



Fiche : Gestion des prélèvements biologiques d'un patient suspect ou confirmé de COVID-19

Version 3

Recommandations de la SFM à destination des laboratoires des Etablissements de Santé et des Hôpitaux militaires ainsi que des Laboratoires de Biologie Médicale Mars 2020.

Rédacteurs (Groupe de travail SFM « Micro-organismes émergents » et Section sécurité et sûreté biologiques) : Maude Bouscambert, Nadine Lemaitre, Sébastien Allix-Le Guen, Audrey Merens, Bruno Lina, Gérard Lina

Généralités

Le virus SARS-CoV2 (nouvelle dénomination du nCoV-2019) est un virus de la famille des coronavirus (Coronavirus humains agents du rhume banal / NL63, HUK1... ; SARS-CoV en 2003 ; MERS-CoV 2012). La transmission est de type gouttelette comme la grippe (maximum de contagiosité à ≤ 1 m). Sa durée de survie sur surfaces inertes est inconnue mais, le MERS-CoV, virus apparenté, peut survivre pendant quelques jours en particulier en atmosphère humide (taux d'humidité $\geq 50\%$) et à faible température.

Les premières données (en cours de publication) sur le suivi des premiers patients COVID-19 hospitalisés en France rapportent une virémie inconstante, faible et de courte durée, principalement décrite dans les formes sévères (SDRA). La virurie reste inexistante. En revanche, la quantité de virus excrété dans les selles peut être élevée comme cela a été observé avec le virus MERS-CoV. Des cas de contamination du personnel soignant ont été décrits mais aucun cas de contamination du personnel de laboratoire n'a été rapporté. Les précautions standards de manipulation des agents infectieux au laboratoire sont suffisantes. Les coronavirus sont sensibles aux désinfectants usuels virucides tels que l'hypochlorite de sodium 0,5%, l'acide peracétique/peroxyde d'hydrogène, l'éthanol ou l'isopropanol à 70%, glutaraldéhyde...selon la norme EN 14476 s'ils sont utilisés suivant les recommandations du fabricant (respect de la concentration et du temps de contact).

Ces éléments permettent d'évaluer le risque associé à la manipulation d'échantillons biologiques susceptibles de contenir du SARS-CoV2 (prélèvements respiratoires et selles) pour le diagnostic d'infection COVID-19 d'une part mais éventuellement pour un diagnostic complémentaire ou différentiel (panel diagnostiques, paramètres d'urgence) sans perte de chances pour le patient.



Selon les recommandations de l'OMS, CDC et ECDC, la manipulation des échantillons microbiologiques d'un patient suspect de COVID-19 peut s'effectuer dans un LSB2 en respectant les bonnes pratiques de travail, particulièrement lors des manipulations pouvant générer accidentellement des aérosols, en mettant à disposition une conduite à tenir en cas d'incident (traçabilité du personnel et des échantillons). Seule la culture du virus doit se faire impérativement dans un LSB3.

La Société Française de Microbiologie est en accord avec ce principe.

Ces recommandations sont amenées à évoluer au fur et à mesure que les connaissances s'affineront. Elles sont également susceptibles d'évoluer en fonction de l'épidémiologie.

Diagnostic et prélèvements

En France, le diagnostic spécifique de COVID-19 est réalisé actuellement par RT-PCR spécifique sur un prélèvement naso-pharyngé (écouvillon ou aspiration). Des tests commerciaux sont en cours d'évaluation et de distribution (liste DGS en cours).

Les prélèvements à réaliser pour le diagnostic initial COVID-19 sont les suivants :

- Un prélèvement systématique des voies respiratoires hautes (naso-pharyngé /écouvillons Virocult® ou aspirations),
- Un prélèvement des voies respiratoires basses (crachats, liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), aspiration trachéo-bronchique en cas d'atteinte parenchymateuse,

Pour plus d'informations ainsi que pour les prélèvements de suivi d'un patient positif se référer aux recommandations des CNR.

Il est recommandé que les prélèvements destinés à des analyses non urgentes de cytologie ou de biochimie réalisées sur des prélèvements respiratoires ou prélèvements de selles ainsi que les analyses d'anatomo-cytologie non urgentes ou ne soient pas envoyés aux laboratoires destinataires avant la levée de doute sur une infection COVID-19. Ils doivent être conservés dans le service à +5°C si possible.

Toutefois, si ces analyses ne peuvent pas être différées (patients de réanimation par exemple), les échantillons pourront être envoyés aux laboratoires de Microbiologie en respectant les recommandations de conditionnement, d'acheminement et de prise en charge décrites ci-dessous.



Acheminement des prélèvements

Les prélèvements biologiques destinés au laboratoire doivent être limités au strict nécessaire (diagnostic d'infection COVID-19 et analyses urgentes liés aux soins du malade).

Prévenir le laboratoire de l'acheminement de prélèvements pour le diagnostic de SARS-CoV2.

1. *Prélèvements à risque élevé de contamination*

- **Prélèvements respiratoires** type crachats, aspirations bronchiques, prélèvements distaux protégés, liquides broncho-alvéolaires écouvillon rhinopharyngé pour la recherche du SARS-CoV2
- **Selles**
- Pour ces prélèvements, dans la mesure du possible, privilégier le transport par voie pédestre. Le pneumatique est à éviter en raison du risque de déversement des pots à vis. En revanche, ce risque de déversement est très faible pour les écouvillons.
- Le triple emballage est recommandé rigide ou à défaut, un triple emballage souple avec du papier absorbant, en particulier pour les prélèvements en pot à vis.
- En cas de déversement de ces échantillons à la réception au laboratoire :
 - o Ne pas ouvrir le sachet en dehors d'un PSM2
 - o Décontaminer la surface de réception selon le protocole en vigueur du laboratoire
- Il est indispensable de rappeler au service la nécessité de bien fermer les contenants. Le risque de dissémination est associé à l'ouverture accidentelle d'un tube mal fermé.

2. *Prélèvements sans ou à faible risque de contamination*

- Sang (hémoculture, tubes de sang pour la biochimie, l'hématologie..), urines, liquides de séreuse (incluant le liquide pleural), écouvillons rectaux de dépistage des BMR (très faible quantité de selles).
- Acheminement et emballage selon la filière standard des échantillons biologiques de l'établissement.



Il n'est pas utile de décontaminer les contenant à l'arrivée au laboratoire (risque de retard de prise en charge et donc perte de chance pour le patient). Les mesures standards de manipulation des échantillons biologiques, **le port de gants** en particulier, suffisent pour protéger le manipulateur.

Réalisation des analyses microbiologiques au laboratoire

1. *Prélèvements à risque élevé de contamination*

- La manipulation des échantillons respiratoires et de selles nécessitant une ouverture manuelle des contenants doit se faire dans un laboratoire LSB2, sous PSM2, quelles que soient les activités réalisées (mise en tampon de lyse pour l'extraction des acides nucléiques, ensemencement à visée bactériologique ou mycologique, les dépôts sur lame et la fixation des lames en vue d'un examen microscopique, cytologie des liquides type LBA...) et selon les conditions décrites dans le paragraphe 5.2.1.7 du manuel de sécurité et de sûreté biologique (annexe 1).
- Les conditions de sécurité biologique recommandées (ou obligatoires) pour réduire tout risque de dissémination en cas d'accident sont listées ci-dessous :
 - Personnel en nombre limité dans la pièce du LSB2,
 - Port de gants jetables à usage unique,
 - Toute centrifugation doit se faire en nacelle étanche et toute ouverture de nacelle de centrifugation doit se faire sous PSM2 (*cf.* paragraphe 5.2.3 du manuel de sécurité et de sûreté biologique, annexe 1),
 - Tout vortexage doit se faire sous PSM2,
 - Le poste de sécurité microbiologique doit être nettoyé après usage avec un détergent-désinfectant virucide (Norme EN 14476) en suivant les recommandations du fabricant (respect de la concentration et du temps de contact),
 - Disposer d'une procédure décrivant la conduite à tenir en cas de déversement de liquides biologiques ou de projections sous le PSM2,
 - Procéder à une hygiène des mains avec PHA avec retrait des gants,
- Une fois fixées, les lames peuvent être colorées en dehors du PSM2,
- Les milieux de culture ensemencés manuellement peuvent réintégrer une chaîne robotisée pour lecture automatisée mais il est rappelé que le déchargement des boîtes de culture de la chaîne doit se faire en respectant les précautions standards (**port de gants**),



- Lorsqu'il n'y a pas besoin de prétraitement ou de dilution de l'échantillon, l'ensemencement à visée bactériologique ou mycologique de milieux de culture et les dépôts sur lame et la fixation peuvent être aussi réalisés directement avec les ensemenceurs capables d'ouvrir les contenants fermés et possédant un module d'ensemencement fermé avec traitement d'air par filtre HEPA.
- Les prélèvements positifs sont adressés au CNR des virus respiratoires (adresses ci-dessous).

2. Prélèvements sans ou à faible risque de contamination

- Pas de précautions particulières en dehors des précautions standards de manipulation des échantillons biologiques (port de gants),
- Les prélèvements seront traités selon les procédures standards du laboratoire (ensemencement manuel ou automatisé des prélèvements microbiologique, coloration....).

Gestion des déchets

- Les déchets générés par la prise en charge des prélèvements respiratoires et de selles, quel que soit le statut COVID-19, déposés dans un container DASRI rigide sous PSM 2 seront éliminés après un autoclavage (30 min à 121°C). En cas d'absence d'autoclave dans le laboratoire, le container DASRI rigide sera rempli avec un volume (2 cm de hauteur) de Javel 0,5% ou tout autre désinfectant actif contre le COVID-19 avant de rejoindre le circuit standard des DASRI.
- Les containers rigides DASRI devront être fermés et désinfectés par un désinfectant actif contre le COVID-19 avant d'être sorti du PSM2
- Les déchets générés par la prise en charge des prélèvements sans ou à faible risque de contamination seront éliminés selon le circuit standard des DASRI.

Envoi de souches :

Le conditionnement recommandé : catégorie B (Norme UN 3373) / triple emballage notice d'instruction P650 avec un container rigide (emballage secondaire) placé pour le transport dans une boîte en carton/



Adresse des Centres Nationaux de références des virus respiratoires :

France SUD

Centre National de Référence virus des infections respiratoires (dont la grippe)
Institut des Agents Infectieux
Hôpital de la Croix Rousse, Bâtiment O / Centre de Biologie et de Pathologie Nord
103, Grande-Rue de la Croix-Rousse 69004 Lyon
Secrétariat IAI : 04 72 07 11 11

France NORD

Centre National de Référence virus des infections respiratoires (dont la grippe)
Institut Pasteur 25-28 rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15 France
Secrétariat du CNR : +33(0)1 45 68 87 25

Références

- Manuel de sécurité et sûreté biologiques, 2^{ème} édition, 2019.
- Dépistage en laboratoire des cas suspects d'infection humaine par le nouveau coronavirus 2019 (2019-nCoV). Lignes directrices provisoires du 17 Janvier 2020. WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.3
- Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19), interim guidance 2 march 2020. WHO/2019-nCoV/laboratory/2020
- Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. interim guidance 12 february 2020. WHO/2019-nCoV/laboratory/2020
- Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th Edition, CDC.
- Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens from persons under investigation (PUIs) for 2019 novel coronavirus (2019-CoV), CDC 2019. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/index.html
- Infection prevention and control during health care for probable or confirmed cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection. Interim guidance Updated October 2019, WHO/MERS/IPC/15.1 Rev 1
- Laboratory testing for middle East respiratory syndrome coronavirus, Interim guidance (revised), January 2018. WHO/MERS/LAB/15.1/Rev1/2018
- Manuel de sécurité biologique en laboratoire, 3^{ème} édition. www.emro.who.int/fr/health-topics/biosafety
- Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses (2015-2016), WHO/HSE/GCR 2015.2.
- Chloé Geller, Mihayl Varbanov and Raphaël E. Duval. 2012. Human Coronaviruses: Insights into Environmental Resistance and Its Influence on the Development of New Antiseptic Strategies. *Viruses* 2012, 4, 3044-3068; doi:10.3390/v4113044



Annexe 1

Extrait du Manuel de Sécurité et de Sûreté Biologiques
2^e édition 2019
Edité par la Société Française de Microbiologie

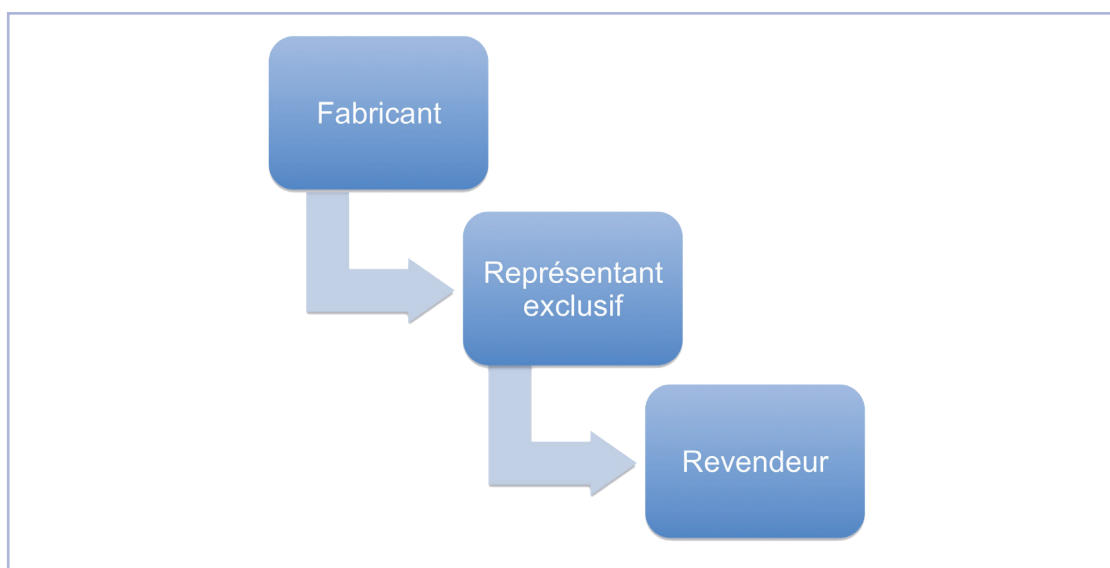


Figure 5.9 : Démarche de choix d'un fournisseur

5.2.1.7. Règles de manipulation sous PSM de Type II

La figure 5.10 regroupe les principales recommandations à respecter pour manipuler en sécurité sous un PSM de Type II.

L'utilisation d'une source de flamme, même ponctuelle, attire le flux d'air «propre» autour du cône de chaleur de la flamme. Ce phénomène est connu depuis la fin du XVIIIème siècle. En conséquence, de l'air de la pièce dit «sale» pénètre dans le volume de travail et est une source potentielle de contamination du produit. Le risque d'incendie est, de plus, à prendre en compte du fait du recours intensif à des matériels en plastique.

Pour ce qui concerne les UV, seuls les UV C ont une activité biocide. Les lampes UV implantées dans les PSM en standard ou sous forme de rampe(s) supplémentaire(s) émettent très majoritairement des UV B qui n'ont pratiquement pas d'action biocide. Par ailleurs les UV possèdent des distances d'efficacité peu importantes, de l'ordre de quelques dizaines de centimètres. A cela, s'ajoute le risque non négligeable d'illumination accidentelle dans le cas d'utilisation de rampes supplémentaires. Contrairement

à la lampe UV installée d'origine et dont le fonctionnement est associé à des sécurités spécifiques, les rampes supplémentaires ne sont pas toutes associées à ce type de sécurité.

5.2.1.8. Décontamination du plan de travail d'un PSM de Type II

La figure 5.11 regroupe les étapes successives d'une décontamination du plan de travail d'un PSM de Type II. Ces séquences sont applicables pour la décontamination régulière du plan de travail, après chaque séquence d'utilisation mais également lors d'épandage accidentel de faible ampleur.

5.2.1.9. Principaux points de contrôle annuel d'un PSM de Type II

Les méthodes de mesure de la protection du personnel décrites dans l'annexe C (normative) de la norme NF EN 12469 ne sont pas techniquement et économiquement aisément transférables sur site. La protection du personnel est la plupart du temps déduite du maintien dans le temps des autres paramètres contrôlés.

5 Equipements

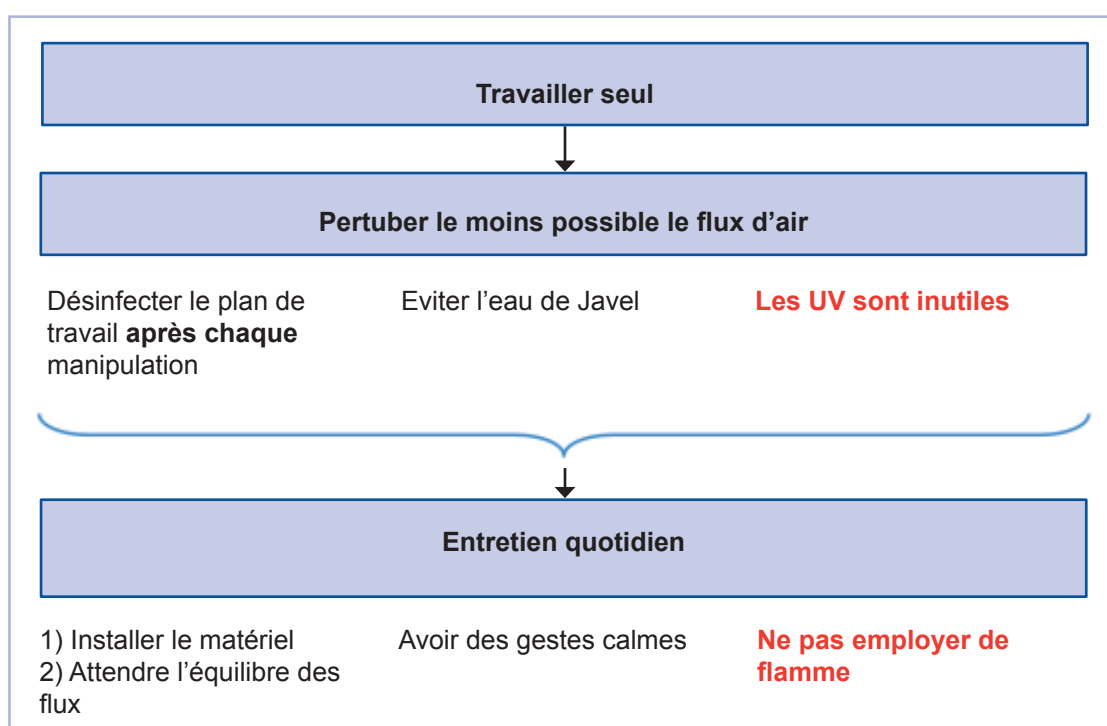


Figure 5.10 : Principales règles de manipulation sous PSM de Type II

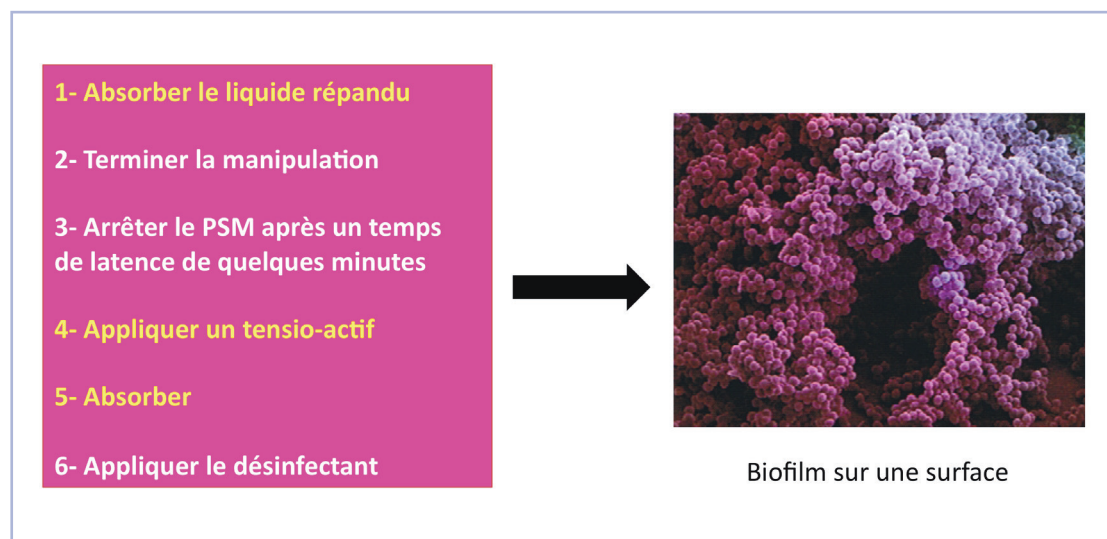


Figure 5.11 : Etapes de décontamination du plan de travail d'un PSM de Type II

Ces derniers relèvent principalement de la norme NF EN ISO 14644 et plus précisément des chapitres portant sur la partie ventilation à savoir :

- la classe d'empoussièrement du volume de travail (normalement ISO 5 au minimum);
- le débit volumétrique (encore appelé taux de renouvellement d'air). Celui-ci peut être soit mesuré directement, mais cela nécessite une installation technique qu'il n'est pas toujours possible de mettre en place, soit calculé à partir de la mesure des vitesses;

- la mesure des pressions différentielles.

Ces mesures, incontournables pour respecter les obligations de la norme NF EN ISO 14644 qui qualifie le niveau de protection du produit, sont réalisées annuellement. Dans le cas d'une classe d'empoussièrement inférieure à ISO 5, la fréquence de contrôle de ce paramètre est portée à 6 mois au lieu de 12.

Elles peuvent être complétées par d'autres mesures, facultatives :

- fuite ou colmatage d'un filtre. Ce critère concerne essentiellement le filtre d'extraction. Ce dysfonctionnement fait perdre sa qualité d'EPC au PSM. Une telle anomalie sur le filtre de soufflage se traduit par une classe d'empoussièrement non conforme ;
- fuite de confinement. Celle-ci est généralement visualisée par un test fumigène, cette technique étant par ailleurs assez aléatoire et fortement sujette à générer des artefacts.

Ces mesures complémentaires, si elles sont réalisées, doivent l'être au maximum tous les 2 ans.

Les normes NF X 44-201 et NF EN 12469 demandent la vérification annuelle de différents paramètres :

- le maintien des V_{moy} et V_{ind} dans la fourchette de tolérance de leurs valeurs initiales. Ces valeurs sont obtenues à partir d'une carte des vitesses établies sur 8 points de mesure répartis en 2 séries de 4 qui couvrent tous les volumes de travail (NF X 44-201 et NF EN 12469) ;
- la mesure de la vitesse d'entrée d'air par le bandeau de reprise (NF X 44-201 et NF EN 12469) **avec $V > 0,4$ m/s** (NF EN 12469 **seule**) ;
- le bon fonctionnement des alarmes (NF X 44-201 et NF EN 12469) ;
- la mesure des temps de réponse des alarmes (NF EN 12469 **seule** et certification NF).

La figure 5.12 regroupe les principaux paramètres contrôlés annuellement sur un PSM de Type II

5.2.2. Les isolateurs

Pour pouvoir bénéficier de l'appellation « Isolateurs », les matériels ou dispositifs de confinement doivent être conformes tant sur le plan de la conception que de la fabrication, des applications et des performances en particulier au niveau de l'étanchéité, aux normes ISO 10648-1 et 2.

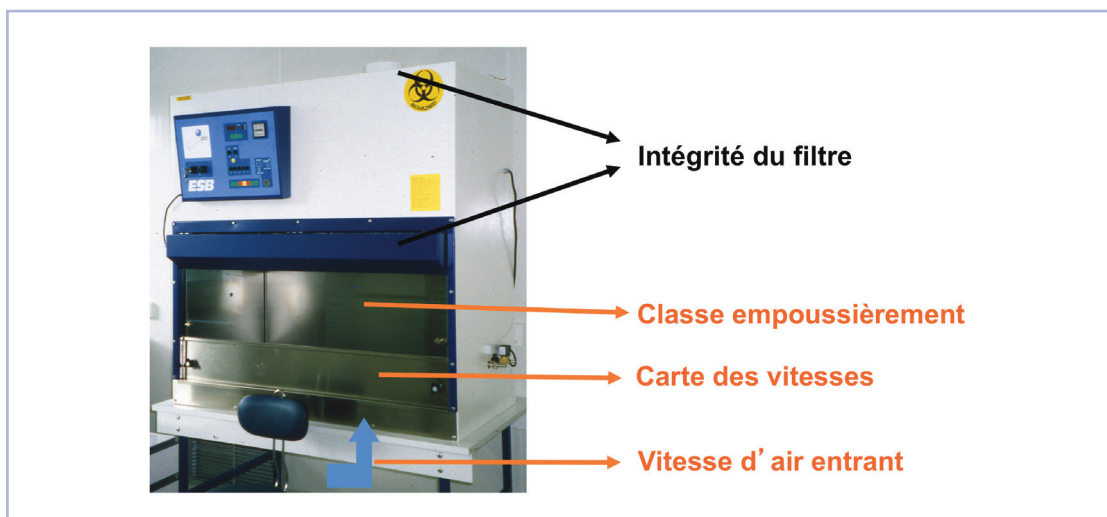


Figure 5.12 : Principaux points contrôlés annuellement sur un PSM de Type II

5 Equipements

Les isolateurs sont répartis en 4 classes de confinement décroissant et les tests d'étanchéité diffèrent selon la classe de confinement (Tableau 5.4).

Ainsi, pour une pression de 250 Pa nécessaire pour assurer l'étanchéité interne et externe à l'air, la baisse de pression éventuelle ne doit pas dépasser 25 Pa au bout d'une heure. En d'autres termes, la pression mesurée au bout d'une heure ne doit pas être inférieure à 225 Pa.

Si le choix se porte sur des systèmes de confinement ne relevant pas de ces 2 normes ISO, il est de la responsabilité de l'acquéreur de demander au fournisseur d'apporter la preuve que le dispositif présente des caractéristiques d'étanchéité identiques à celles demandées par la norme ISO 10648-1 en effectuant les mesures selon les prescriptions de l'ISO 10648-2.

De même, lors de l'utilisation de dispositifs spécifiques, plus particulièrement en animalerie, associant un dispositif s'apparentant à un isolateur avec un Poste de Sécurité Microbiologique, il est de la

responsabilité de l'acquéreur d'exiger de son ou ses fournisseurs d'apporter la preuve du bon confinement du risque de leur(s) dispositif(s) par le test d'étanchéité tel que décrit dans la norme ISO 10648-2 pour la partie s'apparentant à un isolateur et un test de protection du personnel tel que décrit dans l'annexe C de la norme NF EN 12469 pour la partie Poste de Sécurité Microbiologique.

Remarque : l'appellation boîte à gants concerne un équipement non destiné à la protection du risque biologique, même si le PSM Type III est noté ainsi dans le manuel de l'OMS 3^{ème} édition.

5.2.3. Les centrifugeuses

Qu'elles soient mini, de paillasse ou ultra les centrifugeuses et les opérations techniques qui y sont associées sont génératrices de risque d'exposition accidentelle à des aérosols infectieux et/ou toxiques ainsi qu'à des contaminations par contact.

Tableau 5.4 : Classification des enceintes de confinement selon leur taux de fuite horaire (d'après la norme ISO 10648-2)

Classe	Taux de fuite horaire T_h^{-1}	Exemple
1*	$\leq 5 \times 10^{-4}$	Enceinte de confinement à atmosphère contrôlée sous gaz inerte
2*	$< 2,5 \times 10^{-3}$	Enceinte de confinement à atmosphère contrôlée sous gaz inerte ou à atmosphère dangereuse en permanence
3	$< 10^{-2}$	Enceinte de confinement à atmosphère dangereuse en permanence
4	$< 10^{-1}$	Enceinte de confinement à atmosphère pouvant être dangereuse

* Pour une application donnée, il revient au concepteur, à l'utilisateur et aux autorités de sûreté de décider si l'enceinte doit être de classe d'étanchéité 1 ou 2. On choisit généralement la classe 1 pour des raisons techniques, lorsqu'il est nécessaire d'utiliser des gaz très purs.

Pour la manipulation d'agents biologiques pathogènes ou pouvant s'avérer dangereux les isolateurs de classe 4 s'avèrent suffisants. Leur étanchéité à l'air est mesurée par un taux de fuite horaire T_h^{-1} inférieur à 10^{-1} .

La Directive européenne 2006/42/CE complétée par la norme NF EN 12547 impose à tous les types de centrifugeuses 3 types distincts de sécurité active :

- l'impossibilité d'avoir un accès direct aux pièces en rotation pendant le fonctionnement de la centrifugeuse ;
- l'imposition d'une temporisation de quelques secondes empêchant l'ouverture de la centrifugeuse après son arrêt ;
- l'équipement, plus particulièrement des centrifugeuses de paillasse, d'un système « anti-balourd » qui vise à contrebalancer les erreurs légères qui peuvent apparaître dans l'équilibrage des godets de centrifugation.

Ces dispositifs doivent faire l'objet d'un contrôle annuel pour les centrifugeuses qui possèdent au moins une des 2 caractéristiques suivantes :

- avoir un diamètre interne de cuve supérieur ou égal à 40 cm ;
- posséder une énergie cinétique de rotation supérieure ou égale à 1500 Joules.

A ces contrôles, peut s'ajouter la vérification de l'intégrité des axes porteurs des nacelles en cas de centrifugation répétée de produits hautement corrosifs.

Par ailleurs, les opérations de centrifugation dans les laboratoires de confinement de niveau 2, 3, et 4 doivent se faire en utilisant des nacelles ou des rotors hermétiques.

Les opérations techniques associées (remplissage des tubes, équilibrage, élimination des surnageants, remise en solution des culots par exemple) doivent être réalisées sous Poste de Sécurité Microbiologique (Figure 5.13).

5.2.3.1. Cas particulier des ultra-centrifugeuses

Les normes NF EN 12884 et NF EN 12547 énoncent des exigences spécifiques aux ultra centrifugeuses. Qu'il s'agisse d'un achat de novo ou d'un renouvellement, le fabricant doit fournir à l'acheteur la **liste exhaustive** des rotors, y compris de la concurrence, qui peuvent être adaptés à son matériel.

5.3. Les équipements de protection individuelle

Les équipements de protection individuelle (EPI) sont des dispositifs ou des moyens destinés à être portés ou tenus par une personne en vue de la protéger contre un ou plusieurs risques susceptibles de menacer sa santé ou sa sécurité (article R.4311-8 du Code du travail). En fonction de l'évaluation des risques, ils viennent en complément des EPC.

Pour se prémunir du risque biologique, les EPI doivent protéger les parties suivantes :

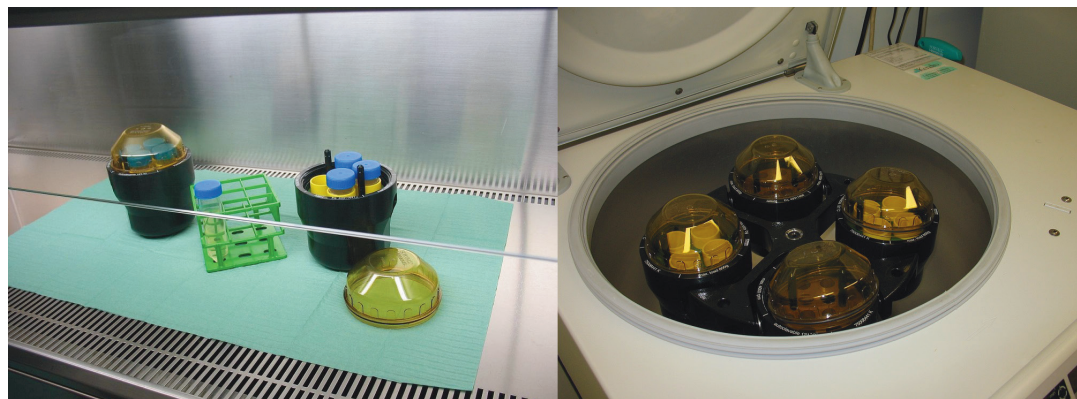


Figure 5.13 : Godets étanches sous PSM et en centrifugeuse