



Rôle des laboratoires

Module CO – REB / Formation NRBC
25 mars 2008

Dr Claire DEBACK
Service de Virologie Pr H. AGUT
Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

Sécurité

Diagnostic

Veille

Classement des micro-organismes

les arrêtés du 17 avril 1997 (J.O. du 26 avril 1997) et du 30 juin 1998 (J.O. du 22 juillet 1998).

L'évaluation des risques infectieux, prescrite par le décret n° 94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques (J.O. du 6 mai 1994^o), est effectuée sur la base d'un classement des agents biologiques en 4 groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent (art. R. 231-61-1).

- | | |
|--|---|
| • Groupe 1 comprend les agents biologiques non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme | <i>Bacillus subtilis ...</i> |
| • Groupe 2 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est peu probable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace. | <i>Neisseria meningitidis, Staphylococcus aureus, virus de la vaccine, rougeole...</i> |
| • Groupe 3 comprend les agents biologiques pouvant provoquer une maladie grave chez l'homme et constituer un danger sérieux pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est possible, mais il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace | <i>Rickettsia akari, Mycobacterium tuberculosis, virus HIV, rage, Hépatite B, C, D...</i> |
| • Groupe 4 comprend les agents biologiques qui provoquent des maladies graves chez l'homme et constituent un danger sérieux pour les travailleurs ; le risque de propagation dans la collectivité est élevé ; il n'existe généralement ni prophylaxie ni traitement efficace. | <i>Ebola, Lassa, Marburg, FHCC, Machupo, Sabia, Variole, Encéphalite à tiques...</i> |

A ces classifications en groupes de risque, correspondent des conditions de manipulations des pathogènes de type 2, 3 ou 4.

Selon la quantité de virus manipulés, la classe de risque peut augmenter.

Précautions standard pour la manipulation des produits biologiques

- **Protection individuelle**
 - Gants, surblouse, lunettes, masque
 - Hygiène des mains : lavage (point d'eau à commande à pied), application d'antiseptiques (distributeur de solutés hydro-alcooliques)
 - Pansements étanches sur plaies cutanées
 - Dispositif de lavage oculaire
 - Mesures d'hygiène : ne pas manger, ne pas fumer, ne pas se maquiller
- **Matériel et gestes techniques adaptés**
 - Tubes à fermeture hermétique
 - Conteneur pour aiguilles et lames usagées (ne pas recapuchonner)
 - Pipettes électriques (ne pas pipeter à la bouche)
 - Décontamination des surfaces de travail et du matériel recyclable avec produits désinfectants
- **Transport sécuritaire des prélèvements**
 - Emballages de sécurité étanches
 - Envoi séparé des feuilles de demandes
- **Gestion et évacuation des déchets**
 - Décontamination du matériel jetable
 - Récipients adaptés au mode de stérilisation
 - Respect des circuits d'élimination
 - Signalisation du risque biologique

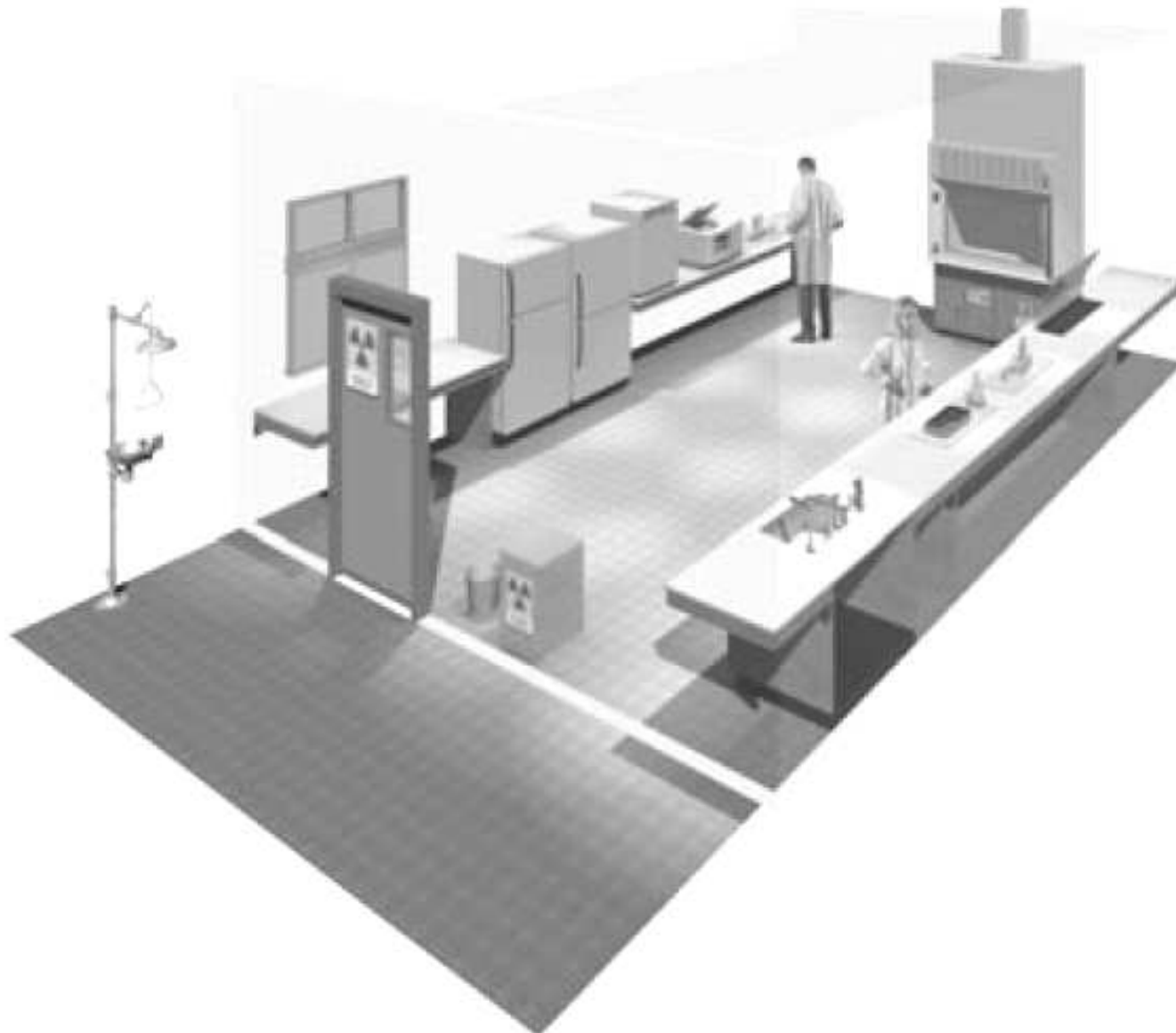
Autres risques au laboratoire

- **Risque chimique**
- **Risque lié aux rayonnements ionisants**
- **Risque électrique**
- **Risque incendie**

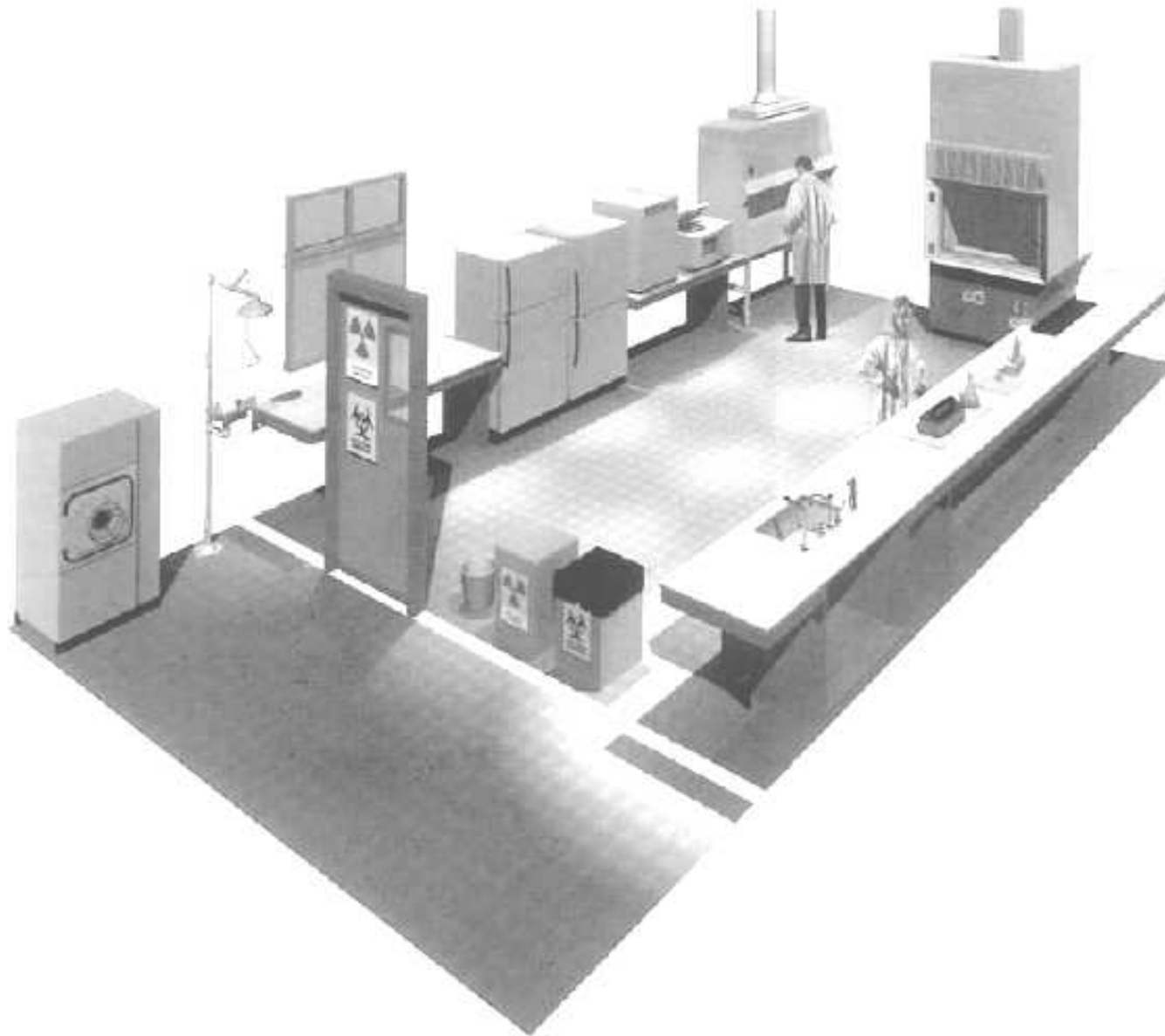
Confinement des laboratoires

MESURES	L1	L2	L3	L4
Accès réglementé	+	+	+	+
Murs résist. désinf.	-	-	+	+
Étanchéité local	-	-	+	+
Sas	-	+	x2	x2
Dépression	-	±	+	+
Filtration entrée air	-	-	+	+
Filtration sortie air	-	-	+	x2
Autoclave 2 entrées	-	-	+	+
ESM	±	+	+	+ (III)
Vêtements spécifiques	-	+	++	+++
Douche sortie	-	-	±	+
Autonomie respir.	-	-	-	±
Inactivation effluents	-	-	+	+

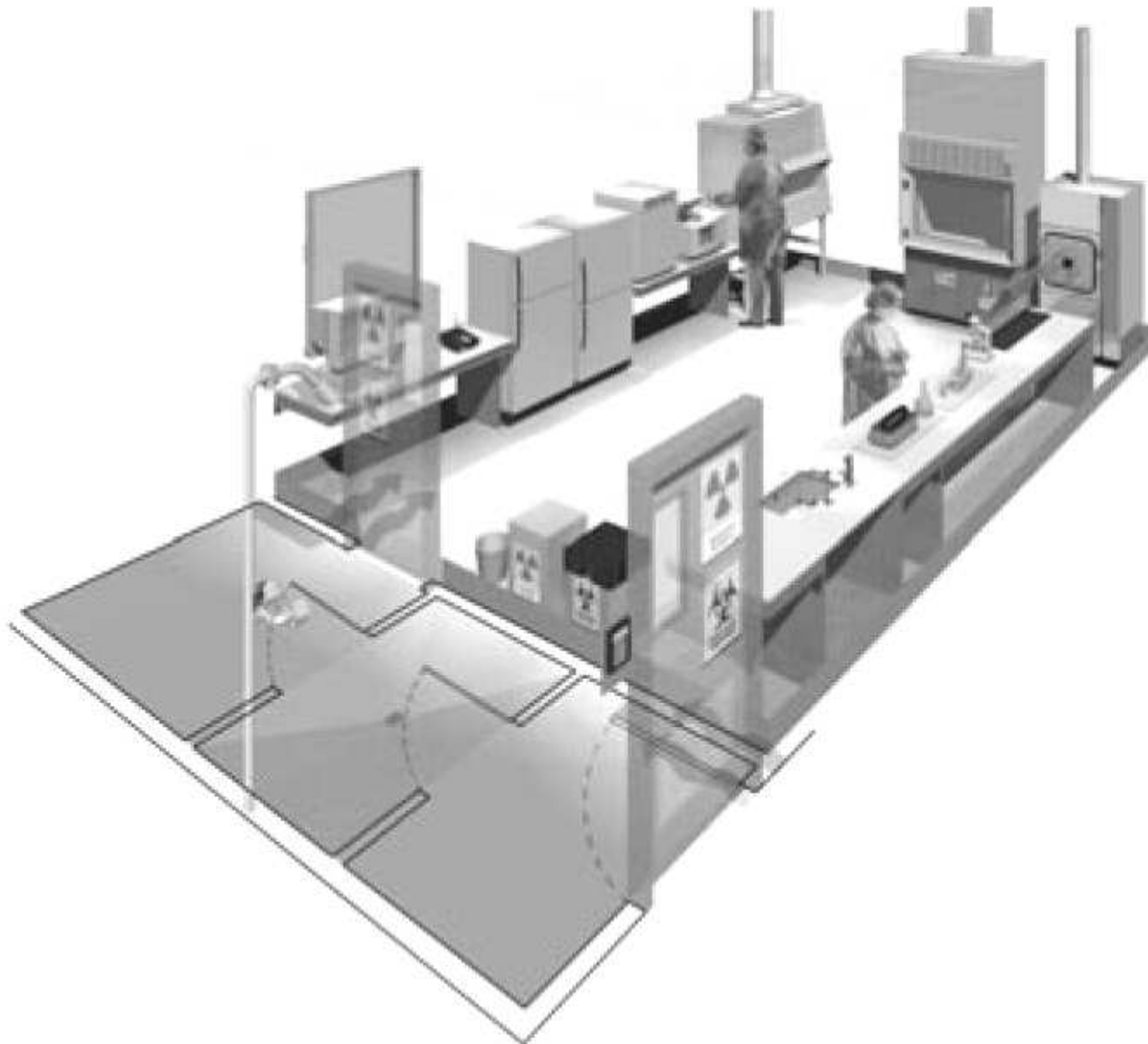
Laboratoire niveau de sécurité 1 - L1



Laboratoire niveau de sécurité 2 – L2



Laboratoire niveau de sécurité 3 – L3



Laboratoire niveau de sécurité 4 – L4



P4 Mérieux à Lyon

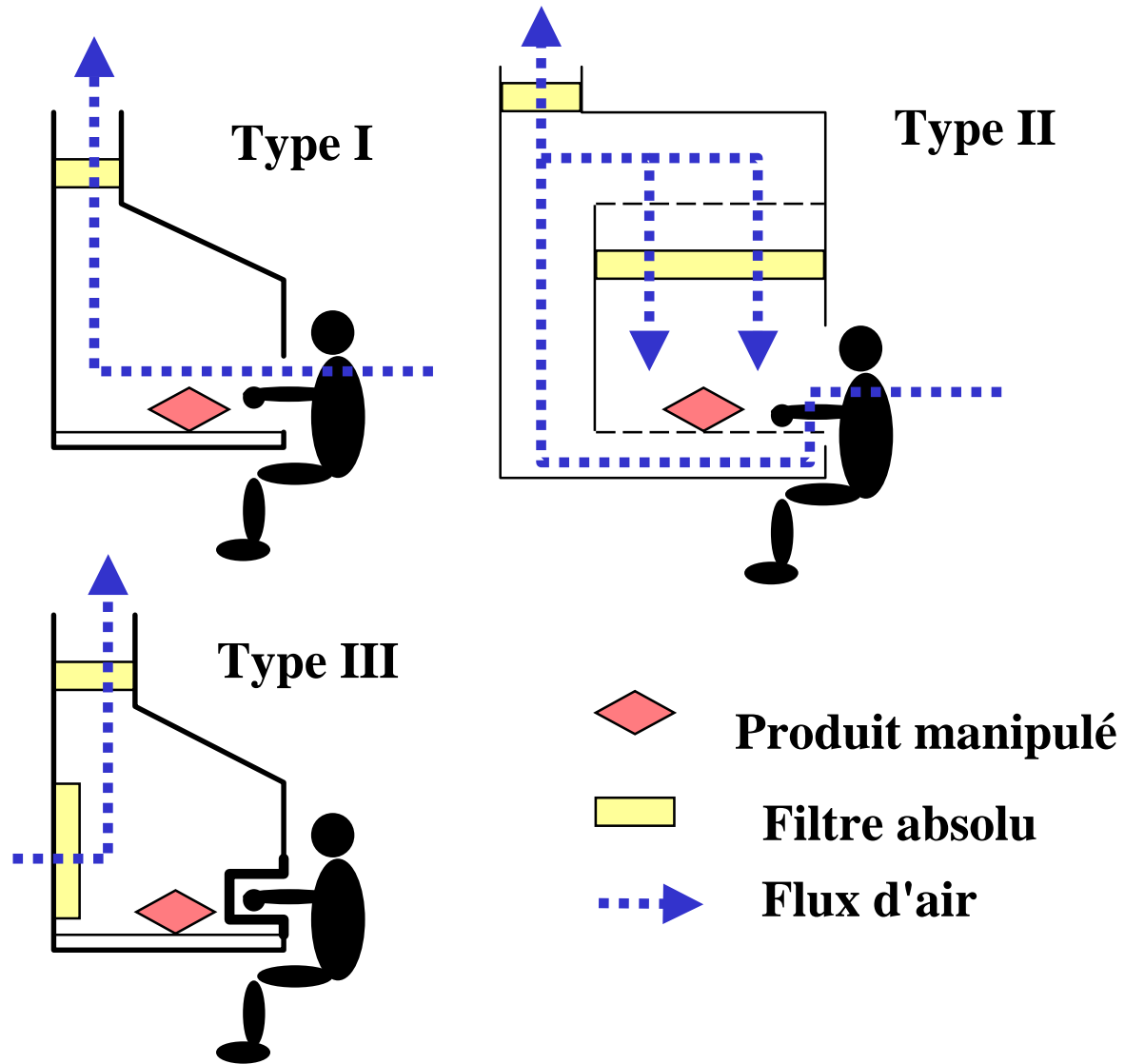


<http://www.cervi-lyon.inserm.fr/>

Postes de sécurité microbiologique (PSM)

Classe d'ESM		Protection		
		Matériel biologique manipulé	Manipulateur	Environnement
Classe I	<i>Hotte aspirante</i>	Non	Oui	Oui
Classe II	<i>A1, A2</i>	Oui	Oui	Oui
	<i>B1, B2</i>			
Classe III	"boîte à gants"	Oui	Oui	Oui

Postes de sécurité microbiologique (PSM)



Sécurité

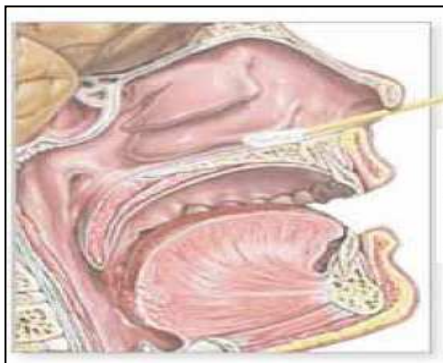
Diagnostic

Veille

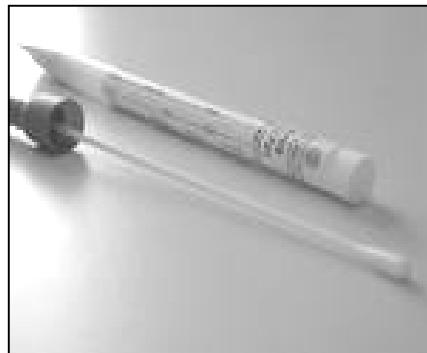
PREANALYTIQUE

- Qualité du prélèvement et conformité du transport au laboratoire en respectant les mesures de biosécurité
- Milieu de transport
- Modalités de conservation
- Condition et délai d'acheminement au laboratoire

Exemple : grippe aviaire



Écouvillon naso-pharyngé, gorge...



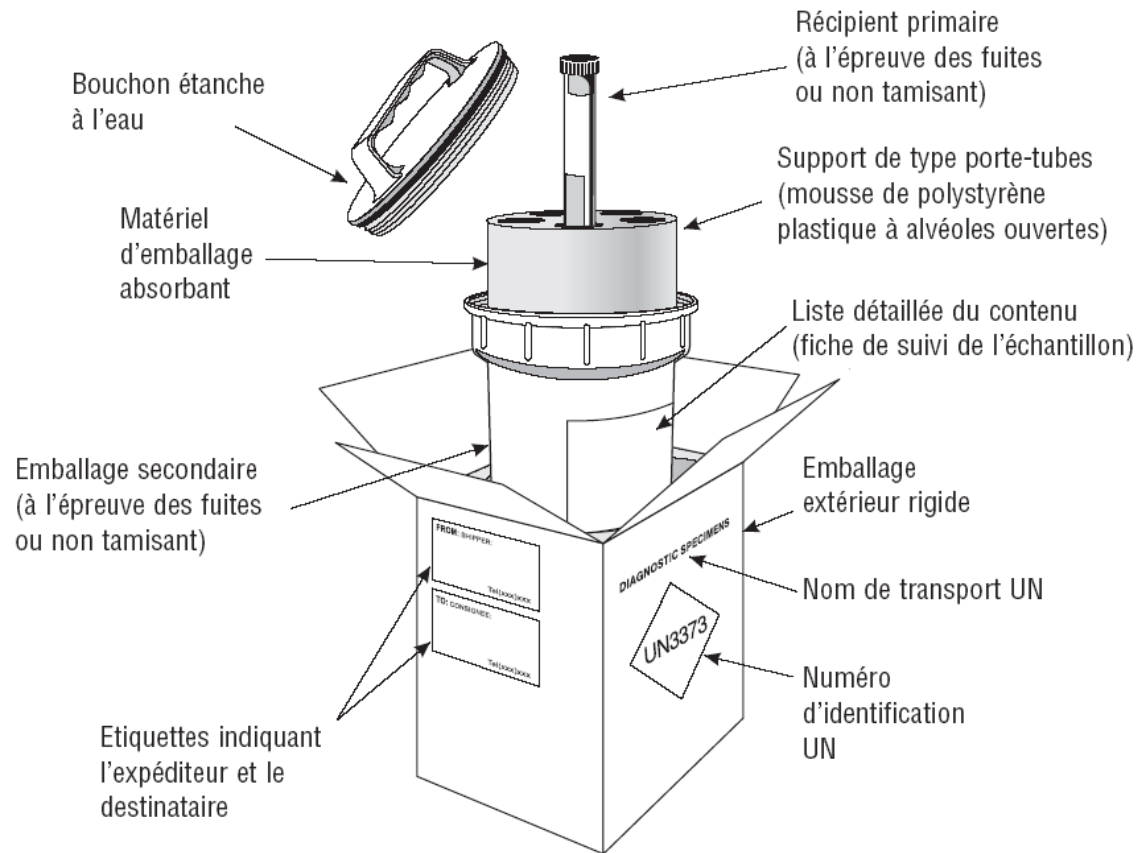
Écouvillon + milieu de transport Virocult®

Transport rapide
(ou conservation 2-4°C)

Laboratoire agréé

Conditionne les chances de détection du virus

Transport des échantillons biologiques au laboratoire



Normes d'étiquetage :



Les tests au laboratoire

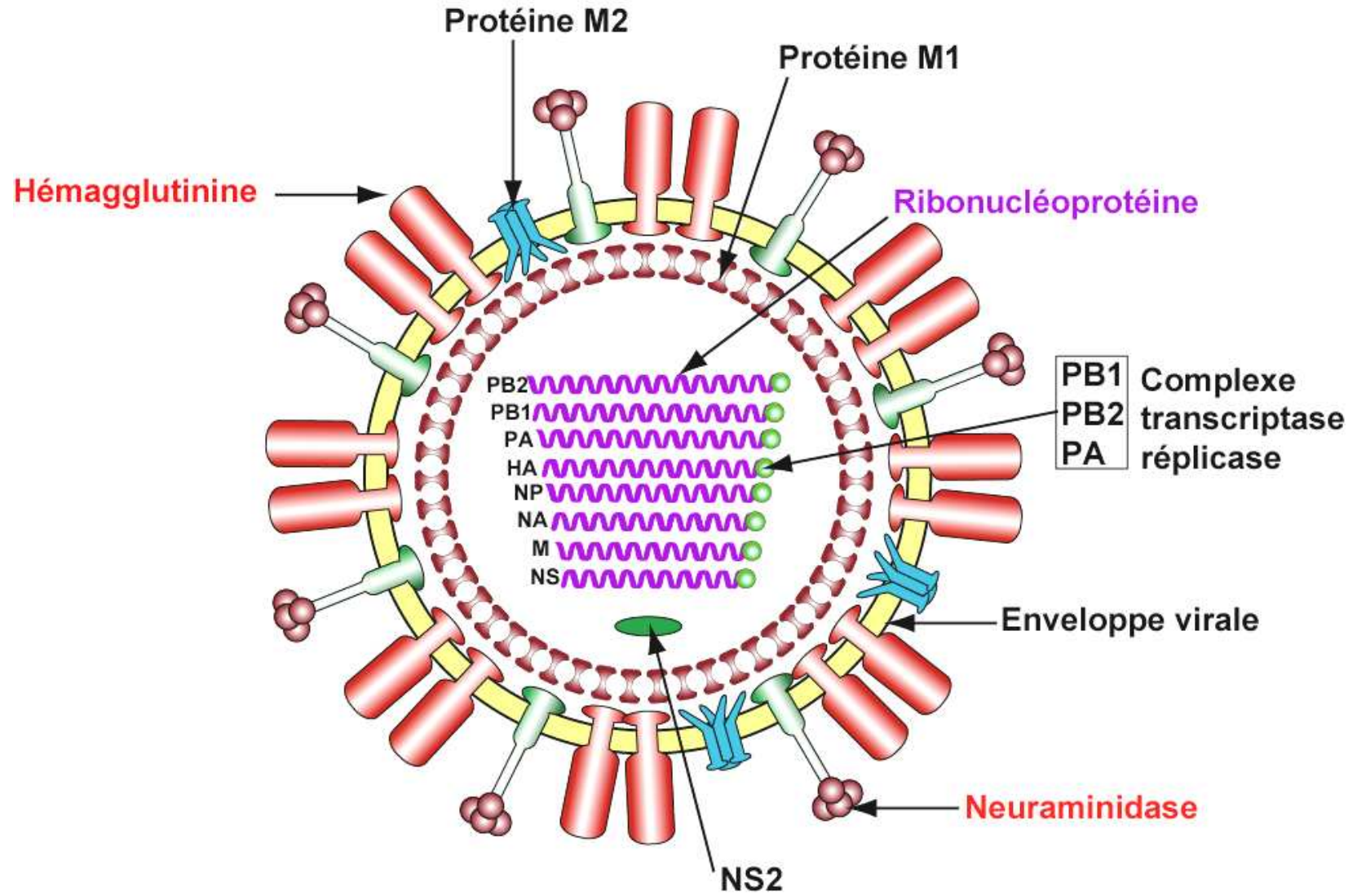
1 Diagnostic direct

- Détection du micro-organisme : isolement (culture)
- Détection d'antigènes
- Détection d'acides nucléiques

2 Diagnostic indirect

- Sérodiagnostic

Exemple : Virus de la grippe

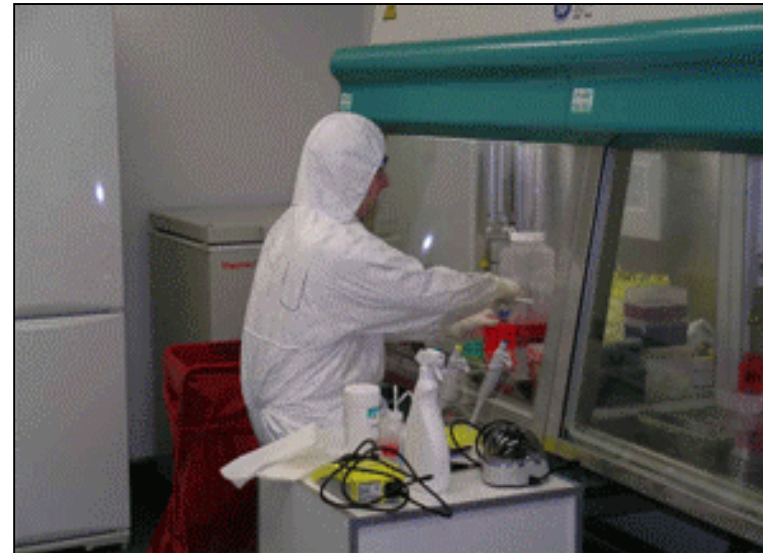


Isolement (culture)

- Ex : Diagnostic biologique de la grippe aviaire (L3)

Isolement : deux types cellulaires MDCK ou oeufs embryonnés

- Sensibilité : >60%
- Spécificité : ~100%
- Avantages : sous-typage, virothèque
- Inconvénients : long (5-10 jours),
infrastructure,
biosécurité



Détection d'antigène

- Ex : Diagnostic biologique de la grippe aviaire (L3)

- Immunofluorescence**

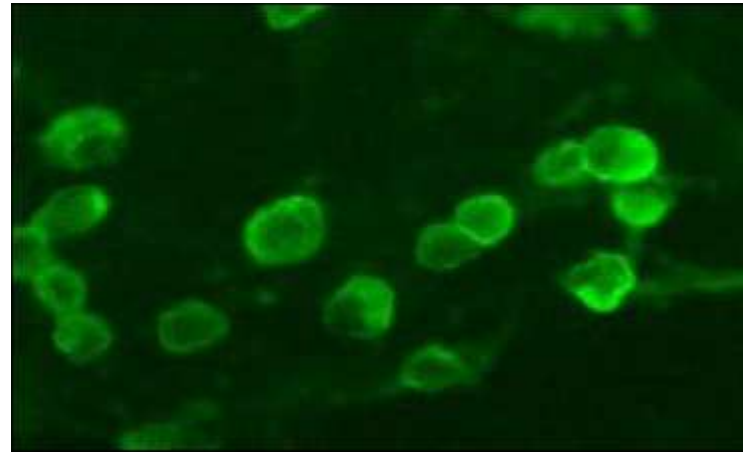
- Avantage : rapide
- Inconvénient : qualité du prélèvement, lecture

- Immuno-essais**

- Avantage : rapide moins complexe
- Inconvénient : coût

- Immuno-chromatographie sur bandelette**

- Avantage : rapide
- Inconvénient : sensibilité?



Détection d'antigène

•Ex : Diagnostic biologique de la grippe aviaire (L3)

Immuno-chromatographie sur bandelette

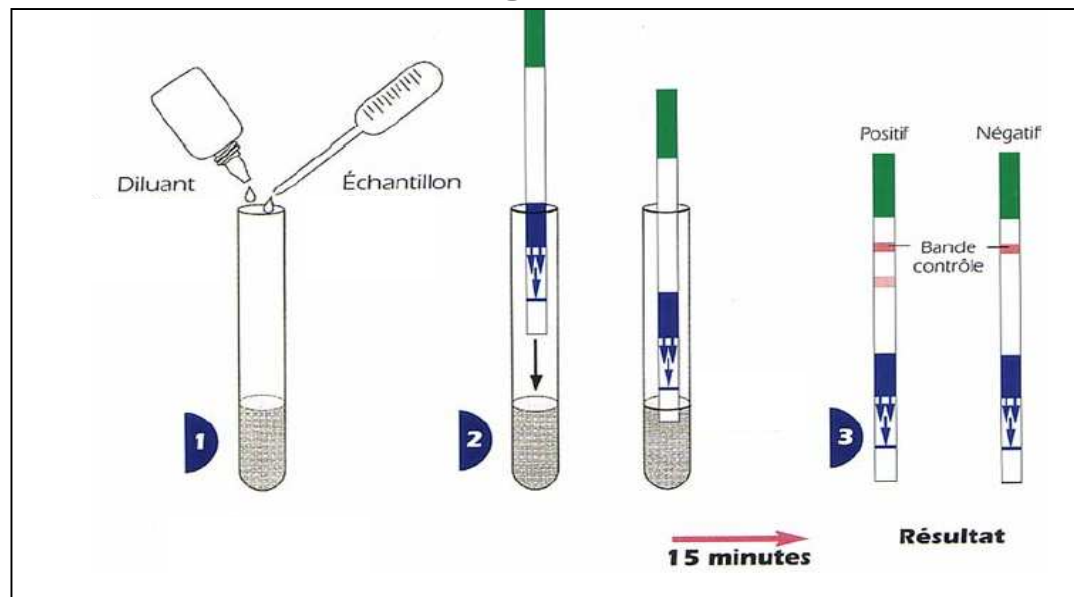


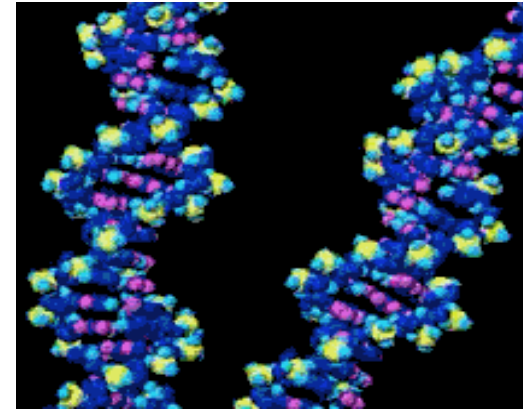
Tableau 2

Les tests de détection rapide des virus grippaux

Tests	Industriel	Lieu du test	Sensibilité/culture (%)	Sensibilité/PCR (%)	Spécificité (%)
Directigen Flu A + B [4,7,8]	Becton-Dickinson		43-95	55-85	76-83
Now FluA – FluB	Binax-Oxoid		82		94
Quick Vue [4,5]	Quidel Argène	Labo Cabinet Lit	74-95	55-80 36-44 74	7-83 97

Détection des acides nucléiques

- Ex : Diagnostic biologique de la grippe aviaire (L3)

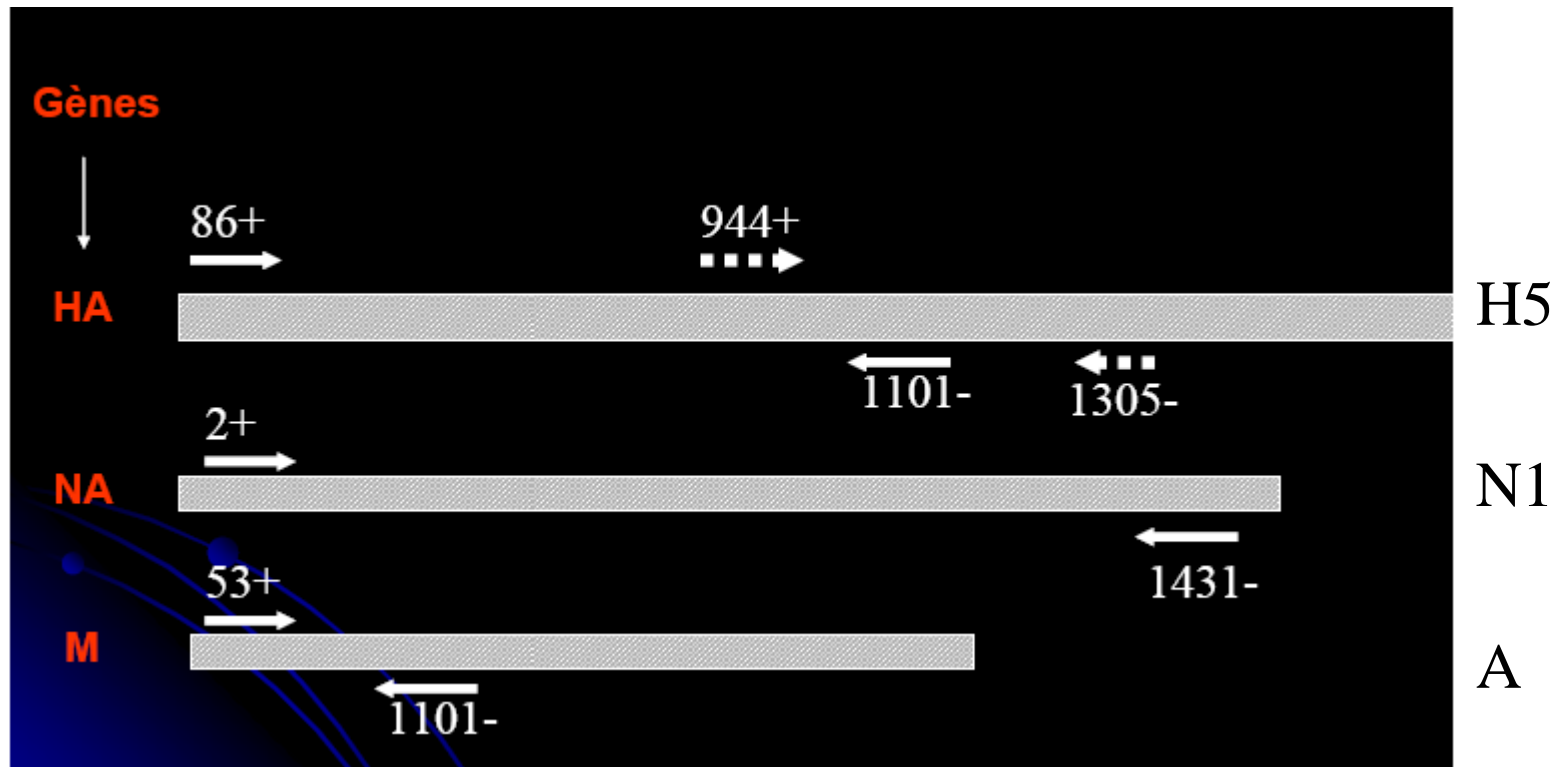


Détection du génome viral (ARN)

- Sensibilité : très élevée
- Spécificité : très élevée
- Avantages : rapidité (PCR en temps réel (45 min à 2 heures),
caractérisation moléculaire
- Inconvénient : coût, laboratoire spécialisé

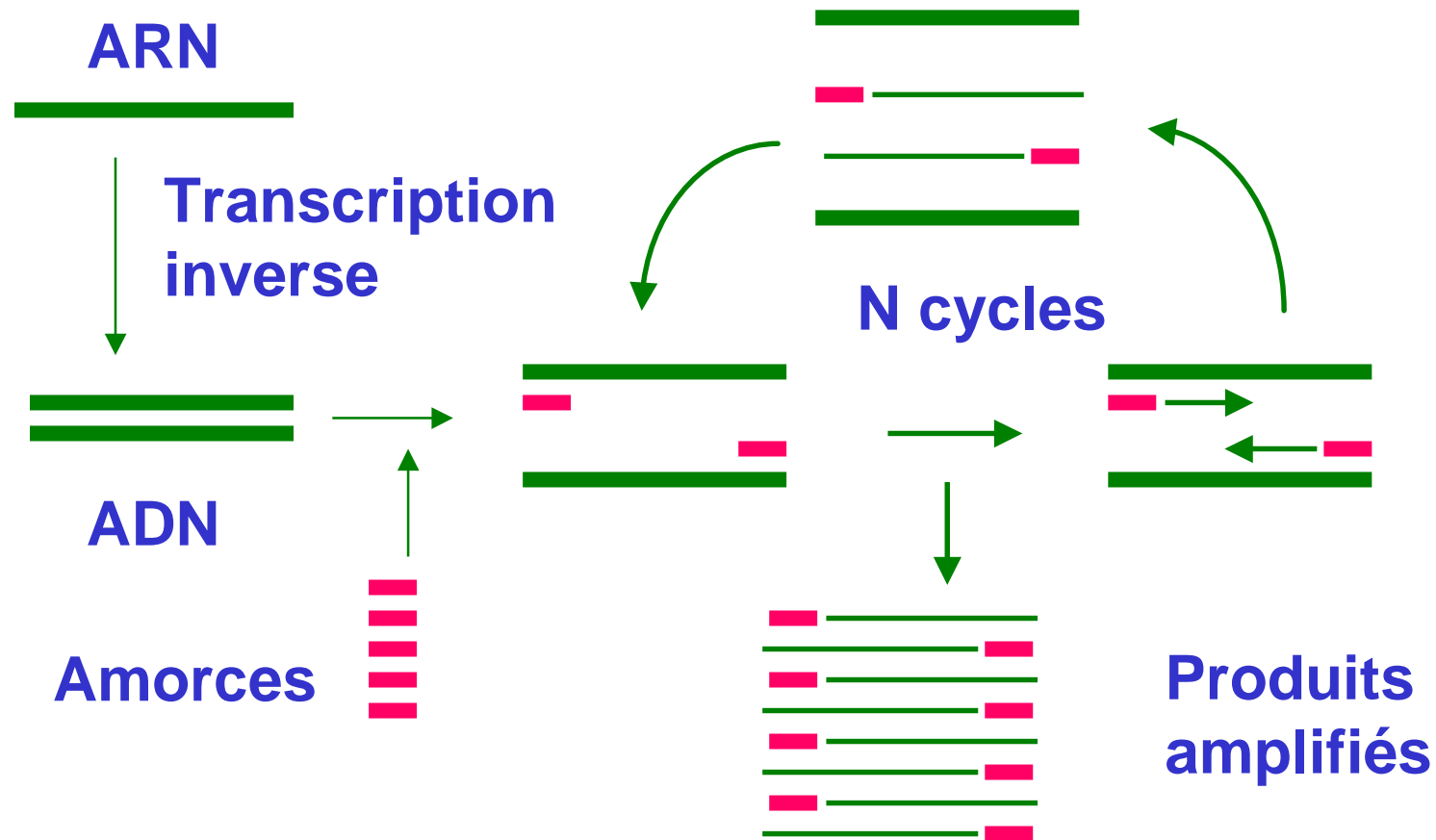
H5N1 : rt-PCR technique recommandé par OMS

Détection d'acides nucléiques



Détection d'acides nucléiques

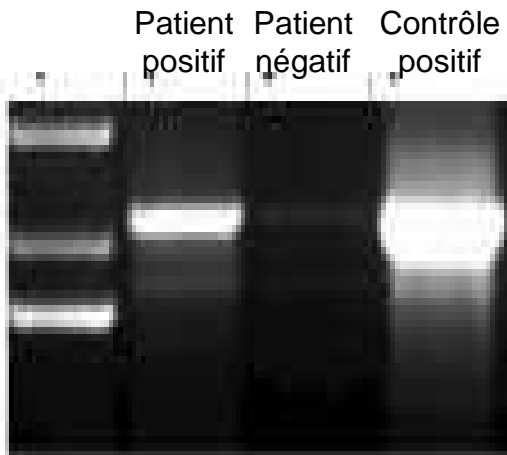
Amplification génique



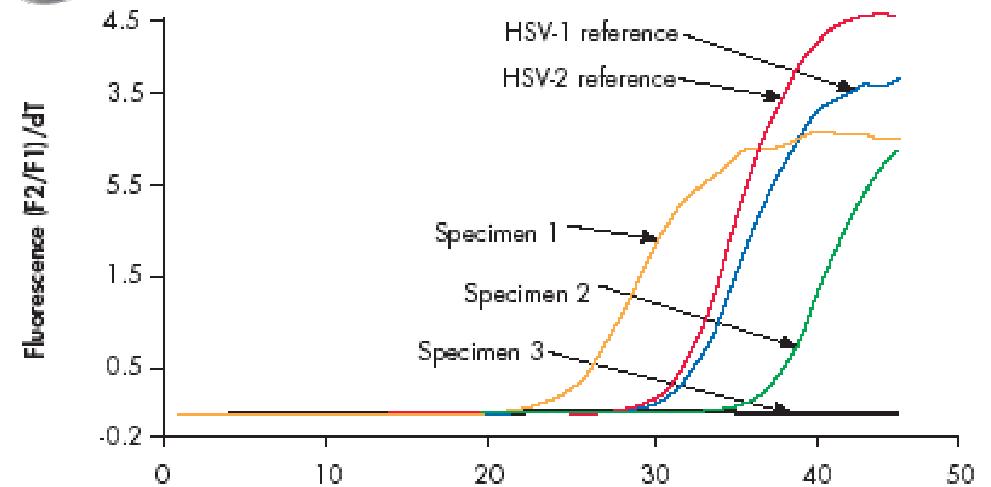
Détection d'acides nucléiques

Amplification du génome viral recherché à l'aide d'amorces spécifiques et d'une polymérisation cyclique en chaîne à l'aide d'une enzyme (*Taq polymérase*)

PCR « classique »

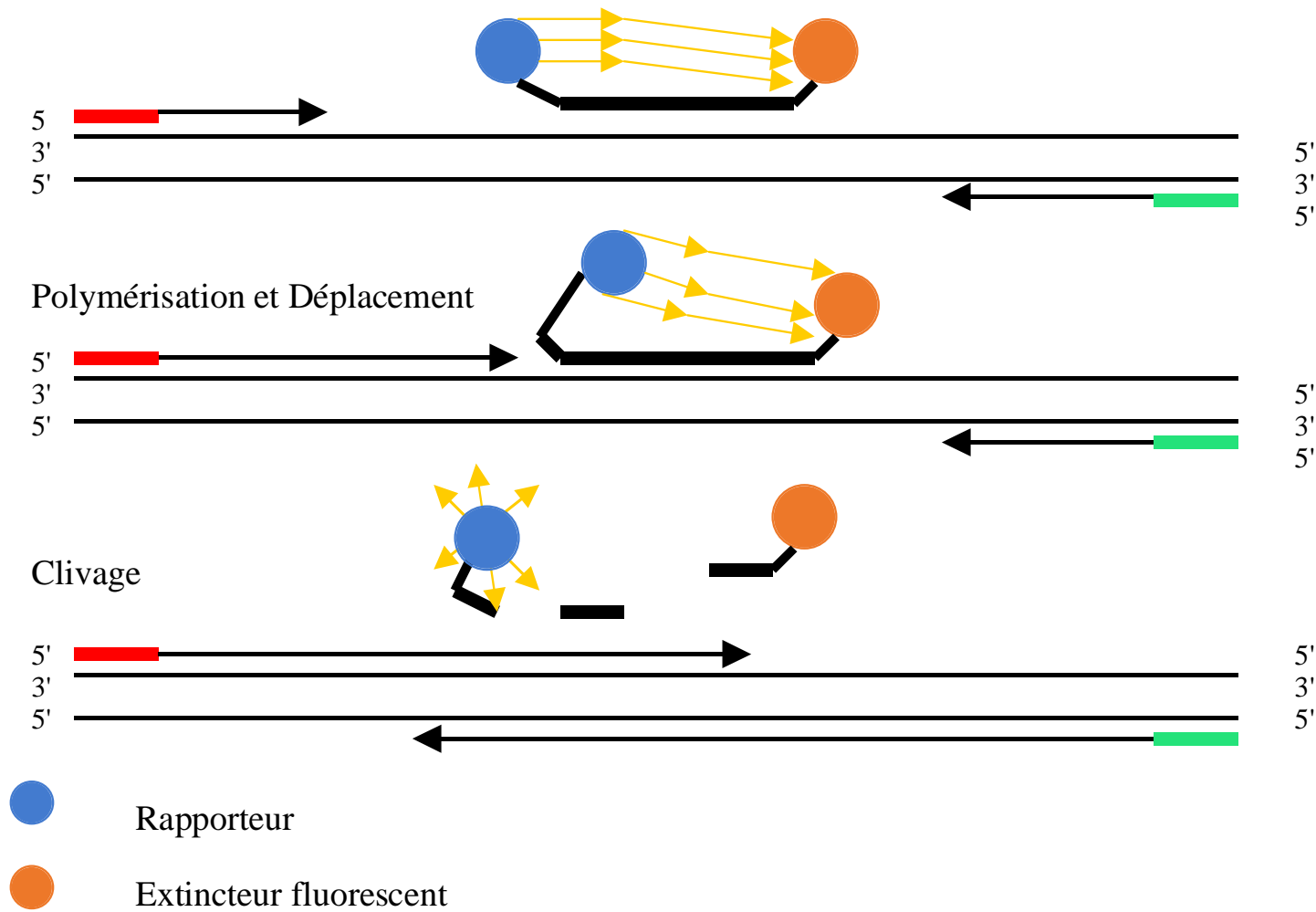


PCR en temps réel



Détection d'acides nucléiques

Principes de la PCR en temps réel



Sécurité

Diagnostic

Veille

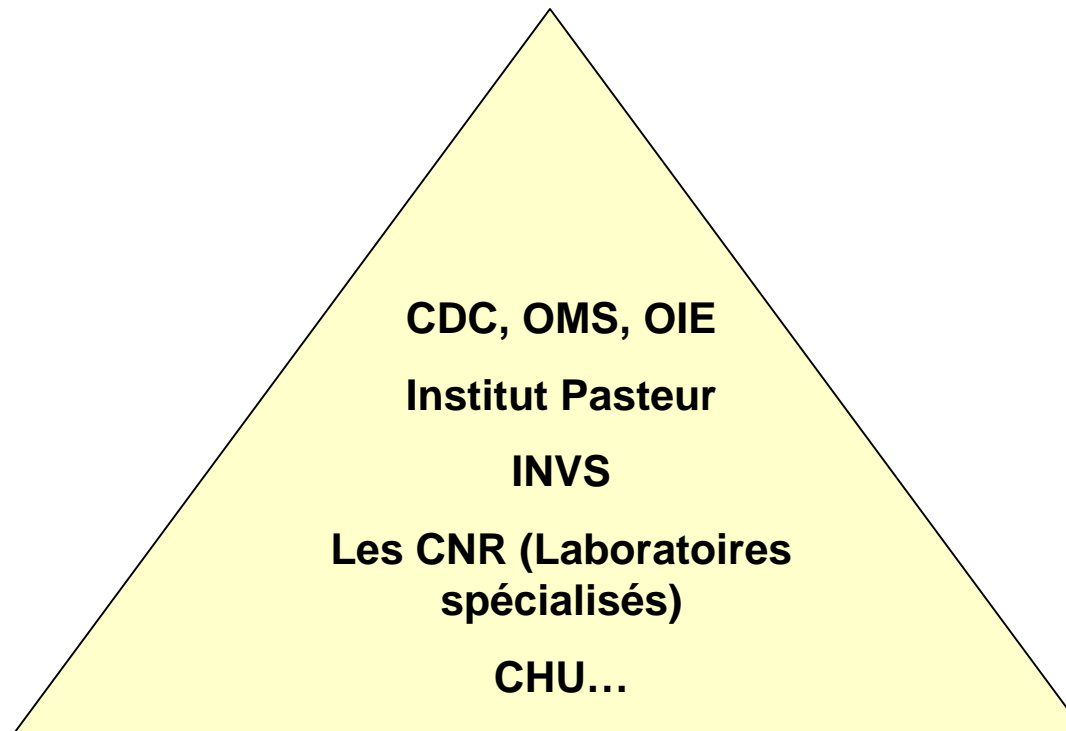
Virus (ré)émergents au cours des vingt dernières années

• HIV-1	1983	• Andes	1996
• HIV-2	1986	(HantaV.Am.Sud)	
• HCV	1988	• ABL	1996
• HHV-6	1988	(<i>australian bat lyssaV</i>)	
• HHV-7	1990	• TT-V	1997
• HEV	1990	• Erythrovirus V9	1998
• Guanarito	1991	• Nipah	1999
(FH Venezuela)		• SEN-V	2000
• Sin Nombre	1993	• cVDPV-1	2000
(Hantav.Am.Nord)		(<i>circulating vaccine derived poliovirus type 1</i>)	
• HHV-8	1994	• hMPV	2001
• Sabiá	1994	• Monkeypox	2003
(FH du Brésil)		• Co-SARS	2003
• Hendra	1994	• Grippe aviaire H5N1	2004
• GBV-C	1995	• ...	
		•	

Les collaborations

Objectifs :

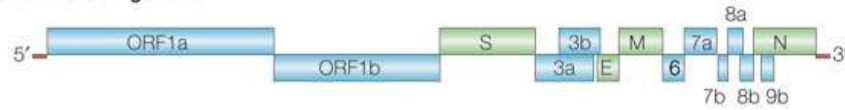
- Détecter les risques « émergenciers »
- Favoriser les collaborations multisectorielles mondiales
- Établir des réseaux de veille épidémiologique, d'alerte, d'action
- Informer et renforcer les moyens (prévention, diagnostic, traitement...)



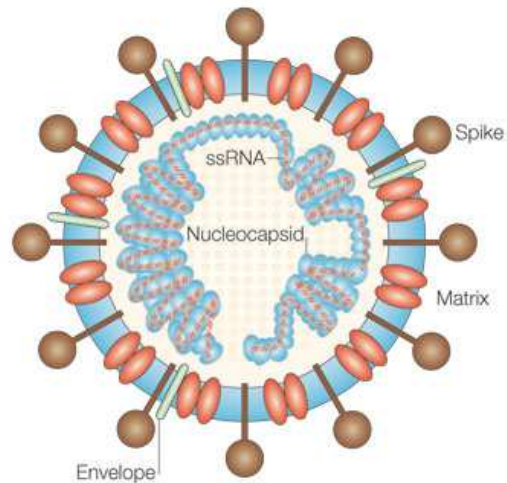
Les leçons du SRAS

Virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

a SARS-CoV genome

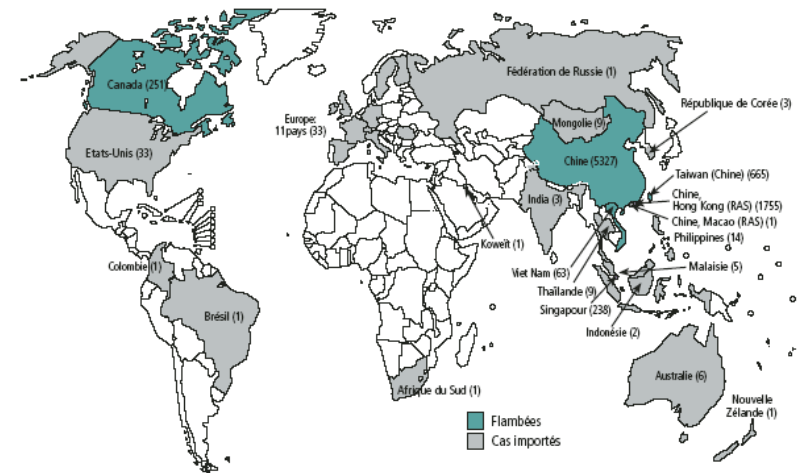
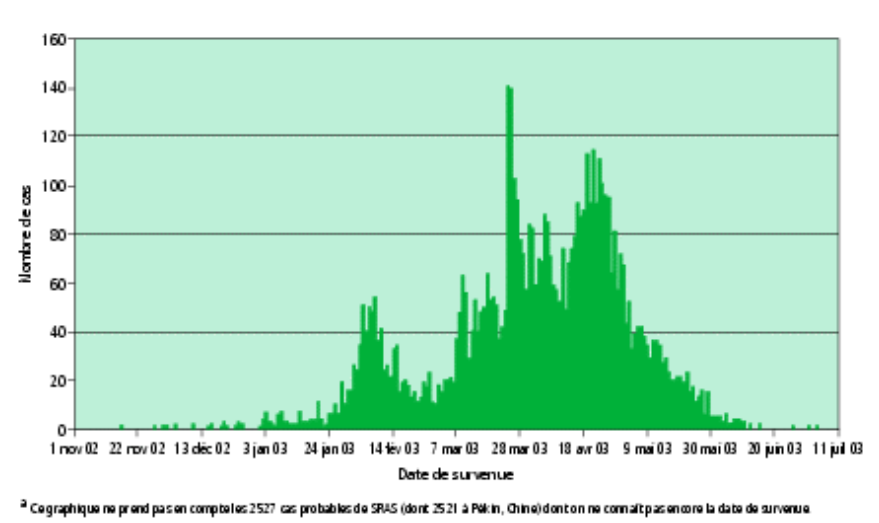


b SARS-CoV virion



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Le bilan de l'épidémie est de **plus de 8000 cas** survenus dans **27 pays**, dont **774 décès**



Les leçons du SRAS

- 16 novembre 2002** : premier cas de pneumopathie atypique à Foshan City, dans la province de Guangdong
- 10 février 2003** : le bureau de l'**OMS** à Beijing reçoit une alerte décrivant une curieuse maladie contagieuse qui a déjà tué lus de 100 personnes dans la province de Guangdong en l'espace d'une semaine
- 11 février** : le **ministère chinois de la santé** annonce officiellement une épidémie de syndrome respiratoire aigu ayant fait 300 cas et provoqué 5 décès. Les analyses effectuées sont négatives pour le virus de la grippe
- 21 février** : un médecin de la province de Guangdong arrive à **Hong Kong** et d'installe à l'hôtel Métropole. Il avait précédemment soigné des patients atteints de pneumopathie atypique avant de quitter la Chine continentale;
- 23 février** : une touriste de 78 ans en provenance de Toronto séjourne à l'hôtel Métropole.
- 26 février** : un homme d'affaire sino-américain est admis à **l'hôpital français de Hanoï** : il avait voyagé dans la province de Guangdong et avait séjourné au 9ème étage de l'hôtel Métropole à Hong Kong.
- 1er mars** : Un premier membre du personnel de l'hôpital français de Hanoï tombe malade de pneumopathie atypique et une femme de 26 ans est admise dans un hôpital de Singapour : elle avait également fait un séjour à Hong Kong à l'hôtel Métropole.
- 5 mars** : 5 membres de la famille de la touriste canadienne tombent malades.
- 10 mars** : au moins 22 membres du personnel de l'hôpital français de Hanoï sont atteints de pneumopathie atypique.
- 12 mars** : Au moment où **l'OMS lance une alerte mondiale**, la **Cellule de lutte contre la Pandémie Grippale** mise en place en **France** se réunit et prend des décisions et informe **les hôpitaux** de la situation.

Les leçons du SRAS

- 13 mars :** L'**OMS** envoie une **alerte** d'urgence à ses partenaires du **GOARN** (Global Alert Research Network, dont fait partie l'**Institut Pasteur**). Pendant ce temps, en France, particulièrement exposée par le retour de médecins français de l'hôpital français de Hanoi, **le groupe de travail sur la pandémie grippale met en place des protocoles** pour rechercher, informer et suivre les médecins de retour de Hanoi.
- 14 mars :** Une mission diligentée par les **Ministères des Affaires Etrangères et de la Santé français** envoie une mission de secours à l'hôpital français de Hanoi composé de personnel du SAMU de France, de l'Hôpital Avicenne (Bobigny) et de l'Institut Pasteur.
- 15 mars :** **L'OMS énonce des recommandations aux voyageurs**, elle nomme la maladie mystérieuse qui se dissémine par l'air et par les transports internationaux SRAS pour "Syndrome Respiratoire Aigu Sévère", et la présente comme une menace de santé mondiale.
- 16 mars :** 150 cas suspects sont recensés à travers le monde.
- 17 mars :** **L'OMS met en place un réseau de 11 laboratoires (dont un à l'Institut Pasteur), dans le but de détecter l'agent en cause et de mettre au point un test diagnostique fiable.**
- 27 mars :** Plusieurs laboratoires annoncent avoir **identifié un nouveau coronavirus** comme agent causal du SRAS.
- 2 avril :** L'OMS émet l'appel le plus sévère jamais lancé en termes de recommandations, conseillant aux personnes devant voyager vers Hong Kong et la province de Guangdong de remettre leurs voyages; le total des cas déclarés dans le monde passe la barre des 2000.
- 16 avril :** **exactement un mois après son instauration, le réseau de laboratoires de l'OMS confirme l'identification d'un nouveau coronavirus comme agent causal du SRAS.**
- 2 mai :** La barre des 6000 cas est franchie
- 27 mai :** **L'Assemblée Mondiale de la Santé** adopte une résolution sur le SRAS reconnaissant la sévérité de la menace posée par cette nouvelle maladie et appelant tous les pays à rapporter leur cas rapidement et en toute transparence.
- 5 juillet :** La chaîne de transmission du SRAS d'homme à homme semble désormais rompue; l'OMS considère que "*la flambée mondiale de SRAS est endiguée*" mais précise : "*la menace subsiste et **les recherches** doivent se poursuivre*".

Les leçons du SRAS

L'épidémie de SRAS en France en 2003

Le Centre National de Référence pour les virus influenzae (Région Nord) également Centre Collaborateur de l'OMS pour les Virus Grippaux et autres virus respiratoires de l'Institut Pasteur qui sont associés à l'Unité de Génétique des Virus Respiratoires, a été au centre du dispositif de surveillance du SRAS en France, en étroite liaison avec le **ministère de la Santé et l'Institut de Veille Sanitaire**.

Il a été chargé d'analyser les prélèvements provenant des cas suspects.

Le CNR de l'Institut Pasteur a analysé au total plus de 1500 prélèvements provenant de 800 patients.

En avril, il a mis à disposition de **7 laboratoires français (L3)** un test de détection du SRAS.

En France, si le nombre de cas suspects (plus de 400) a été élevé, au final seuls 7 cas probables ou avérés de SRAS (dont l'un est décédé) ont été enregistrés: chez cinq de ces patients, la source de la contamination probable était liée à l'épidémie survenue dans l'hôpital français de Hanoï; deux autres patients revenaient de Nankin, en Chine.