

UNIVERSITE DE TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département De Biologie

Laboratoire de la Microbiologie Appliquée à l'agro-Alimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement



MÉMOIRE

Présenté par :

MRABET Khadoudja Amal

En vue de l'obtention du :

Diplôme de MASTER

En Microbiologie et contrôle qualité.

Thème

**Contrôle de l'air et de la surface des postes de sécurité
microbiologique et application de la méthode AMDEC**

Soutenu le **24 Septembre 2019**, devant le jury composé de :

Président : Hessaine Hafida	Professeur	Faculté de science et de la nature, Tlemcen
Encadrant : Guendouz Souheyla	Maitre assistante A	Faculté de Médecine, Tlemcen
Examineur : Henaoui Latifa	Professeur	Faculté de Médecine, Tlemcen
Examineur : Bellifa Samia	Maitre de conférences B	Faculté de science et de la nature, Tlemcen
Examineur : Mkedder Ilhem	Maitre de conférences B	Faculté de science et de la nature, Tlemcen

Année universitaire 2018/2019

الكاتب : مرابط خدوجة أمال

الملخص :

العنوان : مراقبة الهواء وسطح مراكز الأمان في علم الأحياء المجهرية و تطبيق طريقة AMDEC

لقد تم عملنا في مخبر LAMAABE وفي مخبر صيدلانية جالينيكبتلمسان خلال مدة تقدر بسبعة أشهر من أجل وضع مراقبة علم الأحياء المجهرية و سطح مراكز الأمان للعمل والهواء PSM تحليل المخاطر تم القيام به للكشف عن أوضاع الفشل المحتملة لتلاعب رقابة علم الأحياء المجهرية تحت AMDEC وأقتراح الإجراءات الصحيحة .

إن مراقبة علم الأحياء المجهرية قد تحقق عن طريق أخذ عينات الهواء من خمس نقاط PSM مختلفة بواسطة طريقة الترسيب. المراقبة قد تمت بأستراحة وبنشاط .مراقبة الواجهات قد تمت بنشاط من خلال طريقة المسح ، وبالنسبة ل PSM لسطح غير مثقب كنا قد عرفنا خمس نقاط للمسح ، وبخصوص PSM لدينا ست نقاط للتحليل.

تحليل المخاطر AMDEC جعلتنا نتأكد من مكانة تحليل علم الأحياء المجهرية للهواء وأسطح PSM لزيادة الكشف عن تلوث المواد عند التحليل والتي تشوه نتائج المراقبة . نتائج رقابة علم الأحياء المجهرية جعلتنا من الممكن أن نوصي بضرورة مراقبة الهواء والسطحيات بنشاط من خلال تطبيق إجراء للتحقق من صحته .

الكلمات المفتاحية

AMDEC - التلوث المجهرية – التلوث المنعكس – المراقبة - PSM

Résumé

Titre : Contrôle de l'air et de surface des postes de sécurité microbiologique et application de la méthode AMDEC

Notre travail a été réalisé au laboratoire LAMAABE et laboratoire de pharmacie galénique de TLEMCEM, pendant une durée de 7 mois dans le but de mettre en place un contrôle microbiologique des surfaces de travail et de l'air des PSM. Une analyse de risque AMDEC a été effectuée afin de détecter les modes de défaillance possibles d'une manipulation de contrôle microbiologique sous PSM et proposer des actions correctives et préventives.

Le contrôle microbiologique est réalisé en effectuant des prélèvements d'air au niveau de 5 points différents avec la méthode de sédimentation. Le contrôle est réalisé en repos et en activité. Le contrôle des surfaces est réalisé en activité par méthode d'écouvillonnage. Pour les PSM à surface non perforée nous avons défini 5 points d'écouvillonnage, et pour les PSM à surface perforée nous avons 6 points d'analyse.

L'analyse de risque AMDEC nous a permis de confirmer la place de l'analyse microbiologique de l'air et des surfaces des PSM afin d'augmenter la détectabilité d'une contamination du produit au moment de l'analyse et qui faussera les résultats du contrôle. Les résultats du contrôle microbiologique nous ont permis de recommander le contrôle de l'air et des surfaces en activité en appliquant une procédure préalablement validée.

Mots clés : AMDEC, Biocontamination, Contamination croisée, Contrôle, PSM.

Summary

Title: The air control of the microbiological security of post surface and the application of FMECA method

Our work was conducted in the laboratory LAMAABE and galenic pharmaceutical laboratory of TLEMCEN, during a period of 7 months in order to set up a microbiological control of the working surfaces and the air of the PSM. A risk analysis FMECA has been performed to detect the possible failure modes of microbiological control manipulation under PSM and propose corrective and preventive actions. Microbiological control is performed by taking air samples at 5 different points of time with the sedimentation method. The control is then carried out in both rest and in activity. The surface control is performed in activity by swabbing method. For non-perforated PSM we have defined 5 swab points, and for PSM with perforated surface we have 6 points of analysis. The FMECA risk analysis allowed us to confirm the role of the microbiological analysis of the air and the surfaces of the PSM in order to increase the detectability of a contamination of the product at the time of the analysis and which will distort the results. The results of the microbiological control allowed us to recommend the control of air and surfaces in activity by applying a previously validated procedure.

Key words: FMECA, Biocontamination, Cross Contamination, Control, PSM.

Remerciement

Merci à Docteur GUENDOOUZ Souhila, Maitre assistante en pharmacie galénique de la faculté de médecine de Tlemcen

D'avoir donné à ce travail un sens pédagogique et culturelle.

Ce fut un grand honneur pour moi d'être encadrée par une enseignante telle que vous, tant pour vos qualités professionnelles incontestables que pour votre soutien. J'ai apprécié l'étendue de vos connaissances et votre expérience dans l'univers de la pharmacie galénique

Veillez trouver ici, cher maitre assistante, le témoignage de ma profonde gratitude et mon grand respect.

Merci à Pr Hessaine, directrice de laboratoire LAMAABE, Professeur en microbiologie à la faculté de Tlemcen

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de présider notre jury.

J'ai bénéficié de votre aide et J'ai admiré en vous, vos grandes qualités humaines et professionnelles de savoir et de savoir-faire.

Merci à Pr HENAOUI Latifa, Professeur en épidémiologie à CHU Tlemcen

Vous êtes la personne qui a réussi à m'inspirer à me donner confiance en moi; mais aussi qui a réussi à me donner envie d'apprendre. Vous êtes comme une deuxième mère pour moi; je serai très reconnaissante et pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Merci à Dr BELLIFA.S, maitre de conférences B

« La valeur d'un enseignant se mesure à la qualité de ses leçons » je dois dire que la passion pour votre travail et pour la Microbiologie est contagieuse .ça été un honneur pour moi de vous avoir comme jury.

Merci à Dr MEKEDDER.I, maitre de conférence B

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'examiner mon travail.

A Monsieur BENAMMAR Chahid, Chef de département de Biologie

Votre travail est stressant ; vous ne comptez plus les heures et pourtant vous avez toujours été attentive et compréhensive. Je vous remercie pour votre engagement à moncoté et votre soutien tout le long de cette année.

A Madame SOULIMANE Amal ; Doyen de la faculté de SNV, A Mr BELYAKOUBI; Vice doyen de la faculté de SNV, A madame BELARBI Meriem Ex vice doyen de la graduation, et à Madame Malek ; responsable de master Microbiologie et contrôle de qualité.

Je tenais à vous dire « Merci » sincère pour vos conseils et votre aide si précieuse. J'ai voulu que vous sachiez que je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi et que cette année ne sera jamais spécial si je vous ai pas connu.

Dédicaces

Par la grâce de Dieu Le tout-puissant et les personnes qui m'ont aidé, j'ai pu réaliser ce modeste travail, que je dédie en particulier à mes très chers parents qui ont toujours cru en moi, je dois dire que sans leurs soutien et leurs générosité ; je ne deviendrais jamais ce que je suis maintenant. Pour vous cher papa et chère maman vous êtes le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager .tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les sacrifices que vous m'avez jamais cessé de consentir. Vos prières m'ont été un grand secours.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfant et vos petits-enfants.

A mes grands-parents puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa miséricorde et vous accueillir dans son saint paradis.

A mes frères Amine, Lokman et mon chouchou adoré Youcef, je ne peux exprimer à travers ces lignes mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Je vous dois tant de respect et de reconnaissance, je vous adore.

À toute ma famille, je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour et mon attachement.

En fin, je dédie ce travail à tous mes amis, mes collègues les pharmaciens promo 2017, mes enseignants depuis le primaire jusqu'aux études supérieurs.

MRABET.A

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES SCHEMAS.....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
INTRODUCTION.....	1
DONNEES DE LA LITTERATURE	3
CHAPITRE 1 : LES POSTES DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE.....	3
I. Classification des Postes de Sécurité Microbiologique.....	4
II. La qualité de l’air des Postes de Sécurité Microbiologique	6
II.1. Contrôle de l’air.....	10
II.2. Contrôle microbiologique des surfaces	14
II.3. Contrôle de l’intégrité des filtres	15
III. Conception des locaux	17
IV. Les bonnes pratiques au laboratoire.....	20
CHAPITRE 2 : ASSURANCE QUALITE.....	22
I. Le système documentaire.....	22
I.1. Gestion des risques qualité.....	23
I.1.1. L’analyse de risque AMDEC.....	24
II. MATERIEL ET METHODES.....	29
II.1. Objectif de l’étude	29
II. 2. Matériel et méthodes	29
II.2.1. Analyse de risque AMDEC	29
II.2.2. Contrôle air et surface des PSM	34
III. RESULTATS	39
III.1. Analyse de risque AMDEC.....	39
III.2. Contrôle des PSM.....	48
III.2.1. Contrôle des surfaces	48
III.2.2. Contrôle de L’air	49
IV. DISCUSSION.....	51
CONCLUSION.....	54

Liste des figures

Figure 1 : PSM classe I (4).....	4
Figure 2 : PSM classe II (4)	5
Figure 3 : Type du plan de travail dans un PSM.....	8
Figure 4 : Une installation typique de PSM de Classe II(8).....	9
Figure 5: Mode opératoire schématisé pour le test d'intégrité d'une salle équipée d'un plafond filtrant (Emission de l'aérosol par une CTA située en local technique)	16
Figure 6 : Schéma des distances minimales conseillées pour l'implantation des PSM(15)	19
Figure 7: Schéma d'une installation de ventilation(15)	19
Figure 8 : Pyramide documentaire d'un système management qualité.....	22
Figure 9 : Stérilisation surface PSM avec la lumière UV	34
Figure 10 : Schéma de prélèvement de surface à l'écouvillon.	35
Figure 11: Contrôle microbiologique des surfaces	35
Figure 12 : Les points de prélèvement de surface des PSM laboratoire LAMAABE	36
Figure 13 : Les points de prélèvement de surface des PSM laboratoire galénique.....	36
Figure 14 : image montre le contrôle de l'air en état de repos.....	37
Figure 15 : images montrent le contrôle de l'air en état de repos	38
Figure 16 : Les points de prélèvement de l'air	38

Liste des tableaux

Tableau I : Les différences entre les PSM classe I, II et III(4)	6
Tableau II : Classes types de propreté particulaire de l’air des salles ou zones propres.....	6
Tableau III: Classification des filtres « Absolus » - HEPA – ULPA Norme Européenne EN 1822.....	7
Tableau IV : les taux de renouvellement d’air en fonction du classement particulaire souhaité.....	7
Tableau V: Spécifications minimales pour le compteur optique de particules	11
Tableau VI: Caractéristiques de biocollecteurs d’après la norme ISO 14698-1	13
Tableau VII: les normes de la contamination de l’air et des surfaces dans les classes ISO 5	15
Tableau VIII: Récapitulatif des principales méthodes d’analyse de risques (18).....	24
Tableau IX : Les différents types d’AMDEC(19, 21).....	26
Tableau X : Cotation de la sévérité.	31
Tableau XI : Cotation de la probabilité.	31
Tableau XII : Cotation de la détectabilité.	31
Tableau XIII : Classification du risque en fonction de la sévérité et la détectabilité.....	32
Tableau XIV : Classification du risque en fonction de la sévérité, détectabilité	32
Tableau XV : Classification du risque en fonction de sévérité, détectabilité et probabilité	33
Tableau XVI : Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité sur les étapes de prélèvement et transport	40
Tableau XVII : Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité sur les locaux et les PSM au cours de l’analyse	44
Tableau XVIII : Résultat de contrôle de la surface du PSM1 salle 1 LAMAABE.....	48
Tableau XIX : Résultat de contrôle de la surface du PSM2 salle 2 LAMAABE	48
Tableau XX : Résultat de contrôle de la surface du PSM _{GAL}	48
Tableau XXI: résultat de contrôle de l’air au repos de la PSM 1 salle 1 LAMAABE	49
Tableau XXII : résultat de contrôle de l’air au repos de la PSM 2 salle 2 LAMAABE	49
Tableau XXIII : Résultat de contrôle au repos de l’air du PSM _{GAL}	49
Tableau XXIV : résultat de contrôle de l’air en activité repos de la PSM 1 salle 1 LAMAABE	50
Tableau XXV : résultat de contrôle de l’air en activité de la PSM 2 salle 2 LAMAABE .	50
Tableau XXVI : Résultat de contrôle de l’air en activité du PSM _{GAL}	50

Liste des schémas

Schéma 1 : Cycle de vie d'un PSM.....	10
Schéma 2 :Les étapes de la démarche AMDEC.....	29
Schéma 3 : les étapes d'une analyse sous PSM.	30

Liste des abréviations

AdD : Arbre de Défaillance

AMDEC: Analyse de Mode de Défaillances et de leur Criticité

APR: Analyse Préliminaire des Risques

ASTM: *American Society for Testing Material*

DOP: dioctyl-phthalate

EN: *European Norm*

HACCP: *Hazard Analysis Critical Control Point*

HAZOP: *Hazard and operability studies*

HEPA: *High Efficiency Particulate Air*

ISO : *International Organization for Standardization*

L/min :Litre/Minute

m³ :mètre cube

mg :milligramme

m/s: mètre / seconde

NF :Norme Française

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PVC : Poly (Chlorure de Vinyle)

SMQ : Système Management Qualité

UFC : *Unit Forming Colony*

ULPA: *Ultra Low Penetration Air*

INTRODUCTION

Le contrôle de la qualité microbiologique a été pendant longtemps une préoccupation majeure de plusieurs secteurs industriels. Face aux exigences éthiques et réglementaires, il s'agit d'une réelle responsabilité qui nécessite une grande vigilance et un respect de la réglementation.

La sécurité microbiologique dans un laboratoire a pour objectif d'assurer la protection du personnel et de l'environnement et de garantir la qualité et la fiabilité des résultats de contrôle. Les compétences en microbiologie sont des éléments clés et nécessitent des connaissances approfondies des bonnes pratiques.

La mise en place d'une organisation conforme aux exigences permet de prévenir tout risque de contamination et l'utilisation des postes de sécurité microbiologique (PSM) est la mieux adaptée aux activités de contrôle microbiologique (1). Elle constitue l'un des principaux moyens pour éviter les contaminations. En effet, une zone à contamination maîtrisée assure un environnement d'un niveau de propreté connu et permet une maîtrise du nombre et de la qualité des contaminants dans cet espace, quelles que soient les variations de l'environnement extérieur et de l'activité réalisée à l'intérieur. Son utilisation conforme permet d'éviter toute contamination ou contamination croisée du produit ainsi que toute contamination du personnel. Un contrôle périodique de la qualité de l'air et des surfaces du PSM est devenu un outil d'évaluation et un objectif de sécurité et de conformité des PSM.

Quelle est la place du contrôle du PSM dans le circuit du contrôle qualité microbiologique d'un produit ? Quelles sont les points de contrôle représentatifs de l'air et de la surface d'un PSM? Et à quel état d'activité le contrôle est recommandé ?

Notre travail a été réalisé dans le but de mettre en place un contrôle microbiologique des surfaces de travail et de l'air des PSM dans le laboratoire LAMAABE et le laboratoire de pharmacie galénique de la faculté de médecine.

Nous commençons par une revue bibliographique sur les PSM et leur utilisation, et l'analyse de risque « Analyse de mode défaillances et leur criticité » AMDEC.

Puis, nous développerons dans la partie pratique l'analyse de risque AMDEC des PSM et le protocole de contrôle microbiologique des PSM.

En fin, nous terminons par une conclusion où nous montrons les apports de notre travail et des recommandations pour une meilleure maîtrise de l'utilisation des PSM.

DONNEES DE LA LITTERATURE

CHAPITRE 1 : LES POSTES DE SECURITE MICROBIOLOGIQUE

Les postes de sécurité microbiologique sont des espaces de travail de laboratoire fermés et ventilés conçus pour protéger l'utilisateur et son environnement des agents pathogènes ainsi qu'un confinement dynamique des produits manipulés(2). Ils sont utilisés comme principale barrière contre l'exposition à des agents biologiques infectieux et dans certains cas pour protéger l'échantillon d'une contamination externe.

Un PSM dispose de filtres HEPA (*High Efficiency Particulate Air*). Ces filtres ne retiennent que les particules, permettant ainsi à tout contaminant sous forme non particulaire de traverser le filtre.

Le flux d'air dans le PSM est laminaire, c'est-à-dire que l'air se déplace avec une vitesse uniforme dans la même direction le long de lignes de flux parallèles.

Selon la conception du PSM, l'air peut être évacué dans la pièce ou à l'extérieur. Un pourcentage de l'air est recyclé dans la plupart des types de PSM.

Un PSM doit avoir au minimum 1,20 m de largeur pour permettre un accès aisé et une manipulation selon les bonnes pratiques (3).

Ces installations doivent répondre aux normes internationales:

- Normes ISO
- Norme européenne EN 12469
- Norme américaine ANSI / NSF49
- Norme japonaise JIS K 3800

I. Classification des Postes de Sécurité Microbiologique

La norme EN 12469 divise les PSM en trois classes: I, II et III en fonction du type d'analyse à réaliser.

I.1. Les Postes de Sécurité Microbiologique classe I

La classe I fournit une protection à l'utilisateur et à l'environnement, mais aucune protection à l'échantillon manipulé. L'équipement est adapté pour l'utilisation des souches de microorganismes viables ne causant pas de maladie chez l'adulte en bonne santé.

Le flux d'air dirigé vers l'intérieur du PSM ensuite il passe à travers un système de filtration formé d'un préfiltre et d'un filtre HEPA et enfin l'air pur décontaminé et évacué du poste. Aucune partie de l'air n'est recyclée. Le débit minimal requis est de 0,38 m/s (4).

Les filtres HEPA sont des filtres secs, jetables, composés de microfibrilles borosilicatées condensées. Ils assurent l'arrêt de 99,97 % de particules $\geq 0,3 \mu\text{m}$ (3). Ils sont donc efficaces contre :

- Particules fines
- Fumée
- Bactérie (500 - 0,3 microns)
- Pollen
- Virus (car ce sont des parasites, donc s'attachent aux cellules)

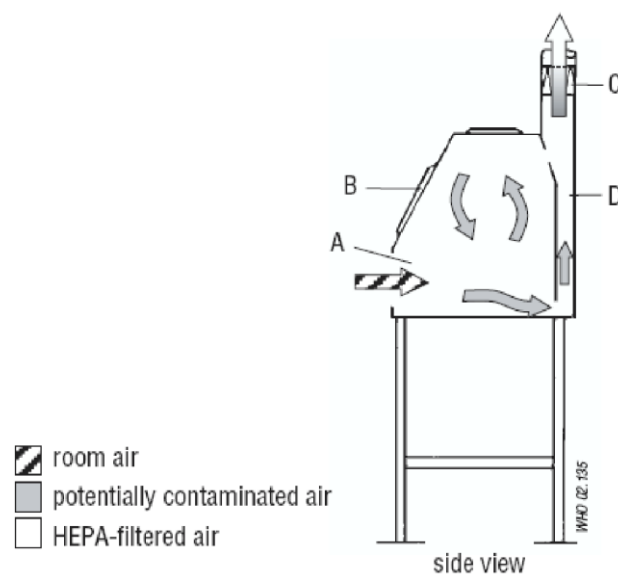


Figure 1 : PSM classe I (4)

I.2. Les Postes de Sécurité Microbiologique classe II

La classe II assure la protection de l'utilisateur, de l'environnement et de l'échantillon. La caractéristique principale de cette classe est le flux d'air laminaire descendant et vertical à l'intérieur du PSM. Elle est divisée en quatre types: A1, A2, B1 et B2. Les principales différences entre les quatre types sont la vitesse d'entrée d'air et le système d'échappement. 70% de l'air est recyclé(4).

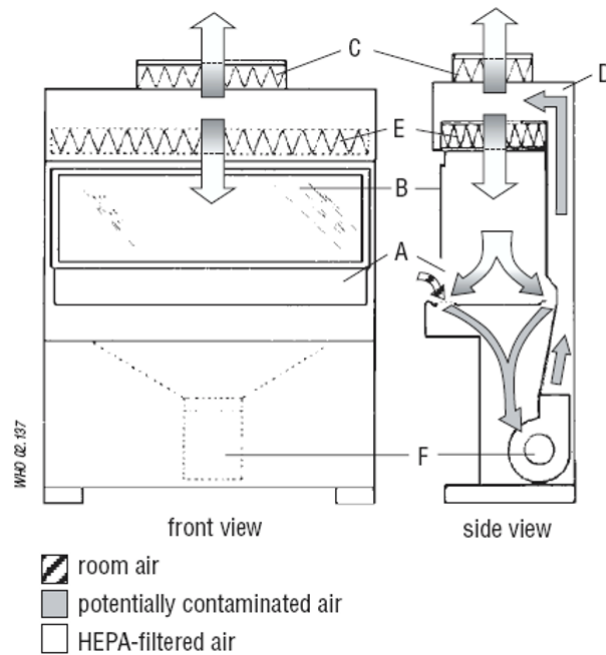


Figure 2 : PSM classe II (4)

I.3. Les Postes de Sécurité Microbiologique classe III

La classe III, également appelée boîte à gants, offre une protection maximale. L'enceinte est étanche aux gaz. Le matériel et les échantillons sont introduits à travers un passe box ou un autoclave à double porte. L'accès à la surface de travail est réalisé à l'aide des gants étanches. La filtration de l'air est réalisée au moyen de deux filtres HEPA(4).

Tableau I : Les différences entre les PSM classe I, II et III(4)

PSM	Vitesse de l'air (m/s)	Flux d'air (%)		Système d'élimination
		Recyclé	Éliminé	
Classe I	0,36	0	100	Conduit dur
Classe IIA1	0,38-0,51	70	30	Élimination vers la salle ou le coude de connexion
Classe IIA2 ventilée vers l'extérieur	0,51	70	30	Élimination vers la salle ou le coude de connexion
Classe IIB1	0,51	30	70	Conduit dur
Classe IIB2	0,51	0	100	Conduit dur
Classe III	NA	0	100	Conduit dur

NA : non applicable

Le choix du PSM est fonction de plusieurs critères(5) :

- Le type de protection du personnel
- Le type de protection du produit
- Le niveau de risque des microorganismes à manipuler
- L'emplacement du PSM

II. La qualité de l'air des Postes de Sécurité Microbiologique

L'air contient naturellement des particules (contamination particulaire) et des microorganismes (aérobiocontamination) d'où l'importance de filtrer rigoureusement l'air entrant dans les PSM.

Selon la norme NF EN ISO 14644-1, les caractéristiques particulières et microbiologiques de différentes zones varient selon que les prélèvements sont réalisés « au repos » ou « en activité » (6).

Tableau II : Classes types de propreté particulaire de l'air des salles ou zones propres

Numéro de classification	Concentrations maximales admissibles (particules/ m ³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celle donnée ci-dessous					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
Classe ISO 1	10	2				
Classe ISO 2	100	24	10	4		
Classe ISO 3	1000	237	102	35	8	
Classe ISO 4	10000	2370	1020	352	83	
Classe ISO 5	100000	23700	10200	3520	832	29
Classe ISO 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
Classe ISO 7				352000	83200	2930
Classe ISO 8				3520000	832000	29300
Classe ISO 9				35200000	8320000	293000

La vitesse du flux d'air dans un PSM est 0,4m/s. La qualité de l'air correspondant à la classe ISO 5 (EN 14644-1).

Selon la norme EN 12469 un PSM doit être équipé d'un filtre HEPA de classe H14 ou d'un filtre ULPA.

Tableau III: Classification des filtres « Absolus » - HEPA – ULPA Norme Européenne EN 1822

Extrait NF EN1822-1 Classe de filtre		Valeurs locales à la MMPS		Valeurs locales à la MPPS*	
		Efficacité	Pénétration	Efficacité	Pénétration
HEPA	H10	85%	15%		
	H11	95%	5%		
	H12	99,5%	0,5%		
	H13	99,95%	0,05%	99,75%	0,25%
	H14	99,995%	0,005%	99,975%	0,025%
ULPA	U15	99,9995%	0,0005%	99,9975%	0,0025%
	U16	99,99995%	0,00005%	99,99975%	0,00025%
	U17	99,999995%	0,000005%	99,999975%	0,000025%

*MPPS : taille de la particule la plus pénétrante.

Le traitement de l'air nécessite plusieurs paramètres :

- la surpression, qui permet d'éviter l'entrée d'air en provenance de l'extérieur ;
- la filtration de l'air ;
- la diffusion de l'air selon un mode unidirectionnel ou non unidirectionnel ;
- le taux de renouvellement de l'air exprimé par un rapport entre le débit d'air et le volume du PSM (tableau IV).

Tableau IV : les taux de renouvellement d'air en fonction du classement particulaire souhaité.

Classement ISO 14644-1	Taux de renouvellement (V/h)
ISO 8	15 à 30
ISO 7	30 à 50
ISO 6	50 à 100
ISO 5 et moins	250 à 600

La qualité de l'air est influencée par le type de plan de travail dans le PSM : perforé ou non perforé.

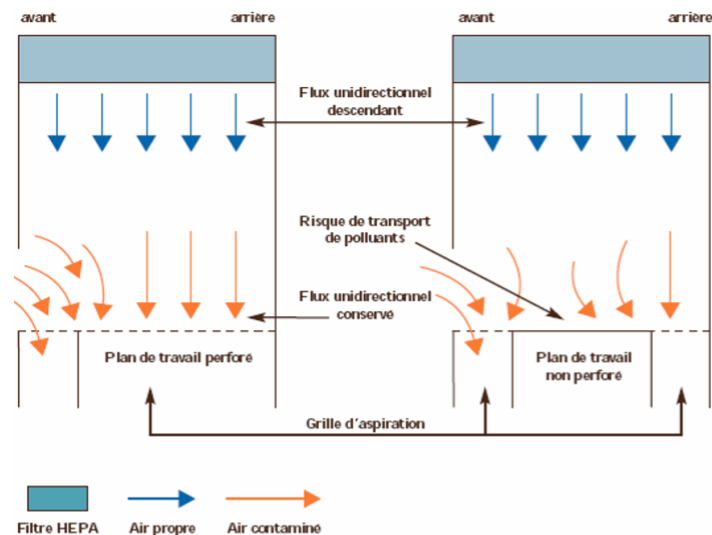


Figure 3 : Type du plan de travail dans un PSM

Au Repos la qualité de l'air dépend de la pression relative, du degré de filtration et du nettoyage. En Activité elle dépend du taux de renouvellement d'air, de la maîtrise des flux et du comportement du Personnel (7).

- Les filtres HEPA des PSM présentent une grande sensibilité à cause de la grande vitesse du flux d'air. Ils sont facilement interrompus par l'air généré par des fenêtres ou portes ouvertes et des systèmes d'aération proches. Pour éviter ces problèmes les PSM doivent être placés à distance des passages dans un endroit éloigné de tous courants d'air. Un espace de 30 à 35 cm doit être ménagé entre l'enceinte et le plafond pour permettre une mesure précise de la vitesse de l'air et pour les changements du filtre. Derrière le PSM et sur chaque côté un espace libre d'au minimum 30 cm est laissé libre pour faciliter l'accès lors d'un entretien de maintenance.
- De plus, la régularité du flux d'air entrant est d'autant plus difficile à assurer que le plan de travail est large d'où la proscription de plus d'un manipulateur par PSM.
- Les flammes nues perturbent le flux d'air, elles sont dangereuses lorsqu'on manipule des substances volatiles inflammables. Elles doivent être évitées et remplacées par des micro incinérateurs ou « fourneaux » électriques.

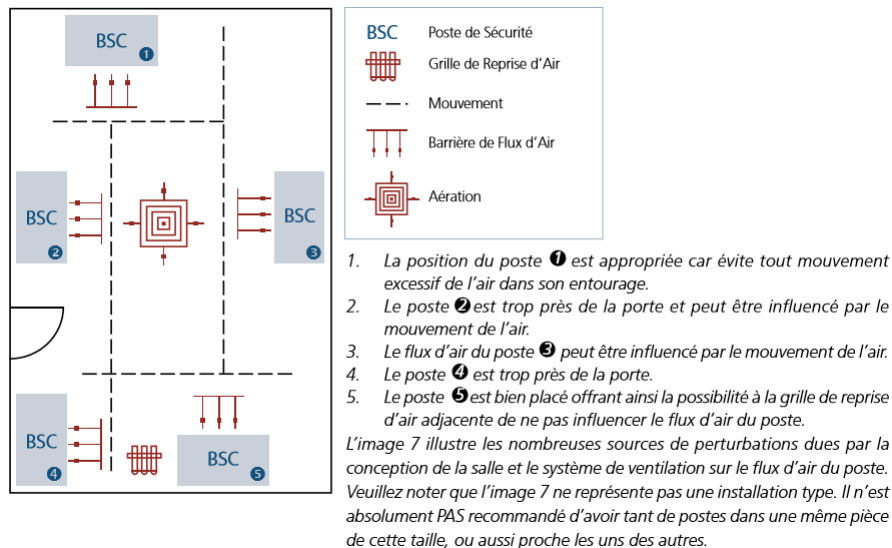


Figure 4 : Une installation typique de PSM de Classe II(8)

Un PSM doit être alimenté par une source de courant ininterrompue et un ventilateur d'extraction est nécessaire lorsque l'alimentation électrique manque de fiabilité. Cette précaution donne au personnel du laboratoire le temps d'achever les manipulations dangereuses qui sont en cours et d'évacuer vers l'extérieur l'air contaminé qui reste à l'intérieur de l'enceinte. Il faut installer des dispositifs anti-retour au niveau des conduits d'évacuation afin d'éviter tout rejet d'air potentiellement contaminé dans le laboratoire en cas de panne de courant.

Les lampes ultraviolettes doivent être nettoyées pour éliminer la poussière qui pourrait interrompre l'effet germicide des lampes. Elles doivent être éteintes lors d'une activité dans la salle, pour protéger les yeux et la peau de l'opérateur de toute exposition. L'utilisation des lampes ultraviolettes doit être accompagnée d'une décontamination régulière des surfaces de travail du PSM (8).

Il est recommandé d'utiliser des PSM fournis par un fournisseur certifié qui assure aussi les qualifications nécessaires et un entretien régulier. Tous les ans au moins, leur bon fonctionnement doit être contrôlé et un certificat doit être délivré.

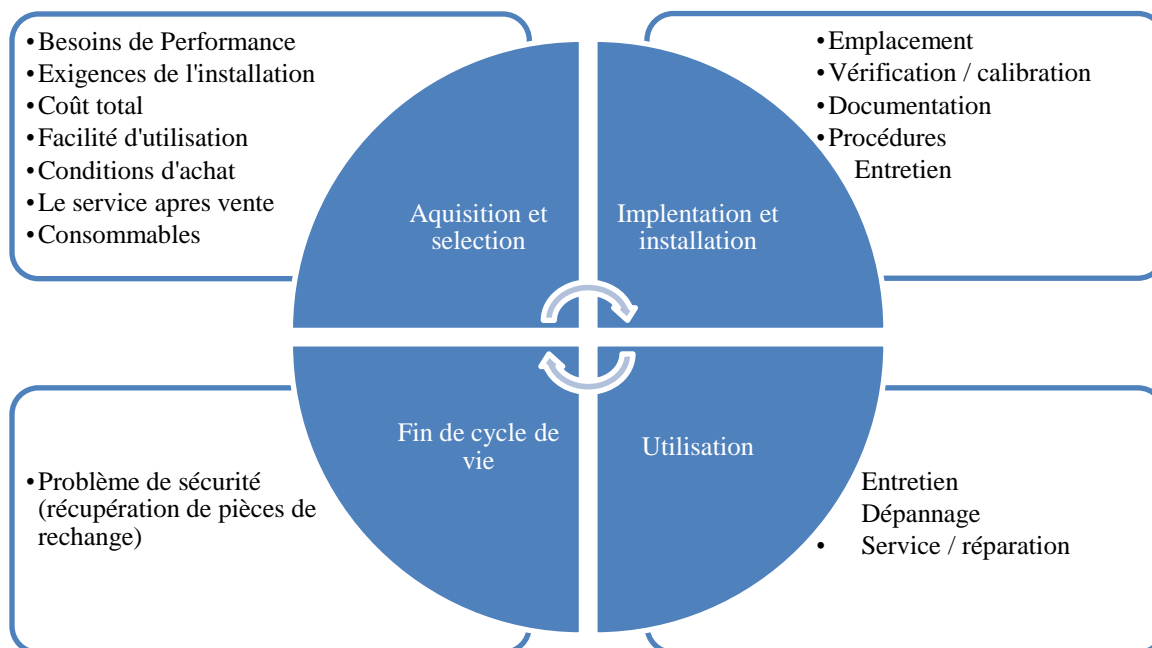


Schéma 1 : Cycle de vie d'un PSM

Les contrôles physiques périodiques permettent de s'assurer du bon fonctionnement du PSM: débit de l'air, taux de renouvellement, surpression et intégrité des filtres(7).

Les contrôles techniques (contrôle particulaire, aérobiocontamination, cinétique de décontamination) permettent d'apprécier la véritable performance du traitement d'air (7). La périodicité de ces contrôles ne fait pas l'objet de recommandations strictes, mais elle est fixée pour chaque PSM en fonction de l'activité assurée.

II.1. Contrôle de l'air

Afin de maîtriser la qualité de l'air, une surveillance doit être impérativement planifiée et tracée.

La qualité de l'air est à rapporter aux nombres de particules et de contaminants présents dans l'environnement.

La norme ISO 14644 recommande la validation des contrôles particuliers et microbiologiques lors de la qualification de l'installation ou de la qualification en activité du PSM.

II.1.1. Contrôle particulière

Cette mesure détermine l'empoussièrement du PSM sans différencier les particules viables des particules non viables.

L'appareil utilisé pour le contrôle particulière est le compteur optique des particules.

Le Compteur Optique de Particules fournit des mesures rapides et précises sur la distribution de tailles et la concentration en nombre de particules. Le principe de l'analyse est la focalisation d'un faisceau laser sur un volume optique à travers lequel passent les particules à analyser.

Les spécifications de l'appareil sont mentionnées dans les annexes B (B.I) et C (C.I) de la norme ISO 14644-3.

Tableau V: Spécifications minimales pour le compteur optique de particules

Appareil	Spécification
Sensibilité / Résolution*	Sélectionnée entre 0,1 mm et 0,5 mm, pour une résolution dimensionnelle = 10%
Incertitude	± 20% de l'erreur de concentration au niveau granulométrique sélectionné
Temps de réponse électronique	< 50 µs
Intervalle d'étalonnage	Durée maximale de 12 mois ou suivant la vérification des performances spécifiées
* Un appareil possédant une capacité de résolution des tailles de particule supérieure à 10% peut afficher des résultats de comptage de particules variant d'un ordre de grandeur.	
Efficacité de comptage	50% (± 20%) au diamètre seuil minimal du compteur et 100% (± 10%) pour des particules de taille supérieure ou égale à 1,5 fois le diamètre seuil minimal du compteur
Etendue inférieure de concentration granulométrique	Taux de faux comptage négligeable par rapport au taux minimal de comptage attendu en mesurage réel. Il convient que le taux inférieur de comptage soit nul pendant une certaine période (par exemple, comptage nul pendant 5 min.)
Etendue supérieure de concentration granulométrique	Deux fois supérieure à la limite supérieure de concentration de la classe de propreté de l'installation, au point d'utilisation et en aucun cas supérieure à 75% de la concentration maximale recommandée par le fabricant de l'appareil

Pour contrôler le compteur optique on réalise un étalonnage en nombre et la vérification du débit d'aspiration.

Les compteurs optiques sont des appareils fragiles qui devront être transportés dans les valises adaptées. Le ou les points de mesures, la fréquence de ces mesures, les valeurs cibles de contamination acceptable. Ce contrôle est réalisé par un personnel formé et selon des procédures validées (7).

Par rapport au contrôle d'aérobiocontamination, le contrôle particulière présente une meilleure standardisation et est plus facile à mettre en œuvre(7).

II.1.1. Contrôle d'aérobiocontamination

L'aérobiocontamination a pour cause les émissions cutanées, la qualité de l'air extérieur, la qualité de l'entretien des surfaces (par une remise en suspension des particules sédimentées), à la qualité des équipements et instruments utilisés à l'intérieur du PSM.

Les contrôles microbiologiques peuvent être réalisés avant pendant ou après les manipulations et permettent d'estimer la charge microbienne de la zone à un moment donné.

La mesure de la bio-contamination se fait au niveau des surfaces et au niveau de l'air.

Les contrôles d'aérobiocontamination sont effectués, préférentiellement, à l'aide d'aérobiocollecteurs.

II.1.1.1. Méthode au biocollecteur

Le biocollecteur doit être conforme à la norme ISO 14698-1:

- un débit d'aspiration constant supérieur à 100 L/min ;
- une vitesse d'impact de l'air prélevé sur les milieux de culture optimale pour permettre de prélever des particules viables de taille ≥ 1 micron, et ne pas altérer leur viabilité. La vitesse d'impact doit être inférieure à 100m/s.
- une collecte linéaire entre 100 et 1000 L.
- accepter des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre.

Tableau VI: Caractéristiques de biocollecteurs d'après la norme ISO 14698-1

Caractéristiques imposées par la norme	Conséquences techniques
La vitesse d'impact doit être suffisamment élevée pour permettre un piégeage de particules viables de taille >1 µm	Vitesse d'impaction < 20 m/s
La vitesse doit être suffisamment faible pour garantir la viabilité des particules viables en évitant la détérioration mécanique ou la désagrégation des bactéries et micromycètes Le volume de prélèvements doit représenter un compromis entre un volume suffisamment important pour la détection de très faible niveau de biocontamination	Débit d'air de 100 L/min
Le volume de prélèvements doit être suffisamment petit pour éviter une dégradation physique ou chimique du milieu de prélèvement	

Il est recommandé, lors du prélèvement de(9)

- S'habiller conformément aux recommandations de bonnes pratiques de laboratoire ;
- ne pas parler et rester calme ;
- respecter les distances préalablement validées ;
- noter l'heure et le lieu, ainsi que l'identité du préleveur ;
- mettre les boîtes de gélose à + 4° C si le délai d'acheminement est supérieur à 4 h

Les milieux de culture utilisés pour recherche de la flore totale est la gélose dénombrement et/ou flore fongique à la demande (milieu au malte). Les milieux enrichis (par exemple gélose au sang) sont à proscrire.

II.1.1.2. Méthode de sédimentation

Cette méthode est basée sur la gravité naturelle des particules qui se déposent sur des boîtes de pétri remplies de milieu de culture.

La boîte de Pétri remplie de milieu de culture est exposée pour une certaine durée à l'air (temps de sédimentation). A la fin du temps de sédimentation, la boîte de Pétri est fermée et placée dans l'incubateur.

L'interprétation des résultats, pour les deux méthodes, se fait selon la norme ISO 14644.1.

Sur le plan quantitatif on dénombre les UFC/m³.

Le chiffre qui suit indique le nombre maximum d'UFC/m³ rencontré dans l'air contrôlé.

Sur le plan qualitatif(9) :

- si bactérie dominante, faire l'identification ;
- si flore polymorphe et supérieure aux seuils, ne pas faire d'identification et reprélever. Si confirmation du mauvais résultat, rechercher l'origine de cette contamination.
- si flore fongique, dénombrer à 48 h et à 7 jours puis identifier.

II.2. Contrôle microbiologique des surfaces

Deux méthodes peuvent être utilisées : la méthode par application de boîte contact et la méthode par écouvillonnage.

II.2.1. Méthode par application de boîte de type « count tact »

La boîte type count tact est caractérisée par un ménisque de milieu de culture convexe et offrant une surface de contact d'au moins 20 cm². Elle permet de standardiser le prélèvement avec une force d'appui de 25g/cm² pendant 10 secondes (9).

Le milieu utilisé est adapté à la flore totale avec neutralisant compatible au désinfectant utilisé pour les surfaces.

II.2.2. Prélèvement de surface par écouvillonnage

Cette méthode est une alternative à la méthode boîtes de type count tact. Elle présente l'avantage d'être facilement utilisée pour les zones difficiles d'accès (9).

Les écouvillons peuvent être utilisés à l'état sec ou humidifié. L'humidification est réalisée par l'eau distillée stérile, le sérum physiologique, un bouillon nutritif additionné d'un neutralisant ou par le thioglycolate lors de la suspicion de *Clostridium*.

Après prélèvement on fait soit ensemencement direct sur le milieu de culture, soit on fait une subculture suivi d'ensemencement sur milieux sélectifs.

Si l'empoussièrement est important réaliser une dilution avant de passer à l'ensemencement.

L'interprétation des résultats du contrôle microbiologique des surfaces est réalisé selon la norme ISO 14644.

Tableau VII: les normes de la contamination de l'air et des surfaces dans les classes ISO 5

	Air	Surface
Germes totaux	≤ 10 UFC/m ³	≤ 05 UFC/boites 90mm
Aspergillus et champignons filamenteux	< 1	< 1

Une comparaison des méthodes de géloses contact, écouvillonnage humide et écouvillonnage sec, montre que les géloses contact permettent la collecte la plus efficace. Par ailleurs, le coût des géloses contact est non négligeable(10).

En comparaison, l'écouvillonnage humide permet d'obtenir des résultats très proches de ceux obtenus par géloses contact. C'est une méthode beaucoup moins onéreuse que les géloses contact, et qui permet ensuite une mise en culture sur un milieu au choix(10).

En revanche, l'écouvillonnage sec permet d'obtenir des résultats beaucoup moins satisfaisants par rapport à l'écouvillonnage humide ou que la gélose contact(10).

Donc l'écouvillonnage humide présente le meilleur rapport coût/efficacité et permet l'ensemencement direct sur des milieux spécifiques(10).

II.3. Contrôle de l'intégrité des filtres

L'intégrité des filtres HEPA doit être vérifiée pour s'assurer que le matériau filtrant, le joint d'étanchéité et le scellant du boîtier du filtre sont conformes aux spécifications (11).

L'intégrité des filtres est vérifiée en appliquant les recommandations de l'annexe D de la norme NF EN 12469 de Juillet 2000.

Le principe de l'analyse est la répartition en amont du filtre d'une concentration connue de particules puis à l'aide d'une méthode de balayage on détermine le pourcentage de leur rétention en aval après filtration(11). Le balayage permet de mesurer en plusieurs points l'efficacité de filtrage.

II.3.1. Test DOP

Ce test est basé sur la rétention des gouttelettes d'aérosol de dioctyl-phthalate (DOP) calibrées à 0,3 μ m, selon les recommandations ASTM D 2986-71.

La concentration de particules DOP est mesurée en amont et en aval du filtre à l'essai à l'aide d'une cellule photoélectrique. La concentration est de 100 mg/m³(12).

Le DOP est carcinogène, il est donc recommandé de procéder au test MMPS (*Most Penetrating Particle Size*).

II.3.2. Test Emery MMPS

Le protocole du test selon la norme EN 1822 (connu aussi sous le nom de "MPPS-Test") a été reconnu en l'an 2000 comme le test le plus sévère pour les filtres HEPA. Aujourd'hui déjà, de nombreux fabricants de produits de haute technologie exigent de leurs fournisseurs de filtres la certification selon EN 1822.

La norme EN 1822 définit la taille des particules pénétrant le plus aisément dans le milieu HEPA, d'où la désignation "MPPS" (Most Penetrating Particle Size).

Un aérosol de type Emery est émis en amont du filtre. On détermine la rétention grâce à un appareil appelé photomètre par balayage du média, du cadre et du joint du filtre installé, ainsi que du système de support. Le rapport des concentrations amont et aval de l'aérosol donnera l'assurance de l'intégrité du filtre et de son support.

Pour un filtre H14 ayant une efficacité de filtration de 99,995 % (valeurs intégrales MPPS), il conviendra une tolérance de pénétration d'aérosol de 0,01 % conformément à la norme ISO 14644-3.

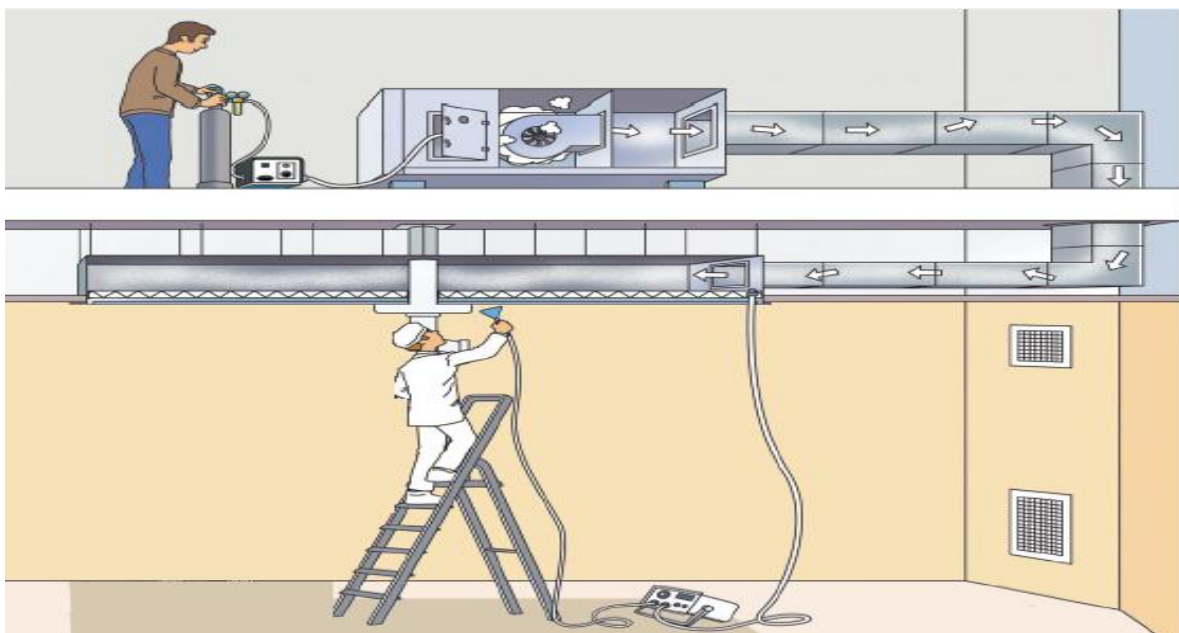


Figure 5: Mode opératoire schématisé pour le test d'intégrité d'une salle équipée d'un plafond filtrant (Emission de l'aérosol par une CTA située en local technique)

II.3.3. Test NaCl

L'aérosol d'essai est composé de particules solides de chlorure de sodium obtenue par pulvérisation d'une solution saline, puis évaporation complète de l'eau des gouttelettes. La concentration est de l'ordre de 5 mg/m^3 (12).

L'aérosol sert d'air comburant à un brûleur à gaz méthane. L'intensité de la raie « D » du sodium émis par la flamme est mesurée au moyen d'une cellule photoélectrique. Cette intensité est proportionnelle à la concentration en sel de l'aérosol prélevé(12).

La réalisation de contrôles techniques est indispensable pour évaluer la qualité environnementale des PSM. Toutefois, Cette réalisation doit s'intégrer dans un programme d'analyse des risques (7).

Le franchissement des valeurs limites (niveau d'alerte et d'action) doit entraîner des actions de corrections qui sont prises par les acteurs concernés puis validées. En cas de contamination microbienne, il est indispensable d'en trouver l'origine, de discuter les actions correctives : nettoyage des gaines d'aération, changement de filtre, amélioration des pratiques (10).

III. Conception des locaux

Un laboratoire bien conçu et bien construit facilite la protection de tout le personnel et l'organisation du travail. Il doit être séparé des espaces du bâtiment où l'on peut circuler librement.

Le choix de l'équipement et de la conception de l'unité de contrôle dépend des examens qui sont pratiqués par le laboratoire, du risque de transmission qui leur est lié, de l'organisation du circuit ainsi que l'architecture et la taille des locaux. Il incombe au chef de laboratoire de mettre à la disposition de son personnel des installations qui soient à la hauteur des fonctions du laboratoire et en rapport avec son niveau de risque.

Quel que soit le type d'équipement utilisé, sa qualification, sa validation et sa maintenance doivent être tracés.

Lors de la conception d'un laboratoire, il faut être particulièrement attentif aux sources habituelles de problèmes :

- utilisation de surfaces perméables,
- locaux surchargés,

- facilité d'accès pour des personnes non habilitées à entrer dans le laboratoire,
- plan de travail mal conçu.

Pour faire face à un certain nombre de risques potentiels, dans un laboratoire de microbiologie il est recommandé que(13, 14):

- les locaux soient suffisamment spacieux pour que les manipulations puissent être effectuées dans de bonnes conditions de sécurité et pour faciliter l'entretien et le nettoyage,
- les murs, les plafonds et les sols soient lisses et faciles à nettoyer. Les sols doivent être antidérapants,
- le revêtement des paillasse soit imperméable à l'eau et résister aux produits chimiques et aux désinfectants habituellement utilisés au laboratoire ; il doit également être insensible à une chaleur modérée,
- la paillasse où sont manipulés les échantillons soit séparée des locaux où arrivent les échantillons ainsi que des locaux où se fait le travail administratif,
- la ventilation soit suffisante avec un flux d'air directionnel avec 6 à 12 changements d'air par heure,
- les climatiseurs ne soient installés qu'après avoir étudié la direction du flux d'air. Il est important de veiller à ce que l'air du laboratoire circule en s'éloignant des opérateurs.
- l'éclairage soit suffisant. Les rideaux sont à éviter,
- le mobilier soit robuste, fabriqué avec des matériaux imperméables et facilement décontaminé. Il ne faut pas utiliser de meubles recouverts de tissu.
- les espaces libres situés entre les armoires et sous les paillasse, soient accessibles pour un nettoyage aisé,
- un lavabo avec du savon soit installer un lavabo munis de robinets automatiques sans commande manuelle pour le lavage des mains, de préférence près de la porte de sortie. Un distributeur de serviettes en papier doit être disposé près de chaque lavabo,
- l'espace de stockage soit suffisant pour le rangement du matériel et matières destinés à un usage immédiat et pour éviter qu'elles ne soient entassées sur les paillasse,
- les locaux pour le rangement des vêtements d'extérieur et des affaires personnelles soient prévus en dehors des zones de travail,
- les locaux où le personnel puisse se restaurer, boire et se reposer soient également prévus en dehors des zones de travail.

Dans un laboratoire où existe un risque modéré de contamination, le confinement est assuré à deux niveaux : au niveau du PSM (confinement primaire) et au niveau du laboratoire lui-même (confinement secondaire).

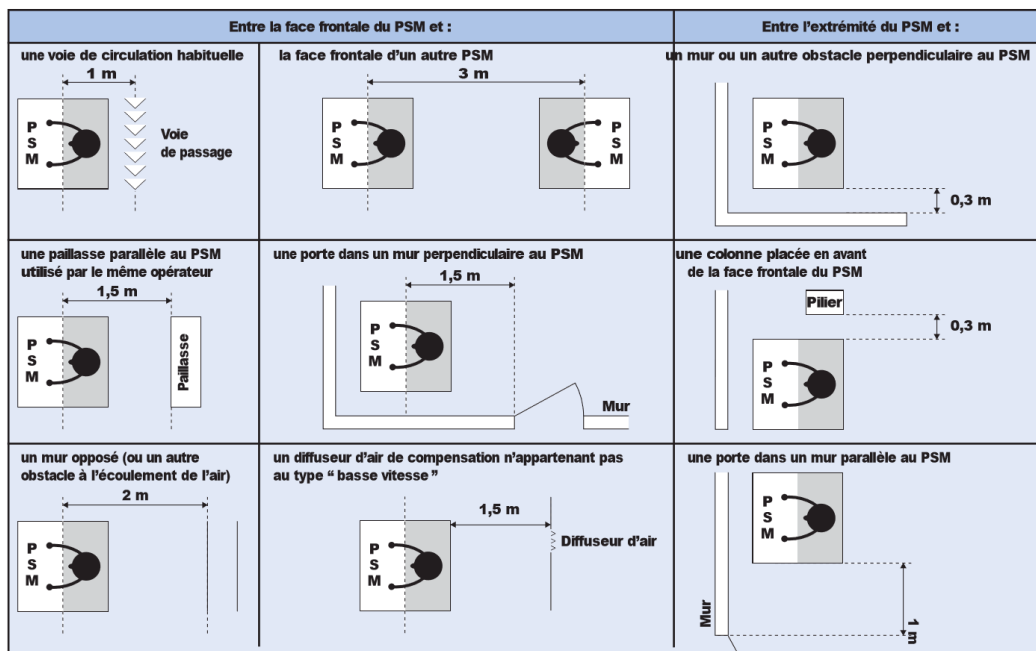


Figure 6 : Schéma des distances minimales conseillées pour l'implantation des PSM(15)

La réglementation exige une ventilation en dépression des locaux où sont effectués les manipulations par rapport à l'environnement extérieur, et ce, par un système de ventilation indépendant du reste du bâtiment.

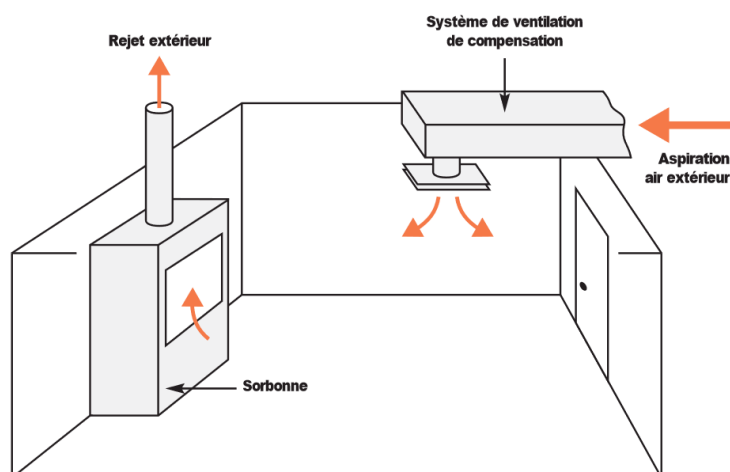


Figure 7: Schéma d'une installation de ventilation(15)

Les sas d'accès doivent être, quant à eux, en surpression par rapport au reste du service afin de maîtriser le risque de contamination microbologique et particulaire.

Le contrôle de la différence de pression doit être assuré grâce à des indicateurs de pression, si possible reliés à un système d'alarme, dont les valeurs sont régulièrement relevées et consignées.

IV. Les bonnes pratiques au laboratoire

La sécurité des personnes est une obligation légale et la prévention du risque infectieux entre dans le champ de cette obligation.

Lors d'un débordement de produit biologiquement dangereux, la désinfection des surfaces et du matériel doit être immédiate, tout en laissant la ventilation en fonctionnement(8).

La surface du matériel destiné à être introduit dans les PSM doit être désinfectée. A la fin du travail, le matériel ne doit pas être laissé à l'intérieur du PSM, car les résidus de matière en culture peuvent provoquer le développement des microbes.

La surface de travail et les parois intérieures du PSM doit être désinfectée avant et après chaque utilisation. A la fin de la journée de travail, un essuyage de la surface, des parois, de l'arrière et de l'intérieur des vitres avec une solution à base d'alcool à 70°C doit être réalisé. Une fois la désinfection finale est terminée, le PSM est resté allumer pendant 5 min afin de purger l'atmosphère à l'intérieur.(8)

Les précautions à prendre lors de l'utilisation d'un PSM :

- ne pas bloquer la veine de garde frontale par des équipements,
- décontaminer tout le matériel avec de l'alcool 70°,
- placer le matériel au fond du PSM, vers les angles arrière de la surface de travail, de façon à ce qu'ils soient facilement accessibles sans bloquer la grille arrière,
- placer les plateaux pour pipette et flacons sur un côté à l'intérieur du poste,
- effectuer le travail intensif de la partie propre vers la partie contaminée de la zone de travail,
- éviter les mouvements fréquent de vas et vient car ils peuvent nuire à l'intégrité de la barrière à air du poste.

L'application des bonnes pratiques au laboratoire a pour but principal d'éviter toute contamination éventuelle par effraction cutanée, inhalation ou ingestion ainsi que toute exportation d'agents biologiques pathogènes en dehors du laboratoire et d'assurer la qualité des résultats. Pour cela il faut :

- le laboratoire doit être tenu propre et en ordre,
- les portes donnant accès au laboratoire doivent demeurer fermées.
- toute personne travaillant dans le laboratoire doit porter une tenue de travail adaptée au risque du laboratoire,
- manger, boire, fumer, entreposer des aliments, se maquiller, manipuler des lentilles cornéennes sont des activités interdites au laboratoire. Aussi le port de bijoux est déconseillé. Les cheveux doivent être attachés,
- les plaies ouvertes, coupures, égratignures et abrasions doivent être recouvertes d'un pansement imperméable,
- le pipetage à bouche est strictement interdit à fin d'éviter la contamination du produit et du personnel,
- l'odorat est strictement interdit pour l'identification de n'importe quel produit,
- les gants contaminés doivent être éliminés avec les déchets infectieux et immédiatement remplacés. Le port de gants est interdit pour utiliser le téléphone ou pour les tâches de secrétariat. Le lavage des mains est effectué après avoir retiré les gants, avant de quitter le laboratoire et après toute manipulation de matières susceptibles d'être contaminées,
- les chiffonnâtes à usage unique sont préférées pour le nettoyage des surfaces de travail,
- les milieux de culture ou matériels contaminés doivent être décontaminés, stérilisés avant d'être éliminés ou réutilisés,
- tout objet piquant tranchant ou coupant sera recueilli dans un collecteur en plastique rigide et étanche à usage unique non réutilisable et éliminé par le circuit des déchets spécifique (neutralisation ou incinération),
- les sacs ou conteneurs utilisés pour la collecte des déchets sont résistants, étanches et fermés avant de quitter la zone contaminée.

CHAPITRE 2 : ASSURANCE QUALITE

Plusieurs problèmes peuvent être rencontrés dans un laboratoire de contrôle microbiologique et peuvent augmenter les risques de contamination et/ou d'erreur :

- mauvaise utilisation de l'espace de travail au niveau des paillasses ;
- un mauvais entretien ou non certification des PSM ;
- une mauvaise évacuation de l'air vers l'extérieur du PSM ;
- un colmatage des filtres HEPA des PSM ;
- une fuite au niveau des récipients contenant les échantillons ;
- le non respect des règles de manipulation des échantillons pouvant entraîner une aérosolisation ultérieure ;
- une ventilation ou un éclairage insuffisants ;
- un dysfonctionnement des systèmes de refroidissement ou de chauffage ;
- mal formation du personnel

Un système qualité permet d'éviter ou de diminuer les risques d'erreur. Il s'agit d'un ensemble de procédures et moyens nécessaires pour la mise en œuvre de la gestion de la qualité (16). Il nécessite la mise en place des directives claires et des procédures détaillées.

I. Le système documentaire

La documentation est un outil de transmission et de conservation de l'information afin de suivre la prestation et d'en assurer la traçabilité.

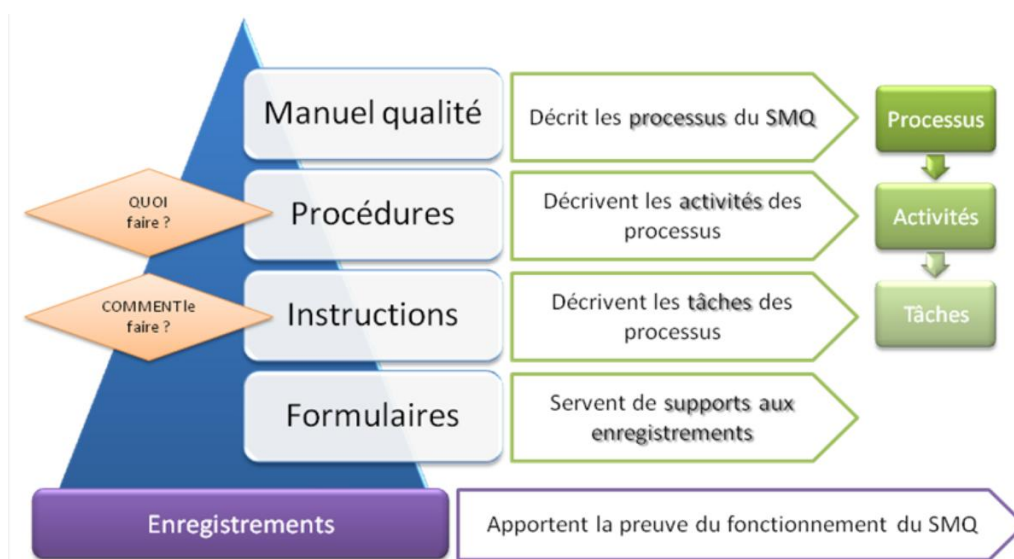


Figure 8 : Pyramide documentaire d'un système management qualité

Un manuel qualité régulièrement mis à jour décrivant les procédures de sécurité doit être connu par tout le personnel et une formation appropriée permet d'éviter les risques de contamination. Les conduites à tenir en cas d'accidents ou d'incidents mettant en cause un agent biologique pathogène doivent être prévues et clairement affichées dans le laboratoire de confinement. Tout accident survenu sur le lieu du travail sera consigné par écrit.

Une procédure écrite comporte pour une activité l'objet et le domaine d'application. Elle indique qui fait quoi, quand, où et comment, avec quels matériels, équipements, quels documents et comment ce qui est fait est maîtrisé et enregistré. La procédure est référencée, datée et signée par les personnes qui l'ont rédigée puis validée et approuvée par le responsable assurance qualité.

La procédure est rédigée et présentée afin de s'adapter à la complexité des tâches et des méthodes utilisées, ainsi qu'aux compétences et à la formation du personnel. Elle doit être comprise, précise et accessible à chaque personne qui l'utilise. Elle est modifiée en tant que de besoin et la version précédente est systématiquement retirée et archivée. Sa diffusion qui fait l'objet d'une particulière attention (16).

Une procédure de maîtrise des documents est mise en place. Elle précise les modalités de diffusion des autres procédures afin qu'elles soient accessibles et qu'une seule la version en vigueur soit utilisée. Elle précise également le nombre de copies autorisées et diffusées ainsi que leur localisation, leurs destinataires et leurs utilisateurs et le mode de retrait des documents périmés (16)(16)(16)(17).

Le système qualité, suffisamment formalisé, sans excès, permet d'entretenir une dynamique d'amélioration. La mise en place d'un système qualité permet de diffuser l'information comportant notamment les procédures, en les rendant et les maintenant claires, fiables, accessibles, pour que, à tous les niveaux, les bonnes décisions soient prises et appliquées.

I.1. Gestion des risques qualité

L'évaluation du risque est l'étape la plus importante de la gestion des risques. C'est elle qui va permettre de hiérarchiser les risques et de définir les actions préventives prioritaires.

L'exposition au risque ou la biocontamination est le fondement du risque infectieux puisque c'est « le processus entraînant la présence de micro-organismes pathogènes ou potentiellement nocifs sur le matériel ou la personne ».

On évalue les risques qualité par des moyens informels basés sur des observations. Actuellement, pour répondre aux critères d'évaluations du risque tels il faut adopter les outils de management du risque cités dans l'ICH Q9. Ces méthodes sont dites inductives quand on part des causes pour en déduire les conséquences (AMDEC, HACCP, HAZOP, APR), celles qui remontent des conséquences aux causes sont dites déductives (Add). Aucun outil n'est applicable à toutes les situations (17).

Tableau VIII: Récapitulatif des principales méthodes d'analyse de risques (18)

Nom de la méthode	Les objectifs	L'utilisation		
		Méthode quantitative	Identification des risques	établissement d'un scénario
APR	Identifier les scénarios d'accidents en présence de dangers	Non	oui	Non
HAZOP	Identifier les dangers suite à une déviation des paramètres d'un procédé	Non	oui	
Hazid	Identifier les risques suite à l'occurrence d'un événement initiateur	Non	oui	
AMDEC	Identifier les effets des modes de défaillances des composants sur le niveau système	Oui	oui	
Arbre d'événements	Décrire les scénarios d'accident à partir d'un événement initiateur	Oui		Oui
Diagramme causes conséquence	Décrire les scénarios d'accident à partir d'un événement initiateur	Oui		Oui
Arbre des défauts	Identifier les causes combinées à partir de la définition d'un événement redouté au niveau système	Oui		

I.1.1. L'analyse de risque AMDEC

La méthode AMDEC « Analyse des Modes de défaillance, de leurs effets et leur criticité » ou FMECA (Failure Mode and Effect Analysis) est un outil et une technique de prévention des problèmes potentiels. Elle a pour but d'étudier, d'identifier, de prévenir, ou au moins de réduire les risques de défaillance d'un système, d'un processus, d'un produit.

L'AMDEC est une méthode de gestion des risques a priori s'appliquant dans le but d'agir le plus tôt possible sur les défauts potentiels. L'association Française de normalisation (Afnor) définit l'AMDEC comme étant « une méthode inductive qui permet de réaliser une analyse qualitative et quantitative de la fiabilité ou de la sécurité d'un système » (19).

La qualité des résultats d'une analyse augmente lorsque les précautions sont accrues et les risques limités (20).

I.1.1.1. Historique

L'AMDEC a été utilisée aux États-Unis par la société Mc Donnell Douglas depuis les années soixante. Elle consistait à dresser la liste des composants d'un produit et à cumuler des informations sur les modes de défaillance, leur fréquence et leurs conséquences. La méthode a été mise au point par la NASA et le secteur de l'armement sous le nom de FMEA pour évaluer l'efficacité d'un système.

A la fin des années soixante-dix, la méthode fait largement adoptée par Toyota, Nissan, Ford, BMW, Peugeot, Volvo, Chrysler et d'autres grands constructeurs d'automobiles. La méthode a fait ses preuves dans les industries suivantes : spatiale, armement, mécanique, électronique, électrotechnique, automobile, nucléaire, aéronautique, chimie, informatique et plus récemment, on commence à s'y intéresser dans les services.

En France, pendant les années quatre vingt les constructeurs français d'automobiles ont introduit des clauses de fiabilité dans les contrats avec leurs fournisseurs de composants pour les automobiles, d'une part, et avec leurs fournisseurs de machines et équipements de production, d'autre part.

Actuellement parmi les méthodes d'analyse de la fiabilité, l'AMDEC figure en bonne place. Certaines procédures définies dans le cadre d'une démarche qualité (application des normes ISO 9000, par exemple) incluent l'utilisation de l'AMDEC à différents stades du développement des produits ou des procédés. La norme NF X 60-510 «Techniques d'analyse de la fiabilité des systèmes - Procédure d'analyse des modes de défaillance et de leurs effets (AMDE)» a été publiée en décembre 1986.

I.1.1.2. Intérêt de l'analyse AMDEC

L'AMDEC est une technique adoptée par plusieurs établissements dans le but de (19):

- Évaluer et garantir la sûreté de fonctionnement (sécurité, fiabilité et disponibilité) ;
- Identifier les risques, ces causes et les moyens de les prévenir ;
- Disposer des procédures ou aides minimisant les temps d'immobilisation du moyen par la diminution du temps d'intervention (diagnostic, réparation ou échange et remise en service) ;
- Former et informer le personnels ;

- Réaliser des interventions préventives ou correctives adaptée, afin de réduire la probabilité d'apparition de la défaillance.

I.1.1.3. Les différents types d'AMDEC

Il existe plusieurs types d'AMDEC résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : Les différents types d'AMDEC(19, 21).

Type AMDEC	Utilisation
AMDEC-process	Cette analyse est utilisée pour étudier les défauts potentiels d'un produit nouveau ou non, engendrés par le processus de fabrication.
AMDEC-produit	Cette analyse est utilisée pour l'aide à la validation des études de définition d'un nouveau produit fabriqué.
AMDEC-moyen	Cette analyse permet de réaliser l'étude du moyen de production lors de sa conception ou pendant sa phase d'exploitation.
AMDEC-fonctionnel	Cette analyse permet de déterminer les modes de défaillances ou les causes amenant à un événement redouté.
AMDEC-flux	Cette analyse permet d'anticiper les risques liés aux ruptures de flux matière ou d'informations, les délais de réaction ou de correction, les coûts inhérents au retour à la normale.
AMDEC-service	Cette analyse permet de vérifier que le processus de réalisation du service n'engendre aucune défaillance, afin de satisfaire aux attentes des clients.
AMDEC-sécurité	Cette analyse est appliquée pour assurer la sécurité des opérateurs dans les procédés ou existe des risques pour ceux ci.

I.1.1.4. Les étapes de l'analyse AMDEC

La gestion du risque se décompose en cinq étapes (22) :

➤ Identification des risques

Dans cette étape, les événements redoutés (approche anticipative par une analyse à priori) et les événements indésirables passés (approche réactive par analyse à posteriori) sont recueillis.

L'approche anticipative permet d'organiser au mieux le travail pour éviter ou réduire les événements indésirables. Cette analyse est réalisée avant la conception du laboratoire et lors de la mise en place de toute nouvelle technique.

L'approche réactive implique une connaissance des défaillances existantes. Ce type d'analyse permet une connaissance approfondie des modes de défaillance, leur fréquence ainsi que la gravité des dommages.

- Analyse des risques

Cette étape permet de quantifier la fréquence et la gravité de chaque risque.

Le risque est défini comme la combinaison de la fréquence d'un danger et des dommages engendrés.

La caractérisation du risque se fait en plusieurs étapes : identifier le danger, évaluer l'exposition, estimer le risque puis évaluer la perception du risque.

- Hiérarchisation des risques

Une analyse croisée de la fréquence et de la gravité aide à la classification et permet de hiérarchiser les actions. Cette adéquation est représentée par la formule :

Risque = dommage x fréquences d'exposition

La biocontamination est le fondement du risque infectieux puisque c'est « le processus entraînant la présence de micro-organismes pathogènes ou potentiellement nocifs sur le matériel ou la personne » (23).

Grâce à cette étape, il serait possible de sélectionner des actions préventives prioritaires.

- Élaboration et mise en œuvre de plans d'action

C'est l'étape de mise en place de mesures visant à prévenir la survenue des effets indésirables.

- Évaluation et suivi

Cette étape permet de mesurer a posteriori les actions mises en œuvre.

I.1.1.5. Éléments AMDEC

- **Le risque**

Le risque est la survenue d'un événement imprévu, plus ou moins nocif, fautif ou non, pouvant causer un dommage. Le préjudice se caractérise par sa nature, sa probabilité de survenue, sa gravité. Pour gérer un risque il faut le contrôler afin de l'éliminer si possible, si non de le réduire(24).

L'AMDEC développe l'analyse des risques dès la conception du projet, jusqu'à et après l'installation.

➤ **Les modes de défaillances**

Un mode de défaillance est une forme observable du dysfonctionnement d'un produit, d'un outil de fabrication, d'un processus étudié qui doit répondre aux caractéristiques suivantes(25) :

- Il est relatif à la fonction que l'on étudie.
- Il décrit la manière dont le processus, le produit ou le moyen de production ne remplit pas ou plus sa fonction.

➤ **Cause de défaillance**

Plusieurs causes peuvent être associées à un même mode de défaillance et même cause peut provoquer plusieurs modes de défaillance. Une cause de défaillance est l'événement initial qui peut conduire à la défaillance d'un dispositif par l'intermédiaire de son mode de défaillance(26).

➤ **Effet de la défaillance**

L'effet d'une défaillance est une conséquence subie par le personnel correspond à la perception finale de la défaillance par le personnel et il est associé au couple (mode-cause de défaillance)(26).

Le Mécanisme de défaillance se définit comme un processus physique, chimique ou autre qui entraîne une défaillance(27).

➤ **Classification des défaillances**

Les défaillances qui surviennent sur des dispositifs, systèmes et composants ont des conséquences et des effets qui peuvent avoir des degrés de gravité très divers. On peut distinguer plusieurs types de classification.

II. MATERIEL ET METHODES

Le travail a été réalisé au niveau du Laboratoires de recherche de la Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) et au laboratoire de pharmacie Galénique de la faculté de médecine Tlemcen (Algérie) durant la période : Février 2019 au juin 2019.

II.1. Objectif de l'étude

L'étude avait pour objectif principal :

- Etablir un protocole de contrôle de contamination microbiologique des PSM.
- Analyser les modes de défaillance d'unemanipulationde contrôle microbiologique sous PSM.

L'étude avait comme objectif secondaire :

- Proposer des actions préventives et correctives pour réduire les erreurs de contrôle

II. 2. Matériel et méthodes

II.2.1. Analyse de risque AMDEC

Déroulement de la méthode

Le schéma suivant illustre les différentes étapes de notre analyse.

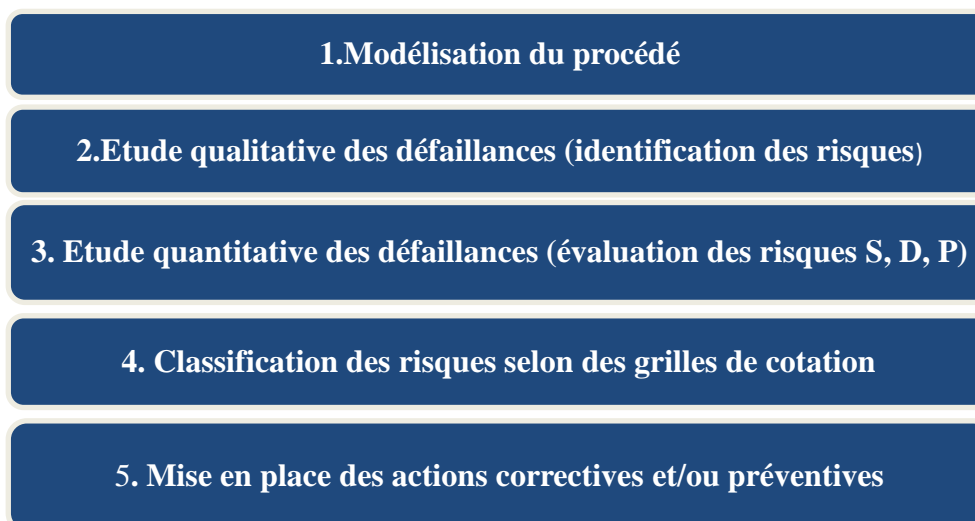


Schéma 2 :Les étapes de la démarche AMDEC.

i. Modélisation du procédé

Nous avons décomposé le circuit de contrôle microbiologique en plusieurs étapes.

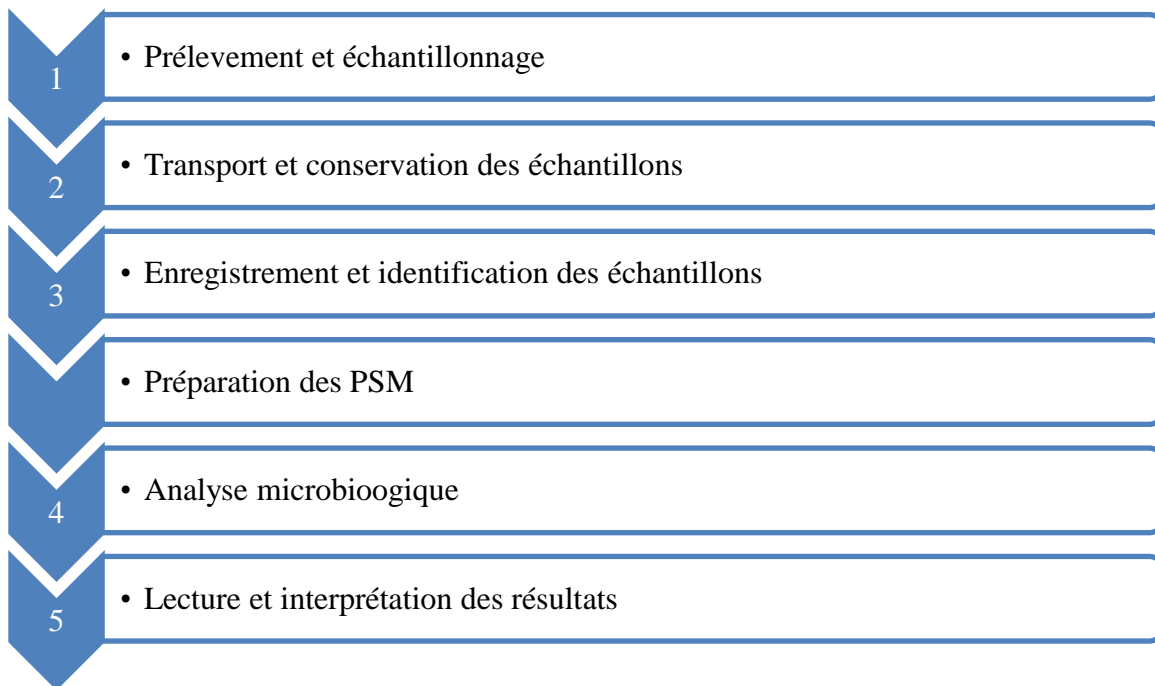


Schéma 3 : les étapes d'une analyse sous PSM.

ii. Etude qualitative des défaillances

Après avoir schématisé toutes les étapes du procédé, nous avons identifié les risques pouvant survenir durant chaque étape, chercher les causes liées à chaque défaillance et déduire les conséquences les plus probables touchant à la fois la qualité du produit et/ou la sécurité du personnel.

iii. Evaluation des risques

Dans l'optique d'hierarchiser les risques identifiés dans l'étape précédente, on a attribué un facteur de criticité (IPR) à chaque défaillance, qui résulte du produit de multiplication d'estimation de trois critères qui sont :

- La sévérité de ses conséquences sur le produit ou sur le personnel (S).
- La probabilité d'apparition du mode de défaillance (P).
- La détectabilité du mode de défaillance (D).

Nous avons utilisé les échelles de cotation suivantes :

Tableau X : Cotation de la sévérité.

Coefficient	Sévérité (S)
1	Très faible : Aucun effet indésirable sur le produit ou sur le personnel.
2	Faible : Inconfort mineur sur le personnel sans impact sur la qualité du produit.
3	Elevée : Effet néfaste sur le personnel mais temporaire, réversible ou impact sur la qualité du produit.
4	Vitale : Haut risque pour le personnel.

Tableau XI : Cotation de la probabilité.

Coefficient	Probabilité (P)
1	Improbable/ rare : Au plus une fois par an.
2	Possible/ parfois : Quelques fois par an (entre 2 à 10 fois).
3	Probable/ fréquent : Une fois par mois.
4	Presque certain : Une fois par semaine.
5	Certain/ systématique : Une fois par jour, ça arrive dans les conditions normales de travail.

Tableau XII : Cotation de la détectabilité.

Coefficient	Détectabilité (D)
1	Très élevée : Défaut visible, certitude absolue que la défaillance va être détectée (contrôle 100% automatisé validé).
2	Elevée : Défaillance détectable, prévisible, la cause est connue (contrôle 100% manuel).
3	Modérée : Défaillance détectable mais pas prévisible, contrôle statistique.
4	Faible : Défaillance difficilement détectable et non prévisible, point non contrôlé, détecté par hasard.
5	Très faible : Défaut invisible, défaillance non détectable, aucun moyen de détection, le point est incontrôlable.

On calcul ensuite la criticité ou l'indice de priorité de risque (IPR) selon la formule :

$$IPR = S * D * P$$

S : sévérité

D : détectabilité

P : probabilité

iv. Classification des risques

Après le calcul de la criticité de chaque défaillance, on les classe selon un ordre de priorité bien défini.

Tableau XIII : Classification du risque en fonction de la sévérité et la détectabilité.

		Sévérité			
		1	2	3	4
Détectabilité	1	1	2	3	4
	2	2	4	6	8
	3	3	6	9	12
	4	4	8	12	16
	5	5	10	15	20

Selon cette classification nous avons un score de risque produit de la sévérité et de la détectabilité (S*D) allant de 1 à 20 mais la série des scores est : (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 20). En divisant cette série de score statistiquement en quartiles, on obtient :

- Le premier quartile Q1=4;
- Le deuxième quartile Q2=8 ;
- Le troisième quartile Q3=12 ;
- Le quatrième quartile Q4= 20.

Nous avons décidé de considérer :

- La première classe de la série allant de 1 au premier quartile Q1 [1-4] : la classe du risque mineur ;
- La série allant du premier quartile Q1 jusqu'au troisième quartile Q3 [4-12] : la classe du risque majeur ;
- enfin la série allant du troisième quartile Q3 jusqu'au quatrième quartile Q4 [12- 20] : la classe du risque critique.

Nous avons obtenu donc le tableau suivant :

Tableau XIV : Classification du risque en fonction de la sévérité, détectabilité

		Sévérité (S)				S*D
		1	2	3	4	
Détectabilité (D)	1	1	2	3	4	
	2	2	4	6	8	
	3	3	6	9	12	
	4	4	8	12	16	
	5	5	10	15	20	

■ risque mineur. ■ risque maj ■ risque critique. ■

Nous avons posé ensuite la question : à partir de quel score (S*D) un risque mineur ≤ 3 devient majeur ?

La réponse était : lorsque ce risque se produit une fois par mois, cette expression correspond au coefficient 3 de probabilité, donc on aura un $IPR=(S*D)*P=3*3=9$. A partir de là tout score $IPR > 9$ sera considéré comme majeur et se place en zone orange.

De la même façon un risque majeur ≤ 12 devient critique lorsqu'il se produit une fois par mois, cette expression correspond au coefficient 3 de probabilité, donc on aura un $IPR=(S*D)*P=12*3=36$. A partir de là tout score $IPR \geq 36$ sera considéré comme critique et se place en zone rouge.

Tableau XV : Classification du risque en fonction de sévérité, détectabilité et probabilité.

		Probabilité (P)					
		1	2	3	4	5	
S*D	20	20	40	60	80	100	Score IPR= (S*D)*P
	16	16	32	48	64	80	
	15	15	30	45	60	75	
	12	12	24	36	48	60	
	10	10	20	30	40	50	
	9	9	18	27	36	45	
	8	8	16	24	32	40	
	6	6	12	18	24	30	
	5	5	10	15	20	25	
	4	4	8	12	16	20	
	3	3	6	9	12	15	
	2	2	4	6	8	10	
	1	1	2	3	4	5	

1 < score ≤ 9 : risque mineur.

9 < score ≤ 36 : risque majeur.

36 < score ≤ 100 : risque critique.

v. Définition des actions préventives et correctives :

A la fin, nous avons proposé pour certains modes de défaillance des mesures préventives et/ou correctives.

II.2.2. Contrôle air et surface des PSM

Nous allons effectuer le contrôle de l'air et des surfaces de 3 PSM : deux PSM type II du laboratoire LAMAABE et un PSM type I du laboratoire de galénique.

Nous avons utilisés le matériel suivant :

- Écouvillons stériles
- Boîte de pétri stérile
- Milieux de cultures stériles utilisés pour l'identification : la gélose nutritive
- l'eau physiologique

II.2.2.1. Préparation du PSM

Nous avons nettoyé la surface de travail avec l'alcool puis nous les avons désinfecté avec rayons UV pendant durée 20min.



Figure 9 : Stérilisation surface PSM avec la lumière UV

II.2.2.2. contrôle des PSM :

i. Contrôle des surfaces

Dans notre protocole nous avons contrôlé les surfaces seulement en état d'activité.

- On humidifie 6 écouvillons (identifiés aussi de 1 à 6) avec 2 ml d'eau physiologique
- On prélève les micro-organismes sur la surface aux différents points à l'aide de chaque écouvillon en traçant des stries rapprochées parallèles perpendiculaires, puis des stries perpendiculaires aux premières en le faisant tourner.
- On ensemece par la suite dans les boites de pétris remplies de gélose (identifiées de 1 à 6)
- On incube les boites pétris à 37 °C pendant 72H, tout en réalisant les lectures à 24H, 48H puis 72H

La figure ci-dessous montre le plan d'écouvillonnage à suivre afin de prélever le maximum des points au niveau de la surface de la hotte.

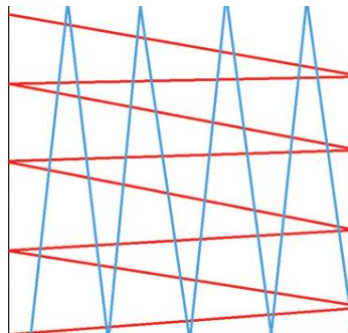


Figure 10 : Schéma de prélèvement de surface à l'écouvillon.

La figure ci-dessous montre la préparation au contrôle puis son déroulement.

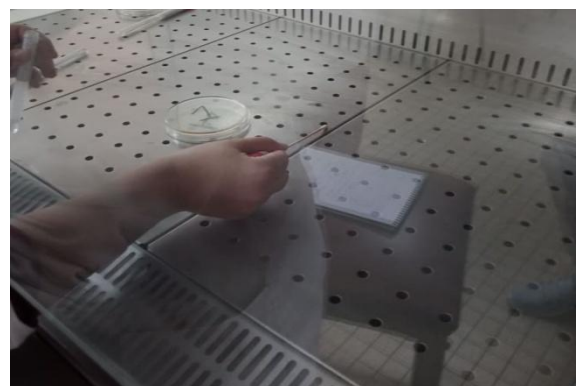


Figure 11: Contrôle microbologique des surfaces

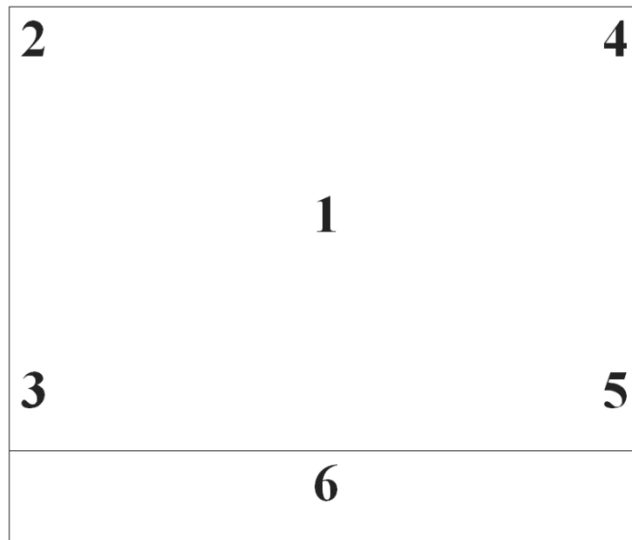


Figure 12 : Les points de prélèvement de surface des PSM laboratoire LAMAABE

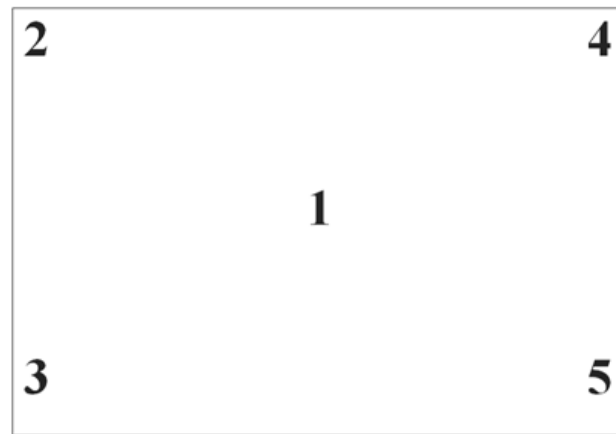


Figure 13 : Les points de prélèvement de surface des PSM laboratoire galénique

ii. Contrôle de l'air

Le prélèvement de l'air à l'intérieur du PSM est effectué par méthode par sédimentation.

- On expose les boîtes de Pétri remplies de gélose et ouverte à l'air dans les différentes zones pour recueillir sur la gélose les particules ayant sédimentées pendant 20minutes.
- On incube les boîtes à une température de 37°C en réalisant les lectures à 24H, 48H puis 72H.

Au repos

Au repos, le PSM en marche mais sans aucune activité à l'intérieur nous avons procédé comme suit :

- On prend 5 boîtes de pétries remplies de gélose et ouverte (identifiées de 1 à 5), nous avons les placés dans les différentes zones, pendant 20min pour recueillir sur la gélose les particules ayant sédimentées
- On incube les boîtes à une température de 37°C, tout en réalisant les lectures à 24H, 48H puis 72H.



Figure 14 : image montre le contrôle de l'air en état de repos

En activité

En activité, le PSM en marche et une manipulation assurée par une doctorante (PSM LAMAABE) ou par un interne en pharmacie (PSM laboratoire de galénique) est en cours :

- Nous avons pris 5 boîtes de pétries remplies de gélose (identifiées de 1à5), nous les avons placés ouvertes dans les zones critiques
- Nous avons laissé la sédimentation des micro-organismes pendant la durée d'une autre activité en parallèle des PSM
- Nous avons incubé les boîtes à 37°C pendant 72H, tout en réalisant les lectures à 24H, 48H puis 72H

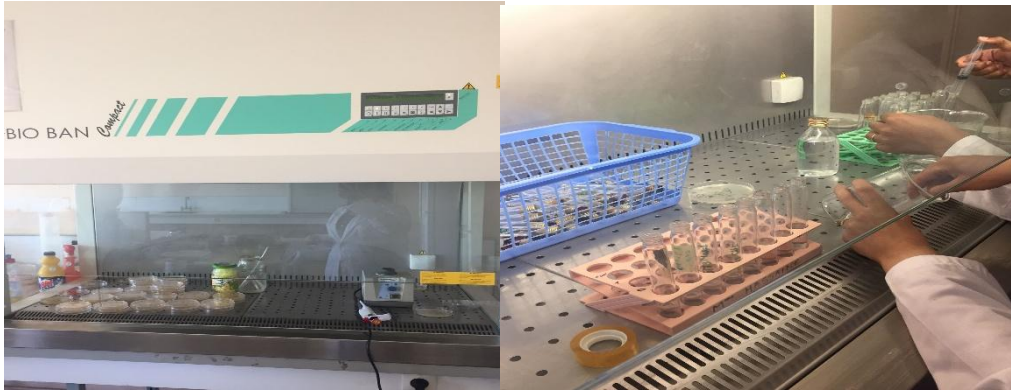


Figure 15 : images montrent le contrôle de l'air en état de repos



Figure 16 : Les points de prélèvement de l'air

III. RESULTATS

Ce travail nous a permis de rechercher les modes de défaillances et de les identifier, de proposer un plan d'action afin d'améliorer certaines pratiques lors de l'utilisation des PSM.

III.1. Analyse de risque AMDEC

Les résultats des risques issus de l'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et leur criticité réalisée sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau XVI : Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité sur les étapes de prélèvement et transport

Identification des risques	Analyse du risque								Action correctives et / ou Préventives
	Etape	Mode de défaillance	Effets	S	Causes	P	Contrôle en place	D	
Prélèvement et échantillonnage	Echantillon non représentatif de la totalité du lot	Une sous ou surestimation de la charge microbienne dans le lot : résultat non représentatif pour le lot	4	- Le nombre insuffisant - le prélèvement non au hasard - La fréquence et le temps mal calculés	3	- Contrôle visuel	2	24	- Les échantillons doivent être prélevés selon un calendrier de fréquence bien établi - Prélever au hasard pour respecter le caractère aléatoire de la prise d'échantillons (ISO 7002:1986) - Calculer le nombre à partir de la table des nombres aléatoires.
	Prélèvement non homogène	Une sous ou surestimation de la charge microbienne dans l'échantillon : résultat non représentatif pour l'échantillon	4	- Technique de prélèvement non adaptée au type d'échantillon - Personnel mal formé	2	- Contrôle de plusieurs fractions de l'échantillon	3	24	- Réaliser un prélèvement composite pour les produits solides et hétérogènes. - Former le personnel de prélèvement - Valider un protocole de prélèvement par type de produit

	Contamination du prélèvement	- Une surestimation de la charge microbienne	3	- Le matériel utilisé est contaminé	3	- Non détectable	5	45	<ul style="list-style-type: none"> - Stériliser le matériel pour prélèvement et conservation. - Les instruments non stériles peuvent être stérilisés sur place à l'aide de la flamme du Bec Bunsen ou au minimum par flambage avec l'alcool éthylique à 70 ° ou par immersion dans de l'eau de Javel. - Utiliser les flacons avec système de fermeture hermétique.
Transport et conservation	Echantillon non défini ou mal identifié	-Perte de produit -Confusion entre produits	4	-Etiquette effacée -Etiquette mal renseignée - Absence d'étiquette	3	Contrôle visuel	2	24	<ul style="list-style-type: none"> - L'étiquette doit comporter : numéro d'ordre, Date et heure, lieu et conditions du prélèvement (Température ambiante, température du produit, pH du produit) et le nom de l'opérateur - Ne pas utiliser de crayons feutres sur le PVC car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse.
	Altération de l'échantillon	Perte de produit	3	Mauvaises conditions de conservation Temps entre le prélèvement et l'analyse est long	2	Contrôle visuel	3	18	<ul style="list-style-type: none"> - Procéder le plus rapidement possible à l'analyse pour que la flore originelle ne subisse aucune modification.

		Une surestimation de la charge microbienne	3	Mauvaises conditions de conservation Temps entre le prélèvement et l'analyse est long	2	Difficilement détectable	5	30	
Préparation des échantillons	Altération produit au moment de l'ouverture	Une surestimation de la charge microbienne	3	Non respect des règles d'asepsie au moment de l'ouverture	3	Non détectable	5	45	-Nettoyer la partie supérieure des boîtes métalliques avec un coton imbibé d'alcool puis flambée à l'alcool pour ne pas chauffer l'échantillon. - Ouvrir Les boîtes avec des outils stériles. -Plonger la capsule et le goulot des bouteilles dans l'alcool puis les flamber si la bouteille n'est pas en plastique.
	Echantillon non homogène	Une sous ou surestimation de la charge microbienne dans l'échantillon : résultat non représentatif pour l'échantillon	4	- Technique d'homogénéisation mal adaptée - Personnel mal formé	2	Non détectable	5	40	-Agiter manuellement ou avec agitateur les échantillons liquides. - Faire un broyage manuel des produits solides et semi-solides. -Former le personnel -Valider un protocole d'homogénéisation

Préparation des échantillons	Dilution	Altération du produit	3	Diluant approprié non ou contaminé	2	Non détectable	5	30	-Pour les germes anaérobies protéger l'échantillon de l'oxygène atmosphérique par l'utilisation d'un diluant avec réducteur comme la vitamine C ou des chlorhydrates de L. cystéine. -Stabiliser l'émulsion des produits lipidiques par addition de 0,1% de gélose.
	Nombre de micro-organismes est très faible non détectable	Une sous estimation de la charge microbienne	4	Mode d'analyse non adapté	2	Non détectable	5	40	Faire un enrichissement ou une concentration pour augmenter les chances de leur détection

Tableau XVII : Analyse des modes de défaillances, de leurs effets et leur criticité sur les locaux et les PSM au cours de l'analyse

Identification des risques	Analyse du risque								Action correctives et / ou Préventives
	Etape	Mode de défaillance	Effets	S	Causes	P	Contrôle en place	D	
Désinfection des PSM	Désinfection des surfaces du PSM non conforme	Une surestimation de la charge microbienne du produit	3	Lampe UV détériorée	2	Contrôle microbiologique et particulaire de l'air	3	18	Valider un protocole et programme de maintenance périodique des PSM
			3	Lampe UV poussière	4	Contrôle microbiologique et particulaire de l'air	3	36	Valider un programme de nettoyage périodique des PSM
			3	Temps traitement UV insuffisant	2	Contrôle visuel	2	12	-Mettre en route le PSM et attendre 15 à 20 minutes. -Laisser fonctionner le PSM en position après chaque analyse 15 à 20 minutes.
Traitement de l'air des PSM	L'air à l'intérieur du PSM est contaminé suite a une	- Une surestimation de la charge microbienne du produit	3	Filtre colmaté : -Zone de travail empoussiérée - Fin de durée de vie du filtre	3	Contrôle microbiologique et particulaire de l'air	3	27	-Ne pas projeter des produits sur la face interne du filtre. -Nettoyer le bac de rétention situé sous le plan de travail. -Valider un programme pour changement des filtres

	pénétration de l'air pollué de l'extérieur		3	Filtre détérioré : - Génération des aérosols détruisant le filtre -Augmentation de la température	3	Contrôle microbiologique et particulaire de l'air	3	27	-Ne pas introduire des sources de chaleur importantes -Si l'emploi de flamme est indispensable, éviter le bec Bunsen et utiliser des appareils piézo-électrique Valider un programme de vérification périodique de l'intégrité des filtres
			3	Faible différence de pression entre la salle et le PSM	5	- Mesure de pression	2	30	Installer un système de ventilation de compensation dans la salle Vérifier la pression dans la salle et le PSM
	Flux d'air à l'intérieur du PSM est perturbé	Contamination de l'air suite à une mauvaise évacuation des contaminants	3	- Mauvais emplacement du PSM -Utilisation d'une flamme à l'intérieur du PSM	3	- Mesure de débit d'air - Contrôle microbiologique et particulaire de l'air	3	27	Ne pas placer le bec Bunsen sous le PSM pour ne pas perturber le flux laminaire.

			3	Encombrement de l'espace de travail Plusieurs manipulateurs dans 1 seul PSM	3	- Contrôle visuel	2	18	-Maintenir dégagées les grilles de reprise d'air. -Manipuler au centre de la surface de travail et au moins à 10 cm de la grille avant -Pas plus d'un manipulateur par PSM -Réduire au maximum l'encombrement du PSM, limiter le matériel aux objets indispensables à la manipulation -Ne pas effectuer des mouvements et des gestes rapides
Manipulation sous PSM	Relargage des contaminants à partir des surfaces	Une surestimation de la charge microbienne du produit	3	Surface contaminée : - désinfectant mal adapté - désinfectant périmé - nettoyage mal réalisé - Chiffon contaminé	3	-Contrôle microbiologique de l'air -Contrôle microbiologique des surfaces	3	27	-Nettoyer le plan de travail et les parois avec un détergent doux puis désinfecter les avec de l'alcool éthanol 70 %. -Ne pas utiliser les détergents agressifs tels l'eau de javel. -Lors du nettoyage éviter les va et viens et respecter le principe du marche en avant.
		Fixation des micro-organismes sur la surface	3	Surface détériorée : Utilisation de désinfectant agressif non compatible avec le matériau	2	- Contrôle visuel - Contrôle microbiologique de l'air - Contrôle microbiologique des surfaces	3	18	

Manipulation sous PSM	Contamination de l'air à l'intérieur du PSM par le personnel	Une surestimation de la charge microbienne du produit	3	Non respect des bonnes pratiques	4	Audit personnel	2	24	-Portez une blouse avec manches longues pour éviter les émissions cutanées -Retirer tous les bijoux -Se laver les mains -Effectuer des gestes calmes à l'intérieur du volume de travail -Ne pas tousser, ni éternuer vers le PSM.
	Contamination de l'air à l'intérieur du PSM par le matériel et les instruments	Une surestimation de la charge microbienne du produit	3	Non respect des bonnes pratiques	4	Audit personnel	2	24	-Nettoyer la surface du matériel avec l'alcool à 70%. -Anticiper l'ordre des manipulations et regrouper le matériel nécessaire à toute la manipulation près du PSM.
	Emission des contaminants dans la salle	Une surestimation de la charge microbienne du produit	3	Les manipulations émettrices de produits dangereux réalisés à proximité de l'ouverture frontale	3	Contrôle microbiologique et particulaire de l'air	3	27	Travailler dans le milieu de la largeur du PSM
	Contamination documentaire croisée	Produit A dans A Produit A dans B	4	-Plusieurs manipulateurs dans 1 seul PSM - Le PSM n'a pas été vidé des éléments de la précédente analyse	3	Control visuel	2	24	-Etiqueter tous les tubes et les boîtes de pétri. -A la fin de chaque manipulation, ranger le plan de travail et s'assurer de n'y laisser que les portoirs à tubes.

III.2. Contrôle des PSM

Le contrôle microbiologique, de l'air et des surfaces des PSM dans le laboratoire de recherche de microbiologie LAMAABE et de pharmacie galénique a permis d'obtenir les résultats décrits ci-dessous.

III.2.1. Contrôle des surfaces

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

Tableau XVIII : Résultat de contrôle de la surface du PSM1 salle 1 LAMAABE

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	Très nombreux	Absent	Non conforme
2	16	Absent	Non conforme
3	6	Absent	Non conforme
4	4	Absent	Acceptable
5	4	Absent	Acceptable
6	Très nombreux	Absent	Non conforme

Nous avons observé que la contamination majeure est située dans la zone 1, que nous avons interprété comme une zone de manipulation très réactive. Et aussi une contamination majeure à la zone 6, nous avons l'interprété comme une zone non protégée.

Tableau XIX : Résultat de contrôle de la surface du PSM2 salle 2 LAMAABE

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	1	Absent	Acceptable
2	0	présent	Acceptable
3	2	Absent	Acceptable
4	0	présent	Acceptable
5	17	présent	Non conforme
6	6	présent	Non conforme

Tableau XX : Résultat de contrôle de la surface du PSM_{GAL}

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	0	Absent	Conforme
2	0	Absent	Conforme
3	1	Absent	Acceptable
4	0	Absent	Conforme
5	0	Absent	Conforme

III.2.2. Contrôle de L'air

Au repos

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau XXI: résultat de contrôle de l'air au repos de la PSM 1 salle 1 LAMAABE

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	2	Absent	Acceptable
2	1	Absent	Acceptable
3	1	Absent	Acceptable
4	3	Absent	Acceptable
5	1	Absent	Acceptable

Tableau XXII : résultat de contrôle de l'air au repos de la PSM 2 salle 2 LAMAABE

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	0	Absent	conforme
2	0	Absent	conforme
3	0	Absent	conforme
4	0	Absent	conforme
5	0	Absent	conforme

Tableau XXIII : Résultat de contrôle au repos de l'air du PSM_{GAL}

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	0	Absent	Conforme
2	0	Absent	Conforme
3	0	Absent	conforme
4	0	Absent	conforme
5	0	Absent	conforme

Nous avons observé qu'il n'y a pas une contamination au repos.

En activité

Tableau XXIV : résultat de contrôle de l'air en activité repos de la PSM 1 salle 1 LAMAABE

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	2	présent	Acceptable
2	7	Absent	Non conforme
3	1	Absent	Acceptable
4	0	Absent	Acceptable
5	2	Absent	Acceptable

Tableau XXV : résultat de contrôle de l'air en activité de la PSM 2 salle 2 LAMAABE

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	0	Absent	conforme
2	0	Absent	conforme
3	0	Absent	conforme
4	0	Absent	conforme
5	7	Absent	Non conforme

Tableau XXVI : Résultat de contrôle de l'air en activité du PSM_{GAL}

N° de Prélèvement	UFC /m ²	Champignons filamenteux	Remarque
1	0	Absent	conforme
2	0	Absent	conforme
3	0	Absent	conforme
4	0	Absent	conforme
5	0	Absent	conforme

IV. DISCUSSION

Notre nouvelle structuration AMDEC nous a permis de rechercher de manière systématique:

- Le mode de défaillance ou encore l'événement qui pourrait être apparu durant chaque étape.
- Les effets associés ; qui représentent la conséquence des événements apparus, et a titre relatif la sévérité qui sera pondérée en fonction des conséquences sur le produit et le patient ; pour bien comprendre si c'est acceptable ou pas en terme de qualité des résultats à obtenir.
- Les causes qui sont à l'origine de cette défaillance et leur probabilité d'apparition ou encore l'occurrence des défaillances, afin d'estimer si le mode de défaillance risque de se produire, et à quelle fréquence.
- Les moyens de contrôle utilisés pour détecter les risques, qui se font soit par une simple vérification visuelle ou bien par des moyens automatisés... dont l'estimation de l'efficacité du contrôle se fera par la détectabilité.

En suivant cette démarche, nous avons structuré notre tableau AMDEC selon un ordre d'organisation logique visant à visualiser une corrélation relative dans la succession des colonnes.

Durant l'analyse AMDEC nous avons détecté 17 modes de défaillances possibles. Pour chaque mode de défaillance nous avons cité une ou plusieurs causes.

L'étude de la possibilité de détecter la défaillance, sa probabilité d'apparition et les conséquences possibles sur la qualité des résultats obtenus nous a permis de classer les défaillances en 20 risques majeurs et 4 risques critiques.

Pour chaque mode de défaillance nous avons proposé des actions correctives et préventives. Les actions correctives et préventives sont toutes illustrées dans une colonne de commentaire, et expliquent brièvement la démarche à suivre ou les recommandations réglementaires de chaque étape.

L'AMDEC est la méthode d'analyse la plus adaptée à notre besoin, en raison de :

- son application sur tout le cycle de contrôle depuis l'échantillonnage jusqu'à la lecture des résultats.

- elle permet aussi l'analyse des effets des événements redoutés, et enfin la recherche de leurs causes et l'évaluation de leur criticité pour proposer des actions correctives et/ou préventives.
- Son hiérarchisation des risques permet de prioriser une action correctrices par rapport à d'autres.

Malheureusement, cette méthode est subjective. Les cotations de probabilité sont attribuées suivant nos connaissances théoriques d'où l'intérêt de la collaboration d'un grand nombre d'expert en analyse microbiologique pour réussir cette analyse.

L'analyse de risque AMDEC nous a permis de confirmer la place de l'analyse microbiologique de l'air et des surfaces des PSM afin d'augmenter la détectabilité d'une contamination du produit au moment de l'analyse et qui faussera les résultats du contrôle.

La qualité microbiologique de l'air et des surfaces doit répondre, en activité, aux normes ISO pour la classe 5 :

- Air : Absence de champignons et moins de 10 UFC/m³ de germes
- Surface : Absence de champignons et moins de 5 UFC/m³ de germes

La contamination au niveau du point de prélèvement numéro 6 des PSM II confirme que cette zone est inadaptée à toute manipulation. En effet, la grille d'aspiration située en partie basse, donc l'écoulement de l'air est plus faible au niveau de la partie supérieure. Mais, pour ces PSM II qui sont alimentés d'un flux d'air descendant l'interaction avec l'air entrant est faible.

La contamination enregistrée au niveau des points numéro 1 et 2 du PSM lors de la manipulation de la doctorante est expliquée par la quantité importante de matériel déposé au niveau de cette zone ce qui perturbe l'écoulement d'air. Ceci est confirmé par les recommandations des experts de la nécessité d'introduire uniquement le matériel nécessaire à la réalisation de l'étape en cours.

La différence de niveau de contamination de l'air entre l'état de repos et l'état d'activité est expliquée aussi par les courants d'air provenant du déplacement des personnes, les portes et les fenêtres qui perturbent fortement le flux à l'intérieur du PSM.

La méthode d'analyse d'air par sédimentation n'est pas très utilisée et n'est pas productible car le volume d'air prélevé est très variable. Il est recommandé de la remplacer par méthode par bio collecteur.

Suite a l'analyse AMDEC et contrôle des PSM, nous recommandons pour chaque travail sous PSM :

- Nettoyer correctement les mains avant et après les manipulations ;
- Mettre à disposition du personnel des moyens de protection individuelle : blouses, gants, lunettes de protection ;
- appliquer des bonnes pratiques de laboratoire ;
- Utiliser correctement le PSM : un seul manipulateur, limiter les gestes à l'intérieur du PSM, ne pas encombrer la surface en introduisant uniquement le matériel nécessaire à l'étape en cours, limiter les déplacements dans la pièce durant les manipulations sous PSM, fermer les portes et les fenêtres de la salle ;
- Assurer une formation continue au personnel et étudiants ;
- Valider le protocole de contrôle de l'air et des surfaces ;
- Mettre en place un contrôle particulière de l'air ;
- Remplacer la méthode de sédimentation pour le contrôle de l'air par méthode par biocollecteur ;
- Valider un programme de maintenance des filtres ;
- Ajouter un système de ventilation dans les salles de PSM du laboratoire LAMAABE.

CONCLUSION

Le travail sous PSM permet de protéger l'opérateur des contaminations bactériennes, virales, ou fongiques et de préserver l'échantillon des contaminations de l'environnement, et éviter toute contamination ou une contamination croisée.

Le contrôle des surfaces permet de contrôler l'efficacité du nettoyage et de la désinfection, ou de dépister des « nids » microbiens. Il concerne le plan de travail.

Le contrôle de l'air permet de s'assurer du bon fonctionnement du PSM : le débit de l'air et l'intégrité des filtres.

Au cours de ce travail, grâce à une analyse de risque AMDEC appliquée sur le circuit du contrôle microbiologique d'un produit nous a permis de confirmer la place de l'analyse microbiologique de l'air et des surfaces des PSM afin d'augmenter la détectabilité d'une contamination du produit au moment de l'analyse et qui faussera les résultats du contrôle. Les résultats du contrôle microbiologique nous ont permis de recommander le contrôle de l'air et des surfaces en activité en appliquant une procédure préalablement validée.

Recommandations et perspectives :

Nous recommandons

- De valider le contrôle de l'air et des surfaces en augmentant le nombre des PSM et en identifiant les micro-organismes.
- Standardiser la manipulation pour le contrôle en activité en manipulant une biocahрге connue qualitativement et quantitativement

Références bibliographiques

1. Project de guide de bonnes pratiques de préparation, Project. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé AFSSAPS. Bonnes pratiques de préparation, Paris; 2007.
2. Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. 2007 ;476 :24-36.
3. Klein J-P. Le poste de sécurité microbiologique de la réglementation à l'accréditation. Revue francophone des laboratoires, 2012.(445):91-100.
4. Dara S . Manuel de sécurité biologique en laboratoire . Organisation mondiale de la Santé. Genève ; 2004.
5. Boeck HD. Biosafety cabinets. Institute of tropical medicine ; Clinical sciences, Anvers ;January 2012.
6. Norme NF. EN ISO 14644-1: Salles propres et environnement maîtrisés apparentés—Partie 1: Classification de la propreté de l'air. Indice de classement X44-101.Juillet1999.
7. Combet M, Deauville H. La Qualité de l'Air : Données de base, Maîtrise ,Contrôle. Patriarche MC, Montpellier; 2010.
8. Corriol O, Arnaud P, et Al. Recommandations pour la préparation des mélanges de nutrition parentérale.Nutrition clinique et métabolisme.2005 ; 19(1) :30-55.
9. QUESNEL C, al. Contrôles microbiologiques en hygiène hospitalière : La Société française d'hygiène hospitalière (SFHH) ; Conseils pratiques. France, 1998.
10. Gangneux J-P, Bousseau A, Cornillet A, Kauffmann-Lacroix C. Control of fungal environmental risk in French hospitals. Journal de Mycologie Médicale. 2006;16(4):204-11.
11. MINISTRE DLS. Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire. Ottawa: Ministre de la Santé; 2004.
12. BAILLY A, CLERC-RENAUD M, RUTMAN E, TERNANT C. Traitement de l'air et climatisation. Les composants et leurs fonctions. Techniques de l'ingénieur Génie énergétique. 2001;5(BE9271):BE9271. 1-BE. 28.
13. Collins CH. Laboratory-acquiredinfections:history, incidence, causes and prevention: Butterworth& Co (Publishers) Ltd; 1988.
14. Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim S, et al. The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network;

minimum requirements, role and operation in a low-income country: International Union Against Tuberculosis And Lung Disease (IUATLD); 1998.

15. Balty I, Belhanini B, Clermont H, Cornu J, Jacquet M, Texte J. Postes de sécurité microbiologique—Postes de sécurité cytotoxique—Choix et utilisation. Cahiers de notes documentaires. 2003;193:37-52.

16. HAUMEIL J. Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière ,Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins :1 édition , 2001 ;P : 72.

17. Mazouni M-H. Pour une Meilleure Approche du Management des Risques : De la Modélisation Ontologique du Processus Accidentel au Système Interactif d'Aide à la Décision Nancy INPL; 2008.

18. Negrichi K. Approche intégrée pour l'analyse de risques et l'évaluation des performances: application aux services de stérilisation hospitalière: Université Grenoble Alpes; 2015.

19. Landy G. AMDEC: Guide pratique,2 édition: Afnor, Saint Denis; 2011.

20. Duret D, Pillet M. Qualité en production. Edition d'organisation, Paris. 1998.

21. Ouahdi S. Étude et analyse des risques dans les projets PPP: proposition de hiérarchisation: École de technologie supérieure, Quebec; 2008.

22. Bending M, Maurice P. Malaria: a laboratory risk. Post graduate medical journal. 1980; 56(655):344.

23. Touche S, Leprince A, Abiteboul D. Maîtrise des risques infectieux en laboratoires de microbiologie. Hygiènes. 2002;10:118-31.

24. Hergon E, Rouger P, Garnerin P. La prévention des défaillances du processus transfusionnel. Transfusion Clinique et Biologique.1994 ; 1(6):455-65.

25. BERSON L. Comprendre l'AMDEC. Consultant et Formateur en management des systèmes, auditeur QMS certifié IRCA, base documentaire : piloter et animer la qualité.2015.

26. RIDOUX M. AMDEC – Moyen, base documentaire. Conception et Production et dans l'univers Génie industriel. Techniques de l'ingénieur, AG4.2001 ;220 :45-93.

27. Zwingelstein G. Diagnostic des défaillances. Théorie et pratique pour les systèmes industriels, Série Diagnostic et Maintenance. Hermes, Paris. 1995.

Résumé :

Titre : Contrôle de l'air et de surface des postes de sécurité microbiologique et application de la méthode AMDEC

Notre travail a été réalisé au laboratoire LAMAABE et laboratoire de pharmacie galénique de TLEMCEN, pendant une durée de 7 mois dans le but de mettre en place un contrôle microbiologique des surfaces de travail et de l'air des PSM. Une analyse de risque AMDEC a été effectuée afin de détecter les modes de défaillance possibles d'une manipulation de contrôle microbiologique sous PSM et proposer des actions correctives et préventives.

Le contrôle microbiologique est réalisé en effectuant des prélèvements d'air au niveau de 5 points différents avec la méthode de sédimentation. Le contrôle est réalisé en repos et en activité. Le contrôle des surfaces est réalisé en activité par méthode d'écouvillonnage. Pour les PSM à surface non perforée nous avons défini 5 points d'écouvillonnage, et pour les PSM à surface perforée nous avons 6 points d'analyse.

L'analyse de risque AMDEC nous a permis de confirmer la place de l'analyse microbiologique de l'air et des surfaces des PSM afin d'augmenter la détectabilité d'une contamination du produit au moment de l'analyse et qui faussera les résultats du contrôle. Les résultats du contrôle microbiologique nous ont permis de recommander le contrôle de l'air et des surfaces en activité en appliquant une procédure préalablement validée.

Mots clés : AMDEC, Biocontamination, Contamination croisée, Contrôle, PSM

Summary

Titre : The air control of the micribiologied security of post surface and the applicayion of FMECA method.

Our work was conducted in the laboratory LAMAABE and galenic pharmaceutical laboratory of TLEMCEN, during a period of 7 months in order to set up a microbiological control of the working surfaces and the air of the PSM. A risk analysis FMECA has been performed to detect the possible failure modes of microbiological control manipulation under PSM and propose corrective and preventive actions. Microbiological control is performed by taking air samples at 5 different points of time with the sedimentation method. The control is then carried out in both rest and in activity. The surface control is performed in activity by swabbing method. For non-perforated PSM we have defined 5 swab points, and for PSM with perforated surface we have 6 points of analysis. The FMECA risk analysis allowed us to confirm the role of the microbiological analysis of the air and the surfaces of the PSM in order to increase the detectability of a contamination of the product at the time of the analysis and which will distort the results. The results of the microbiological control allowed us to recommend the control of air and surfaces in activity by applying a previously validated procedure.

Key words: FMEA, Biocontamination, Cross Contamination, Control, PSM

العنوان : مراقبة الهواء وسطح مراكز الأمان في علم الأحياء المجهرية و تطبيق طريقة AMDEC

الملخص :

لقد تم عملنا في مخبر LAMAABE وفي مخبر صيدلانية جالينيك بتلمسان خلال مدة تقدر بسبعة أشهر من أجل وضع مراقبة علم الأحياء المجهرية و سطح مراكز الأمان للعمل والهواء PSM تحليل المخاطر تم القيام به للكشف عن أوضاع الفشل المحتملة لتلاعب رقابة علم الأحياء المجهرية تحت AMDEC واقتراح الإجراءات الصحيحة .

إن مراقبة علم الأحياء المجهرية قد تحقق عن طريق أخذ عينات الهواء من خمس نقاط PSM مختلفة بواسطة طريقة الترسيب. المراقبة قد تمت بأستراحة وبنشاط مراقبة الواجهات قد تمت بنشاط من خلال طريقة المسح ، وبالنسبة ل PSM لسطح غير مثقب كنا قد عرفنا خمس نقاط للمسح ، وبخصوص PSM لدينا ست نقاط للتحليل.

تحليل المخاطر AMDEC جعلتنا نتأكد من مكانة تحليل علم الأحياء المجهرية للهواء وأسطح PSM لزيادة الكشف عن تلوث المواد عند التحليل والتي تشوه نتائج المراقبة . نتائج رقابة علم الأحياء المجهرية جعلتنا من الممكن أن نوصي بضرورة مراقبة الهواء والسطحيات بنشاط من خلال تطبيق إجراء للتحقق من صحته .

الكلمات المفتاحية:AMDEC - تلوث المجهرية - التلوث المنعكس - المراقبة - PSM