toute utilisation	Ne pas placer de récipient hors de l'ESM pour y déposer les pipettes ou tout autre matériel potentiellement contaminé pendant les manipulations
Prendre connaissance du fonctionnement de l'ESM avant son utilisation	Ne pas obstruer les grilles d'aération avec du papier ou tout autre objet
Planifier les manipulations (matériel nécessaire, séquences des manipulations) de manière à éviter les passages de matériel (entrée-sortie) pendant le fonctionnement de l'ESM	Si l'ESM est équipée de lampes UV: ne pas mettre la(les) lampe(s) UV en fonction pendant l'utilisation de l'ESM
Respecter la procédure de mise en fonction et d'arrÍt de l'ESM	Ne pas faire de rapides entrées ou sorties des mains et des avant-bras dans l'enceinte
Utiliser un micro-brûleur ou -incinérateur (brûleur de sécurité électronique) plutôt qu'une flamme qui perturbe le flux d'air dans l'enceinte	Ne pas placer de documents sur la vitre de l'ESM afin de ne pas gêner la vue du manipulateur
Avant et après les manipulations dans l'ESM, les mains et les avant-bras doivent Ítre lavés avec un détergent germicide	Ne pas ouvrir ou fermer la porte/fenêtre du laboratoire afin d'éviter les déplacements d'air qui permettrait à des organismes de franchir la barrière d'air du flux dans l'ESM
Veiller à laisser les grilles d'aération libres et manipuler au centre de la zone de travail	Ne pas placer hors de l'ESM du matériel (pipettes, boîtes, flacons, etc.) qui doit être utilisé pendant l'activité projetée

4.1. Localisation de l'ESM

L'emplacement choisi pour l'ESM est primordial pour assurer son bon fonctionnement. Idéalement l'ESM doit être située à distance des passages et des courants d'air afin de ne pas perturber le flux entrant (0.45 m/s en moyenne). Un espace d'au moins 0.30 mètre est libéré autour de l'ESM (sur les côtés et à l'arrière) pour faciliter l'accès en cas d'entretien. Un espace d'au moins 0.30 à 0.35 m au dessus de l'ESM est requis pour permettre une mesure facile de la vitesse de l'air expulsé ainsi que le

changement des filtres d'évacuation. Le **tableau 3** reprend quelques distances minimales conseillées entre: 1) la face frontale de l'ESM et d'autres équipements et 2) entre l'extrémité de l'ESM et un obstacle.

Tableau 3 : distances minimales conseillées

Entre la face frontale de l'ESM et:	Entre l'extrémité de l'ESM et:
un passage habituel: 1 m	un mur (un obstacle perpendiculaire): 0,3 m
un "bench" parallèle à l'ESM: 1,5 m	un pilier faisant face à l'ESM: 0,3 m
un mur opposé (ou tout autre obstacle): 2 m	une porte dans un mur parallèle à l'ESM: 1 m
une porte (mur perpendiculaire à l'ESM): 1,5 m	
la face frontale d'un autre ESM: 3 m	

Les effets de la ventilation du local (air conditionné, mouvement de l'air) sur le fonctionnement d'une ESM et les turbulences engendrées dans les ESM ont été étudiés (Rake BW, 1978 , Clarck RP, 1990). Il est conseillé de limiter toutes les autres activités dans le local pendant l'utilisation de l'ESM. Ces activités pourraient pertuber l'écoulement d'air dans l'ESM.

4.2. Procédure de mise en fonction et d'arrêt de l'ESM

L'ESM ne doit pas nécessairement être mis en fonction 24h/24, cette pratique peut réduire la durée de vie des filtres HEPA.

Avant d'utiliser l'ESM
- Si l'ESM en est équipé, vérifier que les lampes UV sont éteintes;
- Mise en fonction 15/20 minutes avant toute manipulation;
- S'assurer qu'aucun objet n'obstrue les grilles d'aération;
- Si l'ESM est équipé d'une alarme, mettre cette alarme en fonction;
- Désinfecter les surfaces intérieures de l'ESM;
- Placer le matériel qui sera nécessaire à la manipulation;
- Si nécessaire, séparer le matériel "sale" du matériel "propre"

Arrêt de l'ESM en fin de manipulation
- Fermer les tubes, flacons et boîtes avant de les sortir de l'ESM;
- Désinfecter la surface des objets présents dans l'enceinte avant de les sortir;
- Désinfecter les surfaces intérieures de l'ESM;
- Laisser encore l'ESM en fonction 5/10 minutes avant son arrêt.

4.3. Maintenance et "certification"

Un attention particulière doit être portée au remplacement des filtres HEPA et/ou des préfiltres. Cette opération est effectuée à la suite d'une alarme (si l'ESM en est équipée) ou d'une perte de charge du filtre concerné (mesure à l'aide d'un manomètre). Si l'assemblage des filtres prévu par le constructeur ne garantit pas la sécurité du personnel, le changement des filtres doit Ítre précédé d'une fumigation.

Un contrôle "périodique" de l'ESM par le fabriquant ou une société spécialisée est recommandé. Le plus souvent ce contrôle consiste en une visualisation de l'écoulement dans l'ouverture de l'enceinte et en une mesure de vitesse et de la "propreté" de l'air dans le flux d'air descendant. Il est conseillé de faire contrôler les critères de performance de l'ESM définis dans la norme EN 12469 sur une base annuelle.

Toute réparation sur une ESM doit être réalisée par du personnel technique qualifié. Tous les dysfonctionnements ou anomalies constatés doivent être rapportés au responsable du laboratoire et doivent faire l'objet d'une réparation avant toute utilisation subséquente de l'ESM.

4.4. Déversements accidentels ("Spills")

Quand un déversement accidentel survient dans une ESM la décontamination doit être assurée immédiatement pendant que l'ESM est toujours en fonction. Un désinfectant approprié doit être appliqué sur la surface de travail de maniére à minimiser la formation d'aérosols infectieux. Tout le matériel qui est entré en contact avec le liquide répandu dans l'ESM doit être désinfecté ou autoclavé. Du papier absorbant est disponible à proximité de l'ESM ("Spill Kit"). Le matériel nÈcessaire à la décontamination et une procédure écrite doivent être à la disposition du personnel de laboratoire.

4.5. Nettoyage et désinfection

La surface de tous les éléments présents dans l'ESM doit être décontaminée quand une manipulation est terminée (la présence de milieu de culture résiduel peut servir de support à la croissance bactérienne). Les surfaces intérieures de l'ESM sont désinfectées avant et après chaque utilisation. Une solution d'eau de javel ou préférablement d'éthanol à 70% peut être utilisée. Un passage à l'eau stérile est nécessaire après l'application du désinfectant si celui-ci est corrosif.

Remarque: l'usage de désinfectants tels que des solutions à base de phénol, des amoniums quaternaires ou des aldéhydes sont recommandés par la norme EN 12469 pour les surfaces.

Il est recommandé de maintenir l'ESM en fonction pendant la désinfection. L'ESM est éteint au minimum 5 minutes après la désinfection de manière à "purger" l'atmosphère de l'enceinte.

4.6. Décontamination

L'ESM doit être décontaminée:

- avant le changement de filtre(s) (et éventuellement pré-filtre);
- avant la recherche de fuites autour des filtres;
- après un déplacement de celle-ci dans le même local ou dans un autre laboratoire;
- après contact de matériel biologique infectieux sur des surfaces inaccessibles.

La méthode de décontamination la plus commune est la fumigation aux vapeurs de formaldéhyde. La décontamination de l'ESM par cette méthode doit être réalisée par du personnel technique qualifié. La fumigation est utile pour décontaminer les parties difficilement accessibles par les méthodes manuelles. Des recommandations sur la procédure de fumigation et les raisons pour lesquelles elle doit être effectuée sont définies dans la norme EN 12469.

4.7. Equipement de protection individuel

Un équipement de protection individuel doit être porté même lors de l'utilisation d'une ESM. Le tablier de laboratoire sera adapté à la situation et au niveau de confinement du laboratoire. Les gants seront portés de manière à ce que l'extrémité de la manche soit dans le gant et non l'inverse. Dans certains cas le port d'un masque et/ou de lunettes de protection peut être exigé.

4.8. Alarmes

Deux types d'alarme peuvent équiper l'ESM. Une alarme qui prévient le manipulateur lorsque la position de la vitre frontale de l'ESM est mal postionnée. Il suffit de placer la vitre correctement pour que l'alarme cesse. L'autre alarme prévient le manipulateur en cas de dysfonctionnement de la circulation de l'air dans l'enceinte. Dans ce cas, le manipulateur est en danger et le travail en cours doit être interrompu immédiatement. L'incident est rapporté au responsable du laboratoire.

5. Références et liens utiles

Normes internationales

- NBN EN 12469: Biotechnologie - Critères de performance pour les postes de sécurité microbiologique. 1ere édition, Indice de classement S 46. Bruxelles, Institut belge de normalisation (IBN), 2000.

- NBN EN 12741: Biotechnologie - Laboratoires de recherche, développement et ananlyse - Guide pour les opérations de laboratoires biotechnologiques. 1ere édition, S 46. Bruxelles, Institut belge de normalisation (IBN), 1999.

- NF X 44-201: Postes de sécurité microbiologique. Définitions - classification - caractéristiques. Exigences de sécurité. Essais. Paris, La défense, AFNOR, 1996.

- BS 5726: Microbiological safety cabinets. Part 1: Specification for design, construction and performance prior to installation. Part 2: Recommendations for information to be exchanged between purchaser, vendor and installer and recommendations for installation. Part 3: Specification for performance after installation. Part 4: Recommendations for selection use and maintenance. London, British Standards Institution (BSI), 1992.

- DIN 12950: Teil 10. Laboreinrichtungen. Sicherheitswerkbanke fur mikrobiologische und biotechnologiste Arbeiten. Anforderungen; Prutung. Berlin, Deutsches Institut fur Normung (DIN), 1991.

- NSF 49: Class II (laminar flow) Biohazard Cabinetry. Ann Harbor, National Sanitation Foundation (NSF), 2002.

Généralités sur les ESM

- Laboratory Biosafety Manual, World Health Organization, 3rd Ed. Chapter 10.

- Laboratory Biosafety Guidelines, 3rd Edition, Public Health Agency of Canada, Chapter 9.

- Kruse RH, Puckett WH, Richardson JH. Biological Safety Cabinetry. Clin Microbiol Rev, 1991; 4 (2): 207-241.

- Stuart DG. Hazard Control: Primary Barriers: Biological Safety Cabinets, Fume Hoods and Glove Boxes, in: Biological Safety, Principles and Practices. Third Edition. Fleming DO and Hunt DL ed. ASM Press, Washington DC. 2000. p. 313.

- Anthology of Biosafety, I. Perspectives on Laboratory Design, Chapter 3: Primary Biocontainment devices, American Biological Safety Association, J-Y Richmond, PhD, Editor.

Filtres HEPA

- NBN EN 1822-1: Filtres à air à très haute efficacité et filtres à air à très faible pénétration (HEPA et ULPA) - Partie 1: classification, essais de performance et marquage. 1ere édition. Bruxelles, Institut belge de normalisation (IBN), 1998.

- Harstad JB, Filler ME. Evaluation of air filters with submicron viral aerosols and bacterial aerosols. Am Ind Hyg Assoc J, 1969; 30: 280-290.

- Kruse RH, Kruse CJ. Class II (laminar flow) biological safety cabinets. In situ testing using submicron particules. p. 46-55. In Humphrey KL (ed.), Proceedings of the 5th Conference of the Canadian Association for Biological Safety. University of British Columbia, Vancouver. British Columbia, Canada.

- First MW, Macher J, Gussman R, Stuart D, Webb T. Nebulizer Characteristics for Certification Tests of Biosafety Cabinets with Bacteria and Simulants. Applied Biosafety J, 1998; 3 (1).

- Wang WH. Validation of the Integrity of a HEPA Filter System. Health Phys, 2003; 85 (suppl 2): 101-107.

Ventilation

- Rake BW. Influence of Crossdrafts on the performance of a biological safety cabinet. Appl Environ Microbiol, 1978; 36 (2); 278-283.

- Clarck RP, Osborne RW, Pressey DC, Grover F, Keddie JR, Thomas C. Open fronted safety cabinets in ventilated laboratories. J Appl Bacteriol, 1990; 69 (3): 338-358.

Décontamination

- Munro K, Lanser J, Flower R. A comparative study of methods to validate formaldehyde decontamination of biological cabinets. Appl Environ Microbiol, 1999; 65(2): 873-876.

- Luftman HS. Neutralization of formaldehyde gas by ammonium bicarbonate and ammonium carbonate. Appl Biosafety J, 2005; 10(2): 101-106.

- Schechmeister IL. Sterilization by ultraviolet irradiation, in: Disinfection, sterilization and preservation, fourth ed; Seymour S. Block, Lea & Febiger editor, 1991, pp. 553-565.

- American Biological Safety Association (ABSA) Position paper on the Use of Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets.

Liens utiles

- 2nd Edition, Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets, U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. September 2000. http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bsc/bsc.htm

- Environmental Health and Safety, University of Kentuky: Using UV Lamps in Biological Safety Cabinets and fact sheet Ultraviolet radiation.
http://ehs.uky.edu/biosafety/uv_cabinets.html

- Belgian Biosafety Server: http://www.biosafety.be/CU/ESM/ESM_Menu.html

Annexe 1

FILTRE ABSOLU A HAUTE EFFICACITE

Dénomination internationale: HEPA FILTER (High Efficiency Particulate Air) aussi appelé "Filtre absolu"

Définition:
Un filtre HEPA a la capacité de retenir des particules dans l'air d'un diamètre de 0.3 micromètre avec un taux d'efficacité de 99,97% (basé sur le test DOP). Il faut noter qu'actuellement le test MMPS remplace le test DOP[2].
Filtre absolu répondant à la norme en vigueur (EN-1822-1, High Efficiency air filters (HEPA and ULPA) - Part 1: classification, performance testing, marking).

Techniques de fabrication
- Technique du pli profond avec séparateur en aluminium (ancien procédé)
- Technique des miniplis (augmentation de la surface filtrante). Matière: papier de fibre de verre de haute résistance hydrofugé.

Mécanismes de filtration de l'air
Les particules contenues dans l'air sont retenues par 5 mécanismes différents:

1. Le dépôt: il a lieu quand la particule se pose sur la fibre du filtre par gravitation ;
2. L'attraction électrostatique: c'est l'attirance des particules vers la fibre du filtre, suite à la charge électrostatique (de polarité différente) causée par le frottement de l'air ;
3. L'interception: elle dépend de la dimension des particules (> ou = 0.3 micron). Ce phénomène est possible lorsqu'une particule quitte le flux d'air vers la fibre du filtre et y est retenue ;
4. L'impact: quand une particule plus grande (> ou = 0.5 micron) quitte le courant d'air pour s'implanter directement sur la fibre du filtre ;
5. La dispersion: mouvement incessant des plus petites particules (0.07 à 0.3 microns) suite au bombardement moléculaire. Les particulent se dispersent alors au travers du flux d'air (lignes du courant d'air) avec une très grand probabilité d'impact sur la fibre du filtre. La dispersion est le mécanisme principal de captage dans un filtre HEPA.

Complément d'information
- L'interception, l'impact et la dispersion constituent les 3 mécanismes principaux de rétention dans un filtre absolu.
- En théorie l'efficacité d'un filtre HEPA augmente pour les particules dont la taille est inférieure à 0.3 micromètre. La probabilité qu'un virus soit aérosolisé seul est très faible et il est peu probable que ce virus subsiste après son passage dans le filtre absolu. Les virus sont généralement "encapsulÈs" dans du mucus, des poussières ou bien du milieu de culture et le diamètre de telles particules est alors supérieur à 0.3 micromètre. Enfin, l'individualisation de particules virales nécessiterait une énergie élevée et des orifices calibrés particuliers pour que ces particules soient aérosolisables. Deux études ont démontré l'efficacité des filtres absolus pour la rétention de particules de diamètre supérieur et inférieur à 0.3 micromètre (Harstad & Filler, 1969 et Kruse & Kruse, 1984).
- La plupart des vapeurs et des gaz passent librement au travers d'un filtre absolu.

[2] Test DOP: mesure l'efficacité d'un filtre absolu en termes de rétention des particules présentes dans l'air, sur base de la rétention des gouttelettes d'aérosol de dioctyl phtalate (DOP) calibrées à 0.3 micromètre. Elle est généralement exprimée en pourcentage. Une rétention de 99.97% de DOP caractérise un filtre HEPA. Le DOP est carcinogène, il est dès lors recommandé de procéder au test MMPS (Most Penetrating Particle Size). Pour ce test, la capacité du filtre absolu de retenir des particules dans l'air d'un diamètre entre 0.1 et 0.2 micromètre est évaluée.

Annexe 2

LAMPES UV

Les lampes UV sont fréquement rencontrées dans les laboratoires, les hôpitaux et d'autres lieux où l'air, l'eau ou les surfaces doivent être décontaminées. L'efficacité des radiations UV a été démontrée dans l'air davantage que pour inactiver des micro-organismes présents sur des surfaces (Schechmeister, 1991).

Définitions
Les rayons UV sont des rayonnements électromagnétiques non-ionisants qui répondent aux lois de l'optique géométrique. Le spectre UV est divisé en 3 gammes de longueurs d'ondes, principalement sur base de leurs effets biologiques: UV-A: 315 - 400 nm, UV-B: 280 - 315 nm et UV-C: 100 - 280 nm. Les longueurs d'ondes inférieures à 180 nm sont sans effet biologique (elles sont absorbées par l'atmosphère). Les longueurs d'ondes inférieures à 320 nm sont actiniques, c'est à dire capables de causer des réactions chimiques. Les UV-C ont une très haute fréquence et une grande énergie, ils sont utilisés comme germicides (activité maximale à 260 nm, pic d'absorption des acides nucléiques). La cible des UV est l'ADN et l'ARN dans une moindre mesure.
Remarque: généralement les spores résistent davantage aux UV que les formes végétatives des bactéries. La nature létale des rayonnements UV pour les micro-organismes est due à la formation de dimères de Thymine (et d'autres dimères comme Uracile-Thymine) dans l'ADN. Certaines bactéries sont capables de réparer ces "lésions" de l'ADN. Les mécanismes de réparation (photoréactivation ou réparations enzymatiques) sont décrits par exemple pour *Micrococcus radiodurans* et *E. coli*.

Utilisation des lampes UV dans les ESM
L'utilisation des lampes UV n'est pas recommandée dans les ESM (NIH, CDC, OMS, norme EN 12469). Lorsqu'une bonne procédure de travail est respectée, l'utilisation d'une lampe UV n'est pas indispensable, de plus l'air sortant de l'ESM est filtré (filtres HEPA). Divers facteurs limitent l'activité germicide des lampes UV dans les ESM, de plus l'exposition aux rayonnements UV représente un danger pour l'utilisateur.

- Pénétration: la lumière UV n'est pas pénétrante dans un écoulement dynamique de l'air (flux dans l'ESM). Les micro-organismes situés sous la poussière, sous des surfaces (plan de travail, boîtes, tout autre objet présent dans l'ESM) ou dans les zones ombragées, ne sont pas atteints par les UV. "Les UV n'agissent pas là où cela serait nécessaire" (par exemple sous la grille d'aération de l'ESM où peuvent se loger des micro-organismes).
- Humidité relative de l'air: au-dessus de 70% d'humidité relative l'effet germicide des UV chute significativement.
- Température et mouvement de l'air: une température inférieure à 27°C réduit l'émission de la lumière UV aux longueurs d'ondes qui ont un effet germicide. Les mouvements de l'air tendent à refroidir la lampe UV ce qui a pour effet de réduire l'effet germicide de la lampe.
- Propreté: idéalement les lampes UV devraient Ítre nettoyées soigneusement à l'éthanol 70% chaque semaine de manière à assurer un rendement optimal.
- Usure: les lampes UV devraient faire l'objet d'un contrôle tous les six mois de manière à mesurer si l'intensité de la lumière émise a toujours un pouvoir germicide. Une intensité de 40 microwatts/cm2 à 253,7 nm au centre de la surface de travail est recommandée.
- Production d'ozone: les lampes UV émettant à une longueur d'onde inférieure à 250 nm peuvent favoriser la production d'ozone. L'ozone peut endommager les caoutchoucs et les autres polymères présents dans l'ESM (joints, raccords, tubes). Des lampes à faible, ou sans, Èmission d'ozone sont commercialisées. Un des dangers serait l'usure des tubes amenant un gaz inflammable dans l'ESM.

- Danger pour l'utilisateur: les rayonnements UV (surtout les UV-C) peuvent provoquer des brûlures de l'épiderme et de la cornée. Il est recommandé de ne jamais mettre les UV en fonction pendant les manipulations dans l'ESM. Si les lampes UV sont utilisées, il est conseillé au personnel de quitter la pièce pendant leur fonctionnement.

Remarques

- La surface métallique réfléchissante des ESM représente également un danger pour la personne qui serait présente dans le local pendant que les UV sont appliqués dans l'ESM. La règle est de ne pas utiliser la lampe UV dans l'ESM lorsque le personnel est présent dans le local, et cela même si l'ESM n'est pas mise en fonction.
- Il est déconseillÈ d'installer une lampe UV dans une ESM qui n'en est pas préalablement équipée (ou si ce n'est pas prévu par le constructeur). Cette installation aurait pour effet de modifier les critères de performance de l'ESM (schéma aéraulique) pouvant par là présenter un danger pour l'utilisateur et/ou l'environnement.
- La norme EN 12469 ne fait mention d'aucun critère de performance concernant les lampes UV et ne recommande pas leur utilisation dans les ESM (Annexe A, pt. A2).