

Procédures d'utilisation des salles de culture _ NC1

1- Fonctionnement

Les salles de culture au CRCHUM ont été réparties entre les chercheurs pour en faciliter le fonctionnement mais ne sont pas exclusive à une équipe.

2-Réservation

Il est important de réserver en ligne (GRR) l'utilisation de l'enceinte de sécurité biologique (ESB) que vous prévoyez utiliser avant chaque période de travail.

La réservation d'une ESB permet la gestion si deux personnes désirent utiliser une ESB au même moment. Celle qui aura réservé aura la priorité.

3-Accès

Les utilisateurs doivent avoir pris connaissance de ce document et reçu une formation sur les procédures d'utilisation des salles de culture par le Conseiller santé et sécurité -secteur biorisque du CRCHUM avant d'y travailler (inclus dans la formation sur la biosécurité générale, normalement suivie par tout le personnel de laboratoire). Le conseiller en santé et sécurité – secteur biorisque doit connaître également l'emplacement du matériel et des produits à risque et doit s'assurer que les manipulations prévues correspondent bien au niveau de confinement 1. Il vous informera également des autres formations qui vous seront nécessaires telles que sur la radioprotection ou le SIMDUT.

4-Biosécurité et Formation

Le conseiller santé et sécurité – secteur biorisque du CRCHUM est la personne ressource à contacter pour tous les besoins de formations et de biosécurité.

Règles de base sur :

Salle et propreté des lieux :

La contamination croisée est un problème majeur en culture cellulaire. La propreté des lieux dans une salle de culture est donc à la base des bonnes pratiques. Veillez à conserver la pièce propre, en ordre et à circuler lentement lorsqu'un utilisateur manipule dans une ESB pour ne pas déranger le flux d'air de l'enceinte. Ceci est d'autant plus vrai que chaque salle de culture du CRCHUM est susceptible d'être utilisées par plusieurs utilisateurs.

Tous les utilisateurs des salles de culture au CRCHUM devront recevoir une ou des formations par le conseiller santé sécurité – secteur biorisque (adaptés aux besoins) avant de débiter leurs manipulations.

Bref rappel :

- Le pipetage par la bouche est strictement interdit (règle générale en laboratoire);
- Les cheveux longs doivent être attachés (règle générale en laboratoire);
- Les plaies ouvertes, coupures et égratignures doivent être recouvertes d'un pansement imperméable (règle générale en laboratoire);
- Une affiche à l'entrée vous indiquera le niveau de confinement et les conditions d'entrée du laboratoire;
- Il est strictement interdit de manger, de boire et d'y introduire des effets personnels (lecteur MP3, cellulaires) qui ne sont pas nécessaires au travail dans une salle de culture;
- Avoir reçu les autorisations nécessaires (comité d'éthique, MTA, etc.) s'il s'agit de manipulations avec du matériel qui doit être approuvé;
- Connaître le niveau de confinement du matériel que vous devez utiliser (se rapporter aux documents légaux ex. loi C11 (loi sur les agents pathogènes humains et les toxines) pour la classification. Le conseiller santé sécurité – secteur biorisque pourra vous aider. Il doit également être contacté si vous devez travailler avec du matériel de niveau NC2 et NC3 (qui ne doivent en aucun cas être manipulé dans les salles de culture de niveau NC1 (standard));
- L'utilisation de radio-isotopes dans ce laboratoire doit être approuvée par le comité de biosécurité et par le service de la radioprotection du CHUM (Maryse Lainesse ou Lysanne Normandeau). Vous devez respecter les exigences décrites dans le manuel de radioprotection du CHUM comme par exemple sur les formations exigées, la gestion des déchets, les procédures en cas de déversement et la vérification de l'absence de contamination en effectuant des frottis;
- Circuler lentement;
- Ajuster la hauteur de votre siège lorsque vous vous installez. Votre visage doit se refléter au milieu du panneau d'observation;
- La vitre ne doit pas être relevée au-delà d'une certaine hauteur, une alarme devrait alors se faire entendre;
- Porter un sarrau et des gants en tout temps dans le laboratoire;
- Les gants doivent être retirés avant de quitter la salle de culture; vous devez alors vous laver les mains;
- Le sarrau porté dans la salle de culture est avec poignets élastiques et bouton-pression.
- Vous devez laisser votre sarrau à l'intérieur de la salle (seulement pour un NC2, c'est une obligation);
- Les salles de culture sont munies de crochets pour y laisser votre sarrau;
- Jeter vos gants lorsque le travail en culture est terminé ou si vous avez manipulé du matériel contaminés.
- Il est normalement recommandé de retirer ses gants (aseptiquement) à l'intérieur de l'enceinte avant de retirer ses mains puis d'en enfiler une nouvelle paire;
- Ne pas vaporiser vos gants avec de l'alcool, ça peut les rendre plus poreux et réduire leur efficacité;
- Avant de commencer à travailler, nettoyer la surface de travail de l'enceinte de sécurité biologique (ESB) avec de l'éthanol à 70%. Ne pas utiliser de vaporisateur pour ne pas endommager les filtres HEPA; utiliser une pissette.

REMARQUE :

Pour la désinfection, utiliser un désinfectant dont l'efficacité est reconnue pour le matériel manipulé. Votre conseiller santé sécurité – secteur biorisque pourra vous aider à le sélectionner.

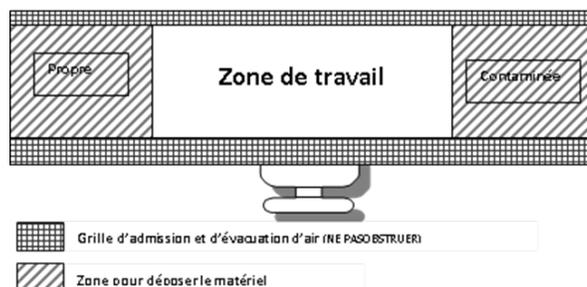
Enceinte de Sécurité Biologique (ESB)

L'utilisation d'une enceinte de sécurité biologique (ESB) est un moyen efficace de prévenir la contamination de votre matériel mais également de protéger l'utilisateur et l'environnement à condition qu'elle soit utilisée adéquatement.

- Respecter le principe physique de laminarité de l'air filtré sur le plan de travail;
- Notez que le fait de travailler à deux dans une ESB peut grandement augmenter le risque de contamination puisque cela ne respecte pas la norme NSF49 utilisée pour certifier ces appareils. Vous devez en être conscient;
- N'introduisez dans l'ESB que le matériel essentiel pour votre session de travail. Retirer tout le matériel inutile de la surface de travail;
- N'y laisser pas trainer des petits morceaux de papier car ils risqueraient d'être aspirés par la ventilation. La réparation de l'enceinte sera alors facturée à votre laboratoire;

Procédure avant l'utilisation d'une ESB

- Assurez-vous que l'alarme est en position de marche (ON). Elle vous avertira en cas de problème avec l'enceinte;
- Vérifier que les bouches d'entrée et d'évacuation de l'air ne sont pas obstruées;
- Vérifier que l'écoulement d'air se fait bien vers l'intérieur en tenant un papier mouchoir (type Kimwipes) au milieu de la bordure du panneau d'observation : le papier doit être aspiré vers l'intérieur. Si l'ESB ne fonctionne pas, ne l'utilisez pas et poser une affiche « hors d'usage ». Un appel de service devra être placé. Dirigez-vous vers une autre enceinte;
- Décontaminez toutes les surfaces intérieures de l'enceinte avec un désinfectant prouvé efficace. N'utilisez pas d'eau de javel car corrosif sur des surfaces métalliques. N'utilisez pas de vaporisateur car les aérosols produits pourraient endommager les filtres HEPA;
- Rassembler et placer à l'intérieur de l'enceinte tout le matériel qui sera nécessaire à votre travail, et préalablement décontaminé avec de l'éthanol à 70%. N'obstruez pas les grilles d'aération. La surface de travail peut être recouverte d'un papier absorbant doublé de plastique. Séparer les articles « propres » des articles « contaminés », comme indiqué sur le schéma ci-dessous, en créant 3 zones distinctes;
- Une fois installé, attendez une minute avant de commencer à travailler pour permettre au flux d'air de se stabiliser.



Procédure de travail dans l'ESB

- Porter les équipements de protection personnelle exigés (sarrau et gants);
- Travailler le plus possible au centre de l'enceinte en gardant une distance d'au moins 6 pouces par rapport au panneau frontal. Lorsque le risque de formation d'aérosols est élevé, travailler vers le fond de l'enceinte;
- Éviter tout mouvement brusque et inutile des mains et des bras sous la hotte. Ces mouvements perturbent le flux laminaire. Glisser les bras perpendiculairement au panneau pour entrer ou sortir de l'enceinte. Laisser le flux d'air se stabiliser quelques secondes avant de reprendre le travail;
- Tous les déchets, qu'ils soient solides ou liquides, doivent être déposés dans des contenants que vous avez installés à l'intérieur de l'enceinte et ce jusqu'à la fin de votre période de travail;
- Les déchets solides doivent être placés un sac. Lorsque vous avez terminé, refermer le sac avec du ruban adhésif et le déposer dans un bac pour déchets biomédicaux;
- Les déchets liquides peuvent être aspirés par le système de vide qui les récupère dans un erlenmeyer dans lequel a été mis un désinfectant. On peut également les verser dans un béccher, qui contient également un certain volume de désinfectant. Pour ce dernier, il est recommandé d'utiliser un entonnoir afin de minimiser les éclaboussures;
- Ne jeter le liquide dans le lavabo qu'après vous être assuré que le temps de contact avec le désinfectant a été suffisant, c'est-à-dire au moins 30 minutes. Lavez puis remplissez du nouveau avec du désinfectant;
- Il est strictement interdit d'utiliser un bec Bunsen dans une ESB. La présence d'une flamme nue crée de la turbulence, perturbe la configuration de l'écoulement de l'air et pourrait endommager le filtre « HEPA », sans compter le risque d'incendie en présence de substances inflammables tel que l'éthanol;

Une fois votre travail terminé

- Fermer ou recouvrir tout votre matériel;
- Désinfecter toutes les surfaces, potentiellement contaminées, avec du papier imbibé d'éthanol 70%. Vous pouvez maintenant le sortir de l'enceinte;
- Refermer le sac de déchets solides avec du ruban adhésif (ne pas faire de nœud) à l'intérieur de la hotte et le déposer dans le bac réservé aux déchets biomédicaux;
- Utiliser de l'éthanol 70%, ou tout autre désinfectant prouvé efficace, pour décontaminer toutes les surfaces internes de l'enceinte incluant les parties distales et latérales;
- Ne pas éteindre la hotte, laisser la ventilation en continu;
- Éteindre la lumière fluorescente;
- Rebrancher votre pipetteur automatique pour le recharger;
- Certaines enceintes doivent fonctionner en tout temps, en cas de doute, vérifier auprès de la personne responsable du laboratoire;
- Enlever et accrocher votre sarrau sur les crochets prévus à cet effet dans la salle de culture si vous prévoyez vous en servir à nouveau;
- Enlever vos gants et laver vos mains avant de tourner la poignée de la porte;
- Bien refermer la porte en sortant.

Utilisation et entretien des lampes UV

- Le manuel de sécurité biologique en laboratoire, 3^{ème} édition, publié par l'Organisation Mondiale de la Santé, stipule « Il n'est pas nécessaire d'équiper les ESB de lampes à ultraviolets». Cette technique de décontamination doit être considérée comme secondaire car son efficacité reste limitée. Elle ne peut en aucun cas se substituer à une décontamination manuelle avec un désinfectant chimique;
- La personne responsable de l'entretien du laboratoire doit dépoussiérer au moins chaque semaine le tube UV froid avec un linge imbibé d'éthanol à 70%. L'efficacité des UV pourrait être affectée par l'accumulation de poussière sur sa surface;
- Ne jamais toucher la lampe UV directement avec vos doigts. Toujours porter des gants. Les huiles naturelles des mains peuvent laisser une empreinte et créer un espace vide sur la surface du tube;
- L'exposition aux rayonnements UV peut gravement endommager la cornée de vos yeux mais également provoquer des brûlures cutanées. Ne vous exposez pas inutilement. Éteignez la lumière ultraviolette dès que vous entrez dans le laboratoire

Maintenance et certification

- Les ESB sont certifiées annuellement par la compagnie Certifiltre. Elle est prise en charge par la direction du centre de recherche. Une certification doit également être effectuée après réparation ou déplacement;
- Si vous éprouvez des problèmes avec une ESB, contacter immédiatement le superviseur du laboratoire qui placera un appel de service. Ne pas l'utiliser;
- Si l'alarme de l'enceinte se déclenche, par exemple en cas d'arrêt des moteurs, stopper immédiatement vos manipulations. Décontaminer puis retirer votre matériel qui se trouvait à l'intérieur sans oublier de décontaminer l'intérieur de l'ESB.

Nettoyage et décontamination des surfaces de travail

- Après chaque période de travail, l'utilisateur doit décontaminer toutes les surfaces ainsi que les équipements qui ont servi au cours des manipulations. Ne jamais quitter le laboratoire sans avoir décontaminé toutes les surfaces de travail et avoir déposé les sacs de déchets biomédicaux dans le contenant approprié;
- Décontamination des déchets liquide: Tous les déchets doivent être décontaminés.
 - Liquides: addition de 1/10 volume de Virox concentré. Laisser agir 30 minutes puis jeter immédiatement dans l'évier sous l'eau courante;
 - Solides: aucune quantité importante de liquide ne doit se retrouver dans les sacs destinés aux déchets solides;
- Ne jamais décontaminer dans l'autoclave du matériel qui contient de l'eau de javel ou des substances cytotoxiques car des vapeurs très toxiques seraient libérées dans la pièce;
- Radioactifs liquides et solides: Jeter les déchets radioactifs selon les procédures énoncées dans le manuel de radioprotection du CHUM. Les utilisateurs ont la responsabilité d'éliminer ces déchets après chaque période de travail. Nous vous rappelons qu'il est strictement interdit d'autoclaver des déchets radioactifs;

- Décontamination de la verrerie : La verrerie doit être rincée à l'eau puis à l'éthanol (si nécessaire) avant d'être déposée dans le bac destiné à cet effet. C'est le personnel de la laverie qui est responsable de la transporter à la laverie centrale du CRCHUM pour être lavée;
- Les sarraus sales doivent être apportés à la distributrice à sarrau, de préférence dans un sac ou retournés à l'envers.

Rappel pour l'utilisation et l'entretien des instruments en salle de culture :

Il est primordial que les équipements utilisés en salle de culture (hottes, incubateurs, centrifugeuses, réfrigérateurs, microscopes, bain-marie, etc.) soient nettoyés et entretenus régulièrement.

Centrifugeuses

- Toujours lire le manuel d'utilisation avant de vous en servir pour la première fois;
- Respecter les recommandations des fabricants;
- Assurez-vous que vos tubes sont bien équilibrés et bien installés dans le rotor avant de démarrer votre centrifugation.

Incubateurs

- Les incubateurs doivent être nettoyés régulièrement par les utilisateurs (chaque 3 mois ou plus (ex. si vous observez des signes tels que des cercles blancs) car le taux d'humidité et la température favorisent le développement de contaminants. Suivre les indications du fabricant;
- Il faut maintenir un bon taux d'humidité (95%) dans un incubateur et vous assurer que le niveau d'eau dans la cuve est suffisant. Y ajouter de l'eau distillée ou RO. Cette humidité contribue à limiter l'évaporation des milieux de culture;
- En cas d'anomalie ou panne, la personne responsable de l'équipement doit s'assurer d'apporter les correctifs et d'aviser les utilisateurs.

Procédure d'utilisation des incubateurs

Les incubateurs servent à la croissance de lignées cellulaires. Sur la porte de chaque incubateur apparaissent les conditions environnementales propres à cet équipement (température, % de CO₂). On y trouvera aussi une application spécifique s'il y a lieu.

- Ouvrir la porte extérieure puis la porte intérieure;
- Déposer ou retirer les contenants de culture avec lesquels vous devez travailler;
- Refermer les deux portes;

Entretien des incubateurs

- Toutes les semaines: remplir le bac d'eau à l'intérieur de chaque incubateur. Vérifier les surfaces des tablettes pour toute trace de contamination. Une odeur de moisissure indique aussi une contamination. Procéder alors à la décontamination (section suivante);
- Toutes les deux semaines : nettoyer le bassin d'eau et le remplir d'eau fraîche. Nettoyer les tablettes et les parois accessibles;
- Au besoin: nettoyer à fond l'incubateur puis indiquer sur un ruban gommé de couleur, collé sur la porte, votre nom et la date de nettoyage;

- Vérifier la concentration de CO₂ de l'incubateur;

Décontamination des incubateurs

- Sortir de l'incubateur contaminé tous les récipients de culture et les transférer dans un autre incubateur alors désigné en quarantaine i.e., jusqu'à ce que les cultures puissent être transférées dans des récipients stériles et propres, que les récipients souillés soient jetés et que cet incubateur soit à son tour décontaminé;
- Sortir les tablettes, les parois de chaque côté interne de l'incubateur et la partie protégeant le ventilateur au plafond de l'incubateur. Apporter à l'évier;
- Laver à fond toutes les surfaces internes atteignables de l'incubateur, y compris le ventilateur et les deux portes, avec un papier absorbant bien imbibé de Virox 5, rincer avec de l'eau distillée puis avec de l'éthanol 70%. La vitesse de réapparition des contaminants dépend de ce nettoyage;
- À l'évier, bien broser toutes les surfaces des tablettes et parois avec du Virox 5; rincer avec de l'eau distillée. Assécher avec des papiers absorbants;
- Autoclaver les parties retirées de l'incubateur (tablettes, parois...), 30 minutes stérilisation et 30 minutes séchage. Laisser bien refroidir;
- Porter des gants propres. Replacer dans l'incubateur ses parties amovibles en prenant soin de placer les tablettes avec les bords repliés vers le haut;
- Indiquer sur un ruban gommé de couleur collé sur la porte, votre nom et la date de décontamination

Bains

- Les bains doivent être lavés régulièrement au désinfectant (ex. Virox dilué), rincés et remplis de nouveau avec de l'eau contenant un agent algicide (ex. Bathclear) de façon régulière par les utilisateurs. Terminer le nettoyage en apposant un ruban identifiant la date et les initiales.

Réfrigérateurs/congérateurs

- Périodiquement, vérifier la propreté, l'ordre et le fonctionnement du frigidaire/congérateur et en faire l'entretien;
- Les produits/contenants qui ne sont pas identifiés, dont vous n'avez plus besoin ou qui sont périmés doivent être éliminés.

Matériel individuel et stockage

- Chaque laboratoire doit utiliser son propre matériel consommables (embouts, tubes, plaques, pipettes sérologique...) et ses propres instruments (pipetteur automatique, etc...). Les micropipettes et les pipetteurs automatiques doivent être nettoyés après usage. Identifier votre matériel avec le nom de votre laboratoire;
- Jeter ce qui n'est plus utilisé. Ne gardez que ce qui est strictement nécessaire à votre travail;
- Éviter d'entreposer (particulièrement des boîtes de carton), des instruments qui ne sont pas utilisés ou de déposer trop de matériel sur les comptoirs qui sont source de poussière et donc de contamination.

Notez que le CRCHUM assume les frais du CO₂ (canalisation centrale) nécessaire au fonctionnement des incubateurs.

Déposer les déchets

La procédure pour disposer adéquatement des déchets biomédicaux que vous produisez est normalement expliquée lors de la formation sur la biosécurité générale que tout nouvel employé de la recherche fondamentale doit suivre.

- Une fois votre bac ou votre boîte rempli, vous devez bien le refermer avant de le transporter dans la chambre froide désignée de votre étage. Elles sont normalement situées près du monte-charge soit: [R08.126](#), [R09.126](#), [R10.126](#), [R11.126](#), [R12.308](#);
- Vos déchets sont alors ramassés par le service d'hygiène et salubrité pour être décontaminés.
- Les bacs pleins sont automatiquement échangés contre des bacs vides (avec sacs) et laissés dans cette même chambre froide;
- Les boîtes en carton, utilisées pour l'élimination du matériel cytotoxique, doivent quant à elles être commandées au centre de distribution. Un endroit sera désigné pour aller vous procurer les autocollants à y apposer.

Entretien du local

- À toutes les semaines (ou plus selon le besoin), l'évier et les comptoirs doivent être nettoyés;
- Un linge humide doit être passé sur les étagères, appareils (ex. portes frigo, poignées, etc.);
- Le plancher doit être lavé avec une solution désinfectante appropriée à toutes les semaines (ou plus en cas de besoin);

PLAN D'URGENCE

Accidents impliquant des blessures corporelles (piqûre, coupure, égratignure) :

- Faire saigner, sans pincer, le pourtour de la plaie;
- Laver abondamment la plaie à l'eau et au savon, ou avec un savon antiseptique (Providine ou Hibitane);
- Ne pas utiliser de brosse pour ne pas augmenter le traumatisme. N'utiliser ni eau de javel ni alcool comme antiseptique;
- Aviser le responsable du laboratoire et remplir un rapport d'accident;
- S'il y a lieu aviser l'agent de sécurité biologique. Des mesures correctives, suite à une enquête, devront être prises pour éviter qu'un autre accident du genre ne se reproduise.

Panne électrique

Prenez note que les équipements critiques du laboratoire sont branchés sur des circuits d'urgence (prises rouges). En cas de panne une génératrice se met en marche pour les alimenter. Cela inclus entre autres la lumière, la ventilation, les ESB, les incubateurs et les congélateurs. Si les circuits d'urgence ne se sont pas enclenchés, refermez tous vos contenants et quitter le laboratoire après avoir retiré vos équipements de protection personnelle. Avisez immédiatement le responsable.

Feu - Alarme générale :

Si l'alarme générale est déclenchée :

- Ne paniquez pas;
- Sortez de la salle selon les procédures normales;
- Quittez le centre de recherche par les escaliers de secours.

Feu local :

Si le feu se déclare dans la salle de culture et que vous ne pensez pas être capable de le maîtriser (extincteur)

- Ne paniquez surtout pas;
- Contacter la sécurité au poste 5555;
- Quittez immédiatement la pièce. Rappelez-vous que la sécurité du personnel est prioritaire.

NC2 et NC3

Aucun organisme appartenant au groupe de risques 2 ou 3 ne doit être manipulé dans les salles de culture standard. Votre agent de biosécurité pourra vous renseigner sur le groupe de risque auquel appartient le matériel que vous prévoyez manipuler. Sachez que pour être autorisé à manipuler dans un laboratoire de niveau de confinement 2 ou 3, vous devez suivre des formations spécifiques et adaptées.

Frais :

Il n'y a aucun frais pour l'utilisation des salles de culture pour les chercheurs du CRCHUM. Le CRCHUM assume les coûts d'alimentation en CO₂ pour les incubateurs ainsi que la maintenance et l'entretien des systèmes de production d'eau ultra-pure et d'osmose inversée.

Chaque équipe est responsable de commander son propre matériel.

L'institution assume les frais normaux de nettoyage de base (plancher, lavabo, etc.) mais les équipes ont la responsabilité de maintenir la salle de culture propre et en ordre.

PROCÉDURES EN CAS DE DÉVERSEMENT ACCIDENTEL

L'utilisateur est le premier intervenant lorsque survient un déversement.

N'oubliez pas que des trousse, prêtes à l'emploi, pour déversements chimiques ou biologiques sont à votre disposition sur chaque étage.

Déversement de produits à biorisque sur le sol ou un comptoir

- Éviter de respirer les aérosols;
- Informer les autres travailleurs qui se trouvent dans la pièce qu'un déversement vient de se produire; Ils devront quitter le laboratoire;
- Garder la porte de la salle de culture fermée le temps de permettre aux aérosols de retomber. Attendre au moins 30 minutes avant de réintégrer le local et de procéder à la décontamination;

- Attention si vos vêtements de protection ont été contaminés lors du déversement, les retirer avant de sortir;
- Signaler le déversement au responsable du laboratoire et au Conseiller santé et sécurité - secteur biorisque s'il y a lieu;
- Laisser fonctionner la/les ESB; elles aideront à filtrer les particules en suspension du local;
- Identifier la surface contaminée de façon à mesurer l'ampleur du déversement;
- Porter des vêtements de protection neufs (sarrau, gants, lunettes de protection, et masque de type N 95 si nécessaire);

N.B. Pour pouvoir porter un masque N95, vous devez avoir subi un essai d'ajustement; contacter votre agent de biosécurité.

- Procéder au nettoyage du déversement. Nous vous recommandons de consulter préalablement les fiches signalétiques des produits ou désinfectants que vous prévoyez utiliser puisque ce sont des produits chimiques.

Note : En cas de déversement d'un produit dangereux sur vos vêtements ou sur la peau, retirer immédiatement vos vêtements et lavez-vous à l'eau et au savon. Si la zone de contact avec la peau est considérable, il pourrait être recommandé de prendre une douche d'urgence. Chaque utilisateur devrait toujours avoir des vêtements de rechange à proximité de l'endroit où il manipule des produits à biorisque. (Des uniformes, hauts et pantalons, seront disponibles dans les trousseaux de déversement). Placer les vêtements souillés dans un sac. Ne jamais apporter de vêtements contaminés chez vous pour les laver.

- Recouvrir les surfaces contaminées avec du papier absorbant puis verser lentement du Virox concentré par un mouvement circulaire de la périphérie vers le centre de la flaque et laisser en contact au moins 10 minutes. Ne pas utiliser de vaporisateur afin de minimiser la formation d'aérosols;
- Ramasser et jeter le tout dans un contenant pour déchets biomédicaux doublée de deux sacs jaunes «biorisque». Ramasser le coupant/tranchant avec une pince et le déposer dans un contenant rigide en plastique résistant aux perforations.
- Si nécessaire, recommencez;
- Faire un nettoyage final à l'alcool;
- Enlever les équipements de protection individuelle, jeter les gants avec les déchets biomédicaux, désinfecter la pince avec du Virox dilué 1/16 et changer de sarrau;
- Se laver les mains avec du savon à la fin de l'opération.

Note : Si vous n'êtes pas en mesure de contrôler la situation ou vous vous sentez incapable de procéder à la décontamination des lieux, appeler la personne-ressource du laboratoire et composer le 5555.

Déversement à l'intérieur d'une ESB

- Laisser fonctionner la hotte biologique;
- Porter l'équipement de protection individuelle : gants, lunettes de protection et sarrau;
- Recouvrir les surfaces contaminées avec du papier absorbant, verser lentement du Virox concentré par un mouvement circulaire de la périphérie vers le centre de la flaque et laisser en contact au moins 10 minutes. Ne pas utiliser de vaporisateur afin de minimiser la formation d'aérosols;

- Ramasser et jeter le tout dans un contenant pour déchets biomédicaux doublée de deux sacs jaunes «biorisque». Ramasser le coupant/tranchant avec une pince et le déposer dans un contenant rigide en plastique résistant aux perforations;
- Si nécessaire, recommencez;
- Procéder au nettoyage final de la surface de travail avec l'Éthanol 70%;
- Laisser fonctionner la hotte encore 10 minutes;
- Enlever les équipements de protection individuelle, jeter les gants et changer de sarrau;
- Se laver les mains avec du savon à la fin de l'opération.

Déversement dans la centrifugeuse

- Éviter de respirer les aérosols;
- Aviser vos collègues qui se trouvent dans la pièce et qui devront sortir;
- Signaler le déversement au responsable de laboratoire;
- Laisser fonctionner les ESB qui aideront à filtrer les aérosols en suspension;
- Maintenir la porte du local fermée;
- En portant des équipements de protection (gants, lunettes, masque de type N95, sarrau), ouvrir le couvercle de la centrifugeuse, retirer tous les tubes brisés, les godets, le rotor. Placer le tout sous l'enceinte de sécurité biologique;
- Décontaminer tous les échantillons qui n'ont pas été endommagés avec du Virox concentré. Laisser agir 10 minutes puis les rincer à l'eau distillée;
- Décontaminer le rotor et les godets dans un autoclave (vérifier auprès du manufacturier si compatible avec cette méthode de décontamination) ou les tremper dans un bain de Virox concentré pendant 10 minutes;
- Recouvrir les surfaces contaminées avec du papier absorbant, verser lentement du Virox concentré par un mouvement circulaire de la périphérie vers le centre et laisser en contact au moins 10 minutes. Ne pas utiliser de vaporisateur pour éviter la formation d'aérosols;
- Ramasser et jeter le tout dans un contenant pour déchets biomédicaux doublée de deux sacs jaunes «biorisque». Ramasser le coupant/tranchant avec une pince et le déposer dans un contenant rigide en plastique résistant aux perforations;
- Si nécessaire, recommencez;
- Essuyer la cuve de la centrifugeuse à deux reprises avec du Virox concentré et rincer à l'eau; bien sécher;
- Enlever les vêtements de protection individuelle, jeter les gants avec les déchets biomédicaux et changer de sarrau;
- Se laver les mains avec du savon à la fin de l'opération.

La procédure d'urgence s'appliquera conformément au Plan d'urgence du CHUM.

Annexe : Rappel des règles de base en culture cellulaire :

- Fermer rapidement les bouchons au moment de sortir vos flacons de culture de l'incubateur;
- Nettoyer avec de l'éthanol à 70% les boîtes de pétris et les bouteilles de culture avant de les placer sous l'ESB;
- Si vous renversez du milieu ou des cellules dans l'ESB, éponger et désinfectez immédiatement avec le désinfectant approprié;
- S'assurer que le bac de récupération en avant de l'enceinte a été décontaminé à la suite d'un déversement;
- Manipuler une lignée cellulaire à la fois afin de réduire le risque de contamination croisée;
- Éviter de laisser trop longtemps les flacons de milieux ou de cellules ouverts sous la hotte;
- Désinfecter les surfaces de travail avec de l'éthanol 70% entre 2 sessions de travail ou lorsque vous avez terminé vos manipulations;
- Aspirer quelques volumes d'éthanol 70% dans le tuyau d'aspiration connecté au vide du laboratoire à la fin de votre session de travail;
- Lorsque plein, vider l'erlenmeyer branché sur le vide, le rincer puis y verser du désinfectant (environ 1/10 du volume du contenant); Attention de respecter la limite de remplissage; Il est fortement recommandé de placer un filtre en amont du port du vide;
- Examiner régulièrement vos cultures afin de détecter rapidement toute trace de contamination (bactériennes, moisissures..);
- En cas de contaminations, prenez les mesures qui s'imposent (voir la section décontamination des incubateurs);
- Vérifier régulièrement la présence de mycoplasmes dans vos cultures et sur réception d'une nouvelle lignée;
- Les nouvelles lignées doivent être mises « en quarantaine ». Ne pas les placer avec les autres;
- Décontaminer à l'éthanol 70% tout le matériel que vous introduisez dans l'ESB pour éviter d'y faire entrer des contaminants;
- Reposer le bouchon sur la bouteille de milieu que vous utilisez le plus rapidement possible pour minimiser les risques de contamination. Placer le bouchon, à l'envers sur la paillasse, derrière la bouteille;
- Ne pas manipuler directement au-dessus d'un flacon de cellules ouvert ou d'une bouteille de milieu ouverte;
- Ne pas installer trop de matériel sous la hotte pour ne pas gêner le flux d'air;
- Si vous avez à vous déplacer en arrière d'une enceinte déjà occupée, faite-le lentement;
- Il est conseillé d'utiliser vos propres bouteilles de milieu plutôt que de les partager;
- Ne pas conserver les milieux de culture trop longtemps dans les réfrigérateurs : la durée de conservation d'un milieu contenant de la glutamine et du sérum ne devrait pas excéder 6 semaines;
- La salle de culture est réservée uniquement pour faire de **la culture cellulaire**;
- Ne jamais y manipuler d'animaux;
- Ne jamais y faire de la culture bactérienne;
- Garder la pièce propre et en ordre; limiter vos déplacements;
- Garder la porte fermée en tout temps;
- Après avoir terminé vos manipulations, ranger, nettoyer et désinfecter votre poste de travail et sous l'ESB de manière à ce que l'utilisateur suivant puisse travailler dans de bonnes conditions.