**Responsable scientifique (RS) : Rémy FROISSART** 06 38 02 45 90 ou 04 67 41 63 72

e-mail : remy.froissart@cnrs.fr

**Assistant de prévention (APSS) : Déborah GARCIA** 04 67 41 64 61

e-mail : deborah.garcia@ird.fr

# OBJET

Cette instruction précise les règles à connaître et respecter par tous pour maintenir le L2 bactériologie propre, ordonné et sans risque pour les utilisateurs-trices et pour l'environnement. Elle sera distribuée à toute nouvelle personne utilisatrice du laboratoire, qui devra la lire et la signer avant de commencer à travailler.

# ASPECTS REGLEMENTAIRES

Le laboratoire L2 bactériologie (L2B) est une structure conçue et équipée de manière à manipuler des bactéries de niveau de sécurité 1 et 2 (y compris OGM); c'est-à-dire des bactéries potentiellement pathogènes pour les humains, dont il existe une prophylaxie ou traitement efficace (décret N° 2008-244, article R4421.3). Le L2B est placé sous la responsabilité du délégué régional de l’IRD.

Le L2B est géré par le responsable scientifique (RS ; Rémy Froissart), et par un agent de prévention en hygiène et sécurité (APSS ; Déborah Garcia). Ces personnes ont pour rôle la veille sur l’organisation et le bon fonctionnement du L2B ainsi que la mise à jour du règlement. Elles étudieront toute nouvelle demande d’utilisation du L2B, vérifieront et valideront les procédures. Le RS, l'APSS ainsi que le directeur de l’unité MIVEGEC (Frédéric Simard) et la responsable hygiène et sécurité du centre IRD (Sabrina Desserme) forment le comité du L2B. Le comité du L2B peut être saisi par toute personne utilisatrice du L2B ou s'auto-saisir pour se réunir en cas de dysfonctionnement sérieux dans le laboratoire, et prendre les mesures nécessaires en cas de danger personnel ou d’autrui.

# AUTORISATIONS

1. **Demande d’accès pour un nouvel manipulateur :**

L’accès est limité aux personnes autorisées. Les personnes souhaitant utiliser le L2B sont priées de prendre contact avec le RS ou l’APSS. L’autorisation d’accès est obtenue après avoir lu la procédure, signé (Annexe 3), remis une copie à l’APSS du L2B, obtenu les signatures des responsables (laboratoire, unité et centre) et suivi une formation au fonctionnement par l’APSS du L2B. La liste des personnes autorisées est affichée sur la porte et contre-signée par le RS ou l'APSS.

1. **Demande de manipulation d’une lignée bactérienne :**

Seules les espèces bactériennes inscrites dans un registre du L2B peuvent être manipulées dans le laboratoire. Le registre des espèces bactériennes est tenu par l'APSS et disponible dans le L2B à la fin du cahier de correspondance du laboratoire. Ainsi, avant démarrage d’un projet ou pour toute manipulation d’une nouvelle lignée bactérienne, le-la chef-e de projet se mettra en relation avec le RS de la salle et l’APSS. Les procédures seront étudiées et validées par les RS et l'APSS du L2B. L’APSS vérifiera le niveau de confinement nécessaire aux agents biologiques utilisés dans le projet. Vous devrez fournir tout document réglementaire relatif à votre isolat bactérien, tout ceci avant validation de votre projet par l'APSS ou le RS.

Dans le L2B on peut manipuler les agents suivants :

* Bactéries non OGM et non pathogènes (classée de niveau 1)
* Bactérie non OGM, de classement de niveau2.
* Bactéries OGM de niveau 1 ou 2\*.
* Bactéries provenant de prélèvements humains (classés minimum niveau 2)

*\*Attention : les bactéries OGM, utilisées pour le clonage (classiquement niveau 1), peuvent êtres surclassées selon le matériel génétique utilisé !*

En cas d’utilisation d’OGM, ils doivent être de niveau de sécurité de classe 2 au maximum et les manipulateurs doivent avoir fait une déclaration d’utilisation d’OGM (DUO), auprès du ministère de la recherche et de l’enseignement supérieur, et d’une demande d’agrément le cas échéant.

Le cas des bactéries sporulantes sera étudié avec un soin particulier d'éviter toute possibilité de contamination des stocks. La manipulation de champignons n’est pas autorisée.

Toute utilisation de matériel provenant de prélèvements humains nécessite une procédure de déclaration différente selon son origine : fournis par un autre laboratoire ou directement prélevés sur patient (voir avec l’APSS ou pôle H&S du centre).

*Cas particulier : intervention dans le L2B :* En cas de nécessité de réalisation de travaux dans le L2B, les intervenants extérieurs devront se mettre en relation avec l’APSS et le RS du L2B (si possible par e-mail).

# PROCEDURES D’URGENCE

En cas d’incendie : Appliquer la consigne (Annexe 1) affichée dans le L2B.

En cas d’accident : Appliquer la consigne (Annexe 2) affichée dans le L2B. Tout incident ou accident doit être reporté à l’APSS du L2B qui le transcrira sur le registre de sécurité et santé au travail.

En cas d'incident avec des agents biologiques, le-la responsable de cet incident devra immédiatement décontaminer les parties communes contaminées (à l'alcool 70 % ou Anios Quick) et prévenir rapidement par mail (L2B-618@ird.fr ) l'ensemble des utilisateurs-trices du L2B.

En cas de rupture de confinement (par exemple travaux dans la pièce ou nécessitant l’ouverture de la fenêtre, dysfonctionnement du système de ventilation) : toute activité sera interrompue jusqu’au rétablissement d’un fonctionnement normal.

# COMMUNICATION INTERNE

Toutes les personnes utilisatrices du L2B seront inscrites sur la liste mail L2B-618@ird.fr afin de communiquer facilement avec toutes les autres personnes utilisatrices du L2B.

Une réunion sera organisée durant la première semaine de janvier et de septembre afin de faire le point sur les procédures et les éventuelles solutions à apporter à tout dysfonctionnement mis en évidence par l'une ou l'autre. En cas de dysfonctionnement majeur, une réunion extraordinaire pourra être convoquée par toute personne utilisatrice du L2B à n'importe quel moment de l'année.

# PROCEDURE d’UTILISATION du L2B

**1- Circulation dans le L2B:**

\* OBLIGATOIRE (même pour une entrée-sortie rapide) suivre dans l'ordre la procédure :

**ENTREE**

1. Enlever sa blouse et la laisser sur le porte-manteau extérieur
2. Entrer dans la pièce et fermer la porte.
3. Poser le matériel apporté sur la desserte réservée à cet effet (à gauche de l'évier)
4. Mettre un masque chirurgical en cas de rhume
5. Attacher ses cheveux s’ils sont longs
6. Mettre des gants
7. Mettre la blouse (verte, jetable) spécifique au L2 accrochée au porte-manteau
8. Mettre des sur-chausses
9. désinfecter l'extérieur des gants à l'alcool 70°C

**SORTIE**

La dernière personne quittant le labo L2 (ou pouvant être la dernière à quitter le labo) vérifie :

1. fermer le PSM
2. arrêter le matériel autre que étuve (bain-marie…).
3. fermer les poubelles biologiques et réinstaller un nouveau sac si nécessaire

**AU NIVEAU DE LA ZONE PROPRE du L2B (près de la porte)**

1. Enlever la blouse jetable et la poser sur le porte-manteau
2. Enlever les surchaussures et les jeter dans la poubelle à risques biologiques
3. Enlever les gants et les jeter dans la poubelle à risques biologiques
4. passer une solution hydro-alcoolique sur les mains et les poignets.
5. Sortir et fermer la porte du laboratoire L2B
6. Se laver les mains et poignets avec du savon pendant au moins 30 sec.
7. Se sécher les mains avec du papier à usage unique que l’on jette après usage dans une poubelle jaune

\* Chaque personne utilisatrice du L2B utilisera l'une des trois blouses jetables disponibles sur le porte-manteau présentent derrière la porte d'entrée. Ces blouses seront jetées tous les premiers et troisièmes lundis de chaque mois (et chaque semaine en cas d'utilisation intensive du L2B).

\* Pour les utilisateurs-trices régulier-e-s, des chaussures personnalisées pourront être conservées à l'intérieur du L2B et ne doivent, en aucun cas, sortir du local. Les chaussures sont à la charge des équipes. Elles devront être régulièrement nettoyées et autoclavées par leur propriétaire (enfermer dans un sac rouge, identifier correctement, puis sortir pour autoclaver).

\* L'extérieur des bouteilles et du matériel entrant (ex.: milieux ou bouteilles, pipettes, microtubes, etc…) doit être nettoyé soigneusement à l'alcool 70% (avec brumisateur) ou Anios Quick. Évitez de respirer les aérosols. Les surfaces doivent être rincées convenablement à l'alcool et laisser sécher pendant au moins 30 secondes avant de placer de nouvelles affaires (propres) sur la surface de travail.

\* Il est interdit de rentrer des effets personnels dans le L2B (ex.: clefs, téléphone, stylo, cahier...).

\* Il est interdit de rentrer et sortir des papiers du L2B. Toutes les notes devront être prises sur l'ordinateur présent dans le labo afin de prendre des notes et imprimées à partir des ordinateurs personnels. Tout document entrant dans L2B doit être présent sous enveloppe plastifiée qui sera désinfecté à l'alcool 70 % (brumisateur) en entrant et en sortant.

 **2- Généralités :**

\* Tout dysfonctionnement ou incident doit être signalé par e-mail à l'ensemble des personnes utilisatrices du L2B via l'adresse L2B-618@ird.fr .

\* Penser à changer régulièrement de gants et les désinfecter avec de l'alcool 70 %.

\* Il est obligatoire de nettoyer **avant et après toute utilisation** les paillasses et PSM (Anios Quick).

\* Il est interdit de laisser traîner les boîtes de culture sur les paillasses du L2B. Elles doivent être rangées dans les étuves, le réfrigérateur (dans un sac avec mention de l'utilisateur-trice et la date) ou la poubelle pour être destinée à autoclavage.

\* Il est obligatoire d’utiliser des cônes avec filtre. Les boites de cônes sont individualisées : merci d'écrire votre nom et date sur chaque boite. Il est interdit de stocker les boites de cônes sur les paillasses.

\* Vérifier régulièrement vos milieux dans le réfrigérateur. Tout milieu contaminé doit être jeté après javellisation (minimum 10 % vol/vol d'une eau javellisée [fraiche et conservée à l'abri de la lumière] pendant plus de 20 min) dans le bidon prévu à cet effet. Penser à  signaler la présence de contamination par une note sur le réfrigérateur avec nom du milieu, date et nom de la personne concernée et l'adresse L2B-618@ird.fr .

\* En cas d'accident, suivre les recommandations affichées dans le L2B.

**3- Manipulation**

\* La centrifugation de matériel contaminé doit se faire en tubes fermés. En cas de contamination de la centrifugeuse, la personne utilisatrice devra immédiatement la désinfecter et notifier la contamination (dire la date, l'heure, l'espèce/génotype bactérien-ne) par e-mail sur la liste L2B-618@ird.fr.

\* L'ordinateur du L2B (si présent) doit être manipulé avec gants décontaminés extérieurement à l'alcool 70%. Mettre un film cellophane sur le clavier et le changer tous les premiers et troisièmes lundis de chaque mois.

\* Nettoyer le PSM avec de l’Anios Quick avant et après chaque utilisation. Par ailleurs, nettoyer complètement le PSM une fois par mois (voir la procédure de nettoyage du L2B). Tou-te-s les utilisateurs-trices régulier-e-s (i.e. utilisant le PSM au moins une fois par semaine) seront mis à contribution pour le nettoyage mensuel du PSM par une liste établie une fois par semestre en réunion et affichée sur le PSM.

\* En dehors des moments où il y a manipulation, rien ne doit rester sous le PSM et celle-ci doit être propre (sans marque d'éclaboussure ni sur la paillasse du PSM ni sur les vitres ni sur les parois). Si une personne voit une tache, elle est priée de la nettoyer, même si elle n'en est pas la responsable.

\* Les parties extérieures des pipettes doivent être systématiquement décontaminées sous PSM à l’Anios Quick avant et après toute utilisation. Elles sont rangées de manière verticale sur un portoir sur la paillasse à gauche PSM.

\* Les portoirs doivent systématiquement être désinfectés au spray Anios, durant 15 minutes (minimum). Si le portoir est particulièrement souillé, il faut le placer dans un bain de javel pour une durée de 24h.

**4- Gestion des déchets :**

 Les objets piquants ou tranchants doivent être mis dans des petites boîtes Septopack (plastique jaune) qui une fois pleines sont jetées dans des sacs rouge. Les pipettes sont mises dans les sacs incolores. Gants, tubes, pointes, papiers souillés, boîtes de culture, sont jetés dans les sacs rouge. Respecter la limite de remplissage des sacs. Une fois remplis, les sacs rouges et les sacs incolores doivent être autoclavés puis enfermés dans les Septopacks (grande boîte en plastique jaune) et descendus dans la soute à DASRI (clef en 625).

Lors de la manipulation sous PSM, les cônes usagés doivent être déposés dans un sac préparé à cet effet. Une fois la manipulation finie, le sac sera fermé hermétiquement et mis dans la poubelle en plastique rigide jaune pour autoclavage.

\* Chaque utilisateur-trice est prié-e de fermer les poubelles dès qu'elles sont pleines et de les autoclaver et de les descendre en soute. Ces déchets sont par la suite récupérés et incinérés par une société spécialisée.

\* Les déchets liquides (milieux de culture) doivent être désactivé durant au moins 24h avec 10% (vol/vol) de javel liquide, puis transféré dans un bidon adapté, qui sera récupéré et incinéré par une société spécialisée. La javel liquide « stock » sera préalablement préparée (pastilles soluble) dans une bouteille en verre. Dans le détail : placer une pastille dans la bouteille « javel stock » avec le volume d’eau adapté pour avoir une solution 100% (cf emballage pour le volume/pastille). Puis placer la bouteille (avec le papier aluminium) dans le placard adapté car la javel se conserve à l’abri de la lumière. Pour désactiver vos déchets liquides ; placer l’équivalent d’un volume de 10% de javel stock par rapport au volume de liquide, laisser agir 24h (laisser votre contenant dans l’évier), puis jeter le liquide dans le bidon « déchet liquide halogéné » qui se trouve sous l’évier.

N’oubliez pas de faire un lavage à la javel diluée à 10% avec de l’eau du robinet, puis un rinçage a l’eau de votre contenant.

\* Aucun tissu à risque infectieux ni matériel contaminé ne doit sortir du L2B sans protection particulière (boite en polypropylène).

Chaque personne travaillant dans le L2B devra suivre une formation assurée par l’assistant de prévention ou le responsable du L2. Tout utilisateur du labo L2 bactériologie sera ajouté au planning de ménage.

# PROCEDURE de NETTOYAGE du L2B

La société de nettoyage n’étant pas habilité à entrer dans ce laboratoire, le ménage est donc à la charge des utilisateurs-trices, selon un planning établi en réunion semestrielle. Le ménage sera effectué en l’absence d’utilisateurs (de préférence le vendredi entre midi et 14h).

Il s’agit :

\* De désinfecter toutes les surfaces des paillasses mais aussi les poignées des réfrigérateur, congélateurs, porte, téléphone avec un agent approprié (Anios Quick en spray).

\* Les portoirs doivent être désinfectés dans un bain de javel, du temps de la durée du ménage du laboratoire.

\* De désinfecter le PSM, l’intérieur de l’étuve et de l’agitateur incubateur en suivant la procédure suivante :

* (i) nettoyer avec du papier absorbant humidifié à l'eau,
* (ii) papier absorbant humidifié avec de la javel (2,6 % final),
* (iii) laisser agir 20 min,
* (iv) rincer avec un papier absorbant humidifié à l'eau,
* (v) sécher avec un papier absorbant sec et enfin
* (vi) nettoyer avec un papier absorbant humidifié avec de l'Anios Quick et laisser sécher.

\* De passer le balai et laver le sol avec du papier humidifié à la javel. Laisser agir 20 min. Rincer à l'eau.

Un tri devra être réalisé 2 fois par an, qui consistera à trier le contenu du réfrigérateur et du congélateur, dégivrer le congélateur. La totalité des utilisateurs-trices devront participer. Tout matériel sans nom ni date sera détruit, et ce, quelque soit la période de l'année.

Merci de suivre ces règles de base et de former et encadrer correctement vos étudiants.

Toutes les remarques constructives pour le bien être et la bonne humeur de tous sont les bienvenues.

Merci pour votre savoir vivre, votre compréhension et votre responsabilité.

*Annexe 1*

**Plan d’urgence : Incendie –coupure électricité – rupture de confinement – incident matériel**

**1 : Contamination matérielle : poste de travail – matériel – sol.**

En cas de renversement d’une solution contenant des agents bactériens :

* Couvrir le liquide avec un **papier absorbant** qui sera ensuite jeté dans une poubelle jaune (à autoclaver). Ensuite, nettoyer avec un papier absorbant humidifié à la **javel** (idem sous PSM, sans oublier de nettoyer à l'eau après puis Anios-Quick). Laisser agir 20 minutes.
* Jeter le papier absorbant dans les **sacs autoclavables** (rouges)
* **Nettoyer** avec un détergent ; de l’extérieur vers le centre de la zone contaminée.
* Si grande quantité de liquide renversé : Procéder à un nettoyage complet, pour le PSM : laisser 1 heure de fonctionnement à vide (élimination des aérosols).
* Prévenir un responsable L2B  (RS ou APSS).

**2 : En cas de coupure électrique :**

* **Interrompre** la manipulation en cours. Assurer le confinement des agents bactériens.
* **Sortir** calmement du L2B.

Prévenir un responsable du L2B (RS ou APSS).

**3 : En cas de rupture de confinement :**

Il est essentiel d’éviter la dispersion d’agents bactériens dans les zones non protégées (Couloirs…).

La **rupture de confinement** peut se produire en cas **d’intervention extérieure sur matériel** (maintenance), ou **incident sur le système de filtration** de l’air, ou **ouverture fenêtre**…**Dans tous les cas, les activités dans le L2B seront suspendues, jusqu’à retour à la normale.**

Si vous notez un quelconque **problème de fonctionnement** dans le L2B, **contactez rapidement le RS ou APSS du L2B.**

**4 : Déclenchement alarme incendie : Evacuation d’urgence.**

Concerne un départ de feu, ou autre incident nécessitant une évacuation d’urgence.

* **Interrompre rapidement** la manipulation. Assurer si possible le confinement des agents bactériens (fermer le PSM).
* **Evacuer, immédiatement** les lieux : laisser les EPI\* dans le L2B. *\*EPI : Equipement de Protection Individuel (blouse – gants…)*
* **Suivre le cheminement par les escaliers** (plan d’évacuation ou instructions du serre-file), atteindre la sortie la plus proche.

**Zone de regroupement** : Parking devant les serres.

**5 : Départ de feu dans le L2B :**

* Si maîtrisable : **Activer l’alarme** et prendre l’**extincteur** (couloir). Appeler les **pompiers** **(18)** et **l’accueil (61 00).**
* Si pas maîtrisable : **Activer l’alarme – appel pompier et accueil.**

 **Evacuer** (Laisser les EPI dans le L2B), et **fermer la porte.**

*Annexe 2 :* **Procédure d’urgence en cas d’accident corporel**

**I : Accident (ou incident) sans urgence :**

1. **Projection dans œil et sur la peau saine:**
* Projection dans l’œil : Laver les yeux à l’eau courante (ou rince-œil si présent) 15 min.
* Projection sur la peau saine: Désinfecter la zone concernée (Dakin- éthanol…).

→ C**onsulter le médecin de prévention,** immédiatement pour la projection oculaire**,** dans les 24h pour la projection sur la peau,si apparition de symptômes associés**.** Le médecin de prévention mettra en placeune **déclaration d’accident du travail.**

1. **Blessures avec contact sanguin :**

**Laver avec de l’eau et désinfecter immédiatement avec du Dakin présent dans la trousse de secours** et consulter, le plus rapidement possible, le médecin de prévention qui **mettra en place une déclaration d’accident du travail, avec une mention « exposant au sang »**

1. **Malaises légers (nausées – vertiges…) :**

Rendez-vous au service médical, *si besoin appeler un collègue.*

***De manière générale : Tous les incidents devront être transmis à l’AP du L2B, et mentionnés sur le registre SST.***

**Médecin de prévention : Mr BRIGAUD Thierry. Poste 61 21.** Thierry.brigaud@ird.fr

**II : Accident nécessitant une intervention d’urgence :**

**Malaises avec perte de connaissance (cardiaques – respiratoires), blessures corporelles immobilisant la victime.**

**1 : Appeler au secours :** un collègue SST (Secouriste) peut prendre le relais.

**2 : Appeler le SAMU (15) ou les pompiers (18)**; raccrochez toujours en dernier.

**3 : Appeler l’accueil (61 00) :**

* relaiera l’information au pôle H&S : prise en charge de l’accueil des secours.
* Liste des SST, et des défibrillateurs du centre.

**4 : Si possible (et seulement) : sortir la victime du L2B.**

**5 : Mettre en sécurité le matériel biologique et chimique en cours.**

***NB : S’il y a un risque biologique ou chimique associé, le SAMU ne rentrera pas !***

**6 : prévenir l’APSS du L2B dès que possible**

*Annexe 3*

# Engagement au respect du règlement du L2B :

Je m’engage à respecter ces règles pour ma sécurité, celle de mon entourage et pour le bon fonctionnement du laboratoire ainsi que l’intégrité du matériel contenu.

Nom, Prénom et email :

Statut (étudiant, stage, personnel…) :

Encadrant si stagiaire ou visiteur : Unité :

Personne qui a réalisé la formation du nouvel arrivant pour l’utilisation du L2 bacterio :

Dates  de stage (le cas échéant) : du au

Date et signature du stagiaire et de l’encadrant (le cas échéant):

Document à remettre l’APSS du L2B.