

But

- Décrire les méthodes de travail en isolateur semi-rigide avec souris axéniques à l'animalerie du CRCHU de Québec – Université Laval.

Généralités

- Les techniciens et techniciennes de l'animalerie qui travailleront avec les souris axéniques doivent préalablement suivre une formation pratique donnée par un technicien qualifié.
- Le concept de base pour le maintien d'une colonie de type axénique est la prévention de la contamination. Cette prévention se fait notamment par la stérilisation de tout le matériel à l'aide de la vapeur d'eau (autoclave), de l'irradiation, de la stérilisation de surface ou de la stérilisation au gaz.

Matériel

- Isolateur semi-rigide.
- Atomiseur électrique
- Contenant et petite vadrouille et/ou serviettes stériles.
- Bouteille à pulvérisateur manuel
- Stérilisant froid à base de dioxyde de chlore (Clidox ou Alcide).
- Alcool Isopropylique 60%
- Papier absorbant stérile.
- EPI (Jaquette jaune stérile, gant de nitrile, masque N95, bonnet et couvre chaussure)
- Lunettes de protection
- Masque à cartouche pour produit chimique (dioxyde de chlore)
- Gants de tissu stériles (pour manipulation à l'intérieur de l'isolateur en fonction)
- Cylindre de stérilisation
- Manchons flexibles de grandeur appropriée (12" ou 18")
- Collets d'étanchéités (12" ou 18")
- Contenant d'envoi d'animaux axéniques (Germfree Shipper)
- Pince longue

Formulaires ou PNF reliés à cette procédure

- FORM-CHU #005 Registre des activités quotidiennes
- CHU-ANI-10 : Réception d'animaux
- CHU-HEB-07 : Hébergement de souris axénique

- CHU-FON-11 : Mise en service d'un isolateur pour souris axéniques
- CHU-FON-12 : Stérilisation du matériel destiné aux colonies axéniques
- CHU-CQ-08 : Méthode de contrôle du statut axénique
- CHU-SST-05 : Utilisation du demi-masque pour les vapeurs de chlore

Définitions

- **Axénique** : Se dit d'un élevage ou d'un animal exempt de bactéries, virus, fungus ou parasites (à l'exception des virus endogènes). Ces animaux doivent être hébergés en conditions stériles complètes.
- **PAPR** : powered air-purifying respirator ou respirateur à abduction d'air filtrée

Responsabilités

- Toute personne (TSA) travaillant avec les isolateurs permettant l'hébergement de souris axéniques doit respecter cette procédure et communiquer avec l'assistant-chef de dérivation pour toute question.

Consignes

I. Généralités.

- 1- Vérifier le cadran de pression de l'isolateur à chaque début de journée pour s'assurer de la pression positive et de sa valeur (indice du niveau d'obstruction des filtres HEPA). Le cadran de pression de l'isolateur doit indiquer 0.1 pouce d'eau.
- 2- Effectuer un contrôle visuel de l'état de la façade et des gants avant chaque manipulation. La présence de trous doit être recherchée. Documenter tout problème observé dans le « Registre des activités quotidiennes » et corriger sur le champ par l'application d'une pâte d'uréthane ou le remplacement du gant perforé.
- 3- Utiliser un atomiseur et un stérilisant froid à base de dioxyde de chlore (Clidox) avec un temps de contact de 5 heures pour toute entrée de matériel par le sas.
- 4- Protéger les gants de l'isolateur contre la perforation en portant une paire de gants stériles en tissu par-dessus les gants de caoutchouc.
- 5- Manipuler les souris en utilisant les pinces appropriées lorsque possible.
- 6- Privilégier le PAPR lors de l'utilisation du stérilisant (Clidox) à l'extérieur de l'isolateur. Sinon, porter des lunettes de sécurité + un demi-masque (Voir la procédure SST-05).

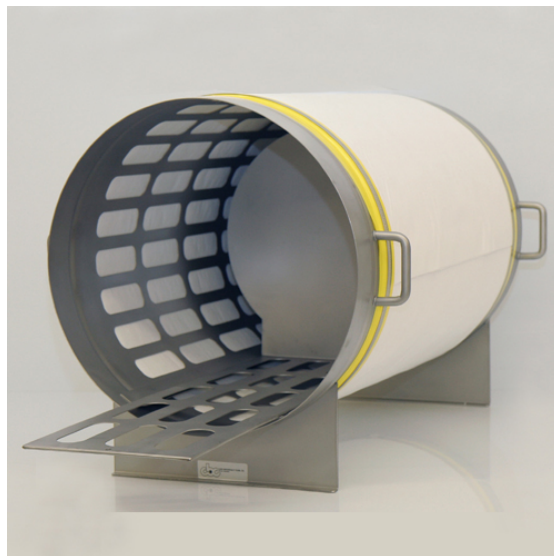
II. Entrée de matériel dans l'isolateur à l'aide du sas.

- 1- S'assurer que le matériel a été stérilisé (stérilisation de surface, à l'autoclave, au gaz, par irradiation ou par filtration 0.22um) avant son entrée dans l'isolateur et que les emballages sous vide n'ont aucun trou.

- 2- Vérifier que la porte intérieure de l'isolateur est bien fermée.
- 3- Ouvrir la porte extérieure du sas et à l'aide d'une serviette stérile, essuyer le surplus de stérilisant de la dernière entrée si applicable et à l'aide d'une serviette stérile, badigeonner de stérilisant (Clidox) toutes les parois intérieures du sas, incluant les portes et 3 pouces du tour extérieur du sas.
- 4- Vaporiser toutes les surfaces extérieures du matériel à entrer ou préférablement, immerger dans le stérilisant, avant de mettre dans le sas. Pour le matériel stérilisé à l'oxyde d'éthylène, retirer le premier emballage et mettre dans le sas.
- 5- Fermer la porte extérieure du sas, retirer les bouchons et les faire tremper dans le stérilisant (Clidox).
- 6- À l'aide d'un atomiseur électrique, vaporiser par le trou afin qu'une fine bruine se disperse dans le sas (minimum de 30 secondes). Mettre le premier bouchon et vaporiser encore 30 secondes
- 7- Prendre le second bouchon couvert de stérilisant (Clidox) et le remettre rapidement dans la porte aussitôt l'atomiseur retiré.
- 8- Laisser agir 5 heures. L'utilisation d'une minuterie est obligatoire et il est fortement recommandé d'inscrire le temps de début et de fin du temps de contact sur la porte du sas.
- 9- Avant d'ouvrir la porte intérieure de l'isolateur, s'assurer que la porte extérieure du sas est bien verrouillée et que le temps de contact a été respecté.
- 10- Ouvrir la porte intérieure de l'isolateur et entrer le matériel dans l'isolateur.

III. Entrée de matériel dans l'isolateur à l'aide du cylindre de stérilisation.

- 1- Prendre le manchon flexible approprié (12"x12" ou 12"x18"), s'assurer qu'il ne présente aucun trou et le faire tremper dans le stérilisant froid ou à l'aide d'une serviette stérile étendre du stérilisant froid sur toutes les surfaces du manchon. Faire tremper les bouchons de Néoprène, dans le stérilisant froid (Clidox).
- 2- Inspecter le cylindre de stérilisation pour s'assurer que la membrane filtre et la pellicule Mylar ne présente aucun trou et que le ruban autocollant les fixant est bien disposé. Porter une attention particulière à la jonction du pourtour du cylindre et de la pellicule Mylar.
- 3- S'assurer que le ruban test confirmant la stérilisation est présent sur la membrane filtre à l'extérieur du cylindre. Si l'indicateur ne confirme pas que la bonne température de la stérilisation et le temps requis est atteint, retourner le cylindre à la stérilisation pour qu'il soit stérilisé de nouveau. (Attention : si le cylindre contient de la nourriture, cette dernière devra être changée pour de la



nouvelle afin de respecter les exigences nutritionnelles.)

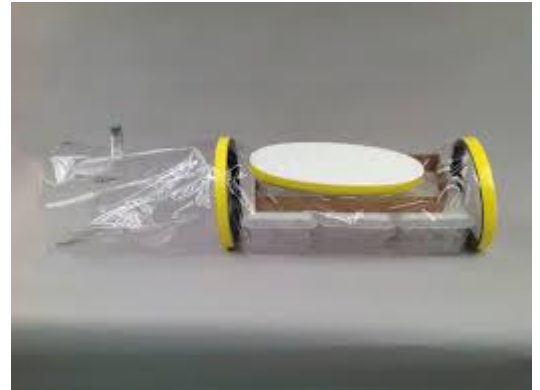
- 4- S'assurer que la porte intérieure de l'isolateur est bien fermée.
- 5- Ouvrir la porte extérieure du sas, essuyer le surplus de stérilisant de la dernière entrée si applicable et installer le port 12", si requis.
- 6- Badigeonner de stérilisant l'intérieur du sas et l'intérieur du port ainsi que 3" de la bande extérieure du port.
- 7- Fixer le manchon sur le port à l'aide d'un collet d'étanchéité. S'assurer que le manchon recouvre d'au moins 2" la bande extérieure du port.
- 8- Badigeonner la membrane Mylar ainsi qu'une bande de 3" du cylindre de stérilisation et fixer le manchon au cylindre de stérilisation à l'aide d'un collet d'étanchéité. S'assurer que le manchon recouvre d'au moins 2" la paroi extérieure du cylindre de stérilisation.
- 9- Aligner parfaitement le port, le manchon et le cylindre.
- 11- À l'aide d'un atomiseur, vaporiser par un trou du manchon pour qu'une fine bruine se disperse à l'intérieur (minimum de 30 secondes). Mettre le premier bouchon et vaporiser encore 30 secondes.
- 12- Prendre le second bouchon couvert de désinfectant et le mettre rapidement en place sur le manchon aussitôt l'atomiseur retiré, afin de maintenir la pression positive.
- 13- Laisser agir 5 heures. L'utilisation d'une minuterie est obligatoire et il est fortement recommandé d'inscrire le temps de début et de fin du temps de contact sur le manchon.
- 14- Avant d'ouvrir la porte intérieure de l'isolateur, s'assurer que la pression dans le manchon est encore présente et que le temps de contact a été respecté.
- 15- Ouvrir la porte intérieure de l'isolateur et approcher le cylindre du sas. Attention de ne pas pincer les parois du manchon.
- 16- À l'aide d'une longue pince, briser la membrane Mylar, attraper la corde du filet contenant le matériel stérile et tirer afin d'approcher le matériel pour qu'il soit à portée de main. Éviter de déchirer le bas de la membrane Mylar, pour que le surplus de stérilisant n'entre pas dans le cylindre de stérilisation et humidifie la membrane filtrante.
- 17- Vider le cylindre de son contenu jusqu'à atteindre le sac test contenant l'indicateur de stérilisation. Ce sac est marqué d'un « X ». Voir la procédure FON-12 « Stérilisation du matériel destiné aux colonies axéniques ».
- 18- Ouvrir le sac test et rechercher le témoin indicateur de stérilisation placé en son centre.
- 19- Si le témoin ne confirme pas la stérilisation (température et durée atteintes), refermer le sac, retourner tout le contenu déjà sorti du cylindre dans le sas et refermer la porte intérieure de l'isolateur. La stérilité de l'isolateur risque d'avoir été compromise. Désinfecter toute surface ayant pu être en contact avec le contenu du cylindre et procéder à un contrôle de stérilité par des frottis recommandés dans la PNF CQ-8.
- 20- Si le témoin confirme la stérilisation, refermer le sac et continuer de vider le cylindre. Si le sac contient un test biologique (ampoule « verify ») mettre

l'ampoule dans le sas avant de refermer la porte intérieure de l'isolateur et de déconnecter le cylindre.

- 21- Incuber l'ampoule à 37°C pour une période de 48 heures avant de pouvoir utiliser le matériel fraîchement entré.

IV. Transport de souris à statut axénique.

- 1- L'utilisation d'un contenant d'envoi d'animaux axéniques « Germfree Shipper », est le moyen le plus sécuritaire pour transporter des souris à statut axénique, que ce soit entre établissements ayant des colonies axéniques ou entre salles d'hébergement dans un même établissement.



V. Entrée d'animaux dans l'isolateur.

- 1- Seuls les animaux axéniques provenant d'un fournisseur approuvé (ex : Taconic) ou provenant d'un service de dérivation axénique sont autorisés à entrer dans les isolateurs pour colonies axéniques.
- 2- L'arrivée de souris se fait à l'aide d'un « Germfree Shipper » fourni par l'expéditeur.
- 3- À sa réception, **ne pas vaporiser la boîte contenant le « Germfree Shipper », cela pourrait humidifier le filtre HEPA et contaminer l'intérieur du « Germfree Shipper »!** Passer seulement une lingette d'Oxivir sur l'extérieur de la boîte contenant le « Germfree Shipper ». La boîte est ensuite dirigée vers le secteur où sont hébergés les isolateurs.
- 4- Une fois dans la salle d'hébergement, sortir le « Germfree Shipper » de la boîte de transport, l'inspecter pour vérifier la présence de trou. Tout problème observé doit être documenté dans le « Registre des activités quotidiennes » et corrigé sur le champ par l'application d'une pellicule autocollante.
- 5- Ouvrir la porte extérieure du sas, essuyer le surplus de désinfectant de la dernière entrée si applicable. Badigeonner de désinfectant l'intérieur du sas et l'intérieur du port 12" ainsi que 3" de la bande extérieure du Port 12".
- 6- Badigeonner l'intérieur de la partie non-stérile formant un manchon du « Germfree Shipper » ainsi que la membrane Mylar donnant accès aux animaux et installer le manchon du « Germfree Shipper » sur le port 12" de l'isolateur.
- 7- Insérer l'embout de l'atomiseur entre le port et le manchon, vaporiser pour qu'une fine bruine se disperse à l'intérieur et bombe légèrement la paroi du manchon (minimum de 60 secondes).
- 8- Retirer rapidement l'atomiseur et fixer hermétiquement le manchon à l'aide d'un collet d'étanchéité.
- 9- Aligner parfaitement le port, le « Germfree Shipper » et son manchon.

- 10- Laisser agir 5 heures. L'utilisation d'une minuterie est obligatoire et il est fortement recommandé d'inscrire le temps de début et de fin du temps de contact sur le manchon.
- 11- Avant d'ouvrir la porte intérieure de l'isolateur, s'assurer que la pression dans le manchon est encore présente et que le temps de contact a été respecté.
- 12- Ouvrir la porte intérieure de l'isolateur et approcher le « Germfree Shipper » du sas. Attention de ne pas pincer les parois du manchon. Retirer le ruban adhésif qui maintient le disque Mylar en place et mettre le disque à plat pour permettre le passage des boîtes contenant les animaux.
- 13- Entrer les boîtes contenant les animaux à l'intérieur du sas et procéder à la réception selon la procédure ANI-10 « Réception d'animaux ».
- 14- Effectuer un frottis sur les cages de transport des animaux pour vérifier leur statut de santé.
- 15- Retourner les boîtes de transport dans le sas et/ou le « Germfree Shipper » selon les besoins ainsi que l'échantillon récolté. Refermer la porte intérieure de l'isolateur.
- 16- Le « Germfree Shipper » est déconnecté, nettoyé et stérilisé afin de pouvoir servir à un export ou un transfert d'animaux entre isolateurs. Refermer la porte extérieure de l'isolateur.

VI. Sortie d'animaux de l'isolateur.

- 1- Utiliser le « Germfree Shipper » afin de maintenir le statut axénique des animaux lorsqu'ils sont destinés à l'export ou à l'hébergement en isolateur dans une autre pièce.
- 2- Le transfert d'animaux entre isolateurs de la même pièce peut se faire lorsque la configuration de la salle et certaines conditions le permettent, en utilisant un manchon flexible et les ports 12" des deux isolateurs impliqués.
- 3- La sortie d'animaux pour utilisation terminale, en récolte de tissus ou autre, peut se faire dans une boîte de transport stérile, préalablement entrée par le cylindre de stérilisation et vaporisée avant d'être entrée sous enceinte de sécurité biologique correctement désinfectée.
- 4- Les animaux sortant d'un isolateur ne doivent pas retourner en isolateur à moins que toutes les manipulations se soient déroulées à l'intérieur d'un autre isolateur et que les transferts d'un isolateur à l'autre se soient faits correctement.

VII. Maintenance d'un isolateur.

- 1- Utiliser l'alcool isopropylique à 60% pour rincer la façade, les manchons et autre pièce d'équipement pouvant être endommagé par l'usage intensif du stérilisant froid (Clidox)
- 2- Changer les filtres lorsque le cadran indique une augmentation de 0.05 « Pouce d'eau ». Donc à 0.15 « Pouce d'eau ». Le changement de filtre doit s'effectuer une fois l'isolateur vide.
- 3- Réparer les façades dès qu'un trou est localisé en appliquant une pâte

d'uréthane. Documenter l'évènement et procéder à un contrôle de stérilité par les frottis recommandés dans la PNF CQ-08 « Méthode de contrôle du statut axénique ».

- 4- Effectuer le remplacement de la façade souple de l'isolateur lorsque l'isolateur est vide.
- 5- Il est possible de changer les gants de caoutchouc de la façade en tout temps. Pour se faire il faut : (Vidéo disponible sur le site Park Bioservices)
 - A) Extérioriser le manchon et le gant concernés.
 - B) Tourner le manchon sur lui-même plusieurs fois en son centre afin qu'aucun échange d'air ne soit possible et appliquer plusieurs tours de ruban adhésif sur la zone tordue.
 - C) Verser du stérilisant froid préalablement entré de façon stérile et reconstitué dans la même journée et s'assurer qu'il traverse jusqu'au gant.
 - D) Retirer le vieux ruban adhésif du vieux gant ainsi que les anneaux élastiques qui font l'étanchéité. Retirer le vieux gant et le coffre qui maintien le gant et le manchon ensemble.
 - E) Faire tremper le coffre, le nouveau gant et les 3 anneaux élastiques pour 45 minutes avant de les réinstaller.
 - F) Localiser l'emplacement du pouce afin de faciliter le travail et le confort par la suite.
 - G) Installer le gant sur le coffre en laissant dépasser le gant de quelques centimètres.
 - H) Installer le coffre à l'intérieur du manchon, le tout fraîchement vaporisé de désinfectant.
 - I) Replier le gant sur le manchon et remettre en place les 3 anneaux élastiques.
 - J) Assécher avec de l'alcool 60% et couvrir de 6 tours de ruban adhésif neuf. Deux tours sur le premier anneau, un tour sur le deuxième, deux tours sur le troisième et encore un tour sur le deuxième.
 - K) Laisser agir le désinfectant 5 heures et retirer le ruban adhésif du centre du manchon. Le manchon peut maintenant reprendre sa position initiale. Si nécessaire essuyer le surplus de Clidox à l'aide d'une serviette stérile déjà présente dans l'isolateur.

Références

- *Park BioServices, « Online Training Site and Germfree Workshops ».*
- *Taconic Biosciences "Flexible Film Isolator Demo"*
- *Taconic Biosciences "Semi-Rigid Isolator Demo"*
- *Livre "Gnotobiotic Mouse Technology an illustrated guide"*

	<u>Modifications apportées</u>
Version 2 26 juin 2023	• Ajout des procédures : - o CHU-ANI-10 : Réception d'animaux - o CHU-HEB-07 : Hébergement de souris axénique - o CHU-SST-05 : Utilisation du demi-masque pour les vapeurs de chlore • Ajout de la définition de PAPR