République Française

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche

DIRECTION GENERALE DE L'ENSEIGNEMENT ET DE LA RECHERCHE

1, Ter avenue de Lowendal 75349 PARIS 07 SP

Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche **S/Direction de l'Administration de la Communauté Educative** **1 Ter, avenue de Lowendal** **75349 PARIS 07 SP** **Dossier suivi par Mme ASSENS** **Tél. 01.49.55.52.26**	**Direction des Exploitations de la Politique Sociale et de l'Emploi** **S/Direction du Travail et de l'Emploi** **78, rue de Varenne** **75349 PARIS 07 SP** **Dossier suivi par Mme COLLET** **Tél. 01.49.55.46.52**

DATE : 04 DECEMBRE 1998

NOTE DE SERVICE DGER/SDACE/N98-2121
DEPSE/SDTE/N98-7045

OBJET : Règles d'hygiène et de sécurité applicables pour l'enseignement de la microbiologie dans les établissements publics et privés d'enseignement agricole préparant au brevet d'études professionnelles agricole, au baccalauréat professionnel, au brevet de technicien agricole, au baccalauréat technologique et au brevet de technicien supérieur agricole.

DATE DE MISE EN APPLICATION : immédiate

PLAN DE DIFFUSION :

- Directions Régionales de l'Agriculture et de la Forêt (SRFD et SRITEPSA)
- Directions Départementales de l'Agriculture et de la Forêt (SDITEPSA)
- Directions de l'Agriculture et de la Forêt des DOM
- Coordination des Inspections de l'Enseignement Agricole
- Etablissements Publics Nationaux et Locaux d'Enseignement Agricole
- Organisations Fédératives de l'Enseignement Privé Agricole

POUR INFORMATION :

- Organisations syndicales de l'enseignement agricole public
- Fédérations d'associations de parents d'élèves de l'enseignement public agricole.

.../...

Références :

*Réglementaires :

Directive CEE-90/679 du 26 novembre 1990 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail.

Directive CEE 93/88 du 12 Octobre 1993 concernant la liste des agents biologiques pathogènes.

Décret 94/352 du 4 Mai 1994 (J.O. du 6 mai 1994) : risques biologiques (intégré au livre II - section VI du code du travail).

Arrêté du 18 Juillet 1994 (J.O. du 30.7.94) : modifié par les arrêtés interministériels du 17 avril 1997 (JO du 26.4.97) et du 30 juin 1998 (J.O. du 22.7.98) fixant la liste des agents biologiques pathogènes ainsi que le groupe auquel ils appartiennent.

Arrêté du 13 Août 1996 (J.O. du 7 Septembre 1996) : niveaux de confinement

Circulaire du 8 Août 1973 (J.O. du 6 novembre 1973) : souches microbiennes autorisées au cours des travaux pratiques en lycées techniques.

*Normatives : NF ISO 72-18 - Mai 1996 : Microbiologie des aliments - Règles générales pour les examens microbiologiques

NF X 42-075 - Avril 1990 : Biotechnologies - guide de bonnes pratiques d'analyse et de recherche en microbiologie dans le domaine de la santé animale.

NF EN 12128 de juin 1998 : biotechnologie : laboratoire de recherches, de développement et d'analyse.

La réglementation récente impose diverses mesures pour l'aménagement et le fonctionnement des laboratoires de microbiologie.

Ce dispositif réglementaire est complété par des prescriptions d'ordre normatif, qui définissent les « bonnes pratiques de laboratoire ».

La présente note de service a pour objet de préciser, sur la base de ces textes, les principales règles applicables dans les laboratoires d'enseignement des lycées agricoles, dans le souci de la sécurité des manipulateurs et de la qualité des pratiques.

Son application suppose que, dans chaque établissement, soient établis par l'équipe utilisatrice :

a) l'évaluation des risques

Nature, durée et conditions de l'exposition des professeurs et des élèves à des agents biologiques, en fonction du classement de ces agents et des maladies professionnelles, effets allergisants ou toxiques pouvant résulter de cette exposition.

Dans le cadre de l'enseignement, les manipulations doivent être limitées aux micro-organismes de classes 1 et 2 autorisés (cf infra : souches microbiennes manipulées).

b) Un diagnostic des installations existantes et des modalités de fonctionnement du laboratoire.

Sur la base de ce diagnostic, les mesures qui ne supposent pas d'investissement seront d'application immédiate ; les autres mesures seront hiérarchisées par ordre de priorité et feront l'objet d'une programmation dans le temps.

1- Aménagement des laboratoires

1.1- Agencement des locaux

*Les travaux pratiques de microbiologie doivent se dérouler dans un laboratoire spécifique, dont la porte d'entrée est verrouillable.

*L'entrée de ce laboratoire doit être signalée par le pictogramme « danger biologique », et la mention « interdit aux personnes non habilitées ».

*Il est souhaitable que l'entrée dans le laboratoire se fasse par un sas spécifique.

1.2- Equipement

*Chaque laboratoire doit être équipé d'au minimum un poste de sécurité microbiologique (P.S.M.).

Un P.S.M. supplémentaire est à mettre en place dans la salle de préparation.

*Les salles annexes doivent avoir un autoclave facilement accessible, destiné à la stérilisation des milieux d'une part, et à la décontamination des produits et du matériel souillé d'autre part.

Dans l'idéal, il est recommandé de prévoir deux autoclaves, l'un pour la stérilisation des milieux, l'autre pour la décontamination des produits et matériels souillés.

Chaque laboratoire doit être équipé

- de lavabos à commandes non manuelles obligatoires, d'un antiseptique pour la peau et, éventuellement, de collyres recommandés par le médecin du travail.
- de paillasses résistant aux acides, alcalis, solvants et désinfectants, d'une surface facile à nettoyer
- de sols, murs et plafonds en matériaux faciles à nettoyer et désinfecter
- d'un rince-œil et, si possible, d'une douche de sécurité.

Est à prévoir un rangement pour les vêtements de protection dans le laboratoire ou l'unité.

*Ventilation pour évacuation des gaz, vapeurs ou aérosols de substances insalubres gênantes ou dangereuses.

-Un système d'extraction d'air efficace doit être aménagé. Cette extraction d'air ne doit pas engendrer de zones de turbulence ; les prises directes avec l'extérieur doivent être évitées ainsi que tout recyclage de l'air non filtré du laboratoire dans le laboratoire ou d'autres bâtiments.

Les bouches d'aération doivent être munies de filtres faciles à nettoyer.

Un dispositif d'avertissement automatique est à prévoir pour signaler toute défaillance des installations de captage non immédiatement décelable par les occupants des locaux.

-Une extraction d'air spécifique doit être prévue au dessus des autoclaves. Il est souhaitable que ceux-ci soient placés dans une pièce séparée, attenante au laboratoire et munie des extractions de vapeur nécessaires.

-Maintenance de la ventilation : un contrôle doit être régulièrement effectué tous les ans.

1.3- Matériel

*Le laboratoire de microbiologie doit être équipé d'un matériel (verrerie,...) qui lui est spécifique. Il est souhaitable que le matériel nécessaire aux manipulations de routine soit placé à demeure à chaque poste de travail, sous réserve qu'il puisse être stocké dans un placard fermé.

*Il est souhaitable que soit prévu à chaque poste de travail un placard mobile ou une tablette amovible permettant la prise de notes et le stockage du matériel nécessaire et suffisant pour cet usage.

- Chaque poste de travail doit être muni d'un bec bunsen (ou équivalent), et d'un système d'aspiration mécanique.

2- Fonctionnement général

2.1- Procédures

*Le fonctionnement du laboratoire et de ses annexes fera l'objet de procédures écrites, portées à la connaissance de l'ensemble des utilisateurs.
Certaines de ces procédures peuvent, sous forme simplifiée, faire l'objet d'un affichage dans le laboratoire. Cet affichage sera alors réalisé sous film plastique.

Elles comprendront obligatoirement :

- le plan à mettre en œuvre en cas d'accident impliquant des agents biologiques pathogènes
- la procédure à suivre en cas d'accident ou d'incident grave mettant en cause des agents biologiques pathogènes.

2.2- Personnes habilitées et accès au laboratoire

Conformément à la circulaire du 8 août 1973 citée en référence, des précautions sont à prendre pour éviter les risques de contamination et pour préserver la santé des personnels et élèves.
Une surveillance médicale spéciale doit être exercée sur les agents par le médecin du travail.
A titre de prévention et dans l'intérêt de chacun, il est vivement recommandé aux enseignants, aux agents de laboratoire, aux élèves participant aux manipulations ou à leur préparation, de subir, avant leur entrée dans les lieux et sauf contre-indication médicale, les vaccinations et rappels de vaccinations requis par l'article L.10 du code la santé publique et l'arrêté du 6 février 1991 fixant les conditions d'immunisation des personnes visées par cet article L.10.

Les établissements où sont manipulés ou préparés les agents biologiques pathogènes doivent être déclarés à la préfecture du département ainsi que les enseignants, le personnel de laboratoire et les élèves qui participent directement à ces travaux.

*Les personnes susceptibles de pénétrer et/ou de réaliser des manipulations dans le laboratoire de microbiologie (enseignants, personnel technique et d'entretien, élèves,...) seront consignées sur une liste validée par le chef d'établissement.
Toute autre personne devra, après autorisation, être accompagnée par un membre habilité du personnel de l'établissement.
Il est interdit d'introduire dans le laboratoire des cosmétiques, boissons, nourritures, articles pour fumeurs mouchoirs autres que de papier à usage unique

2.3- Vêtements de protection

*Toute personne dans le laboratoire doit être vêtue d'une blouse réservée à cet usage, en coton épais, résistant aux hautes températures et à l'eau de Javel.
Les équipements de protection individuelle réutilisables (blouses, gants...) sont rangés dans des endroits spécifiques, nettoyés et désinfectés régulièrement, vérifiés avant et après chaque utilisation et, éventuellement, remplacés et réparés.
Les équipements de protection individuelle non réutilisables (gants à usage unique etc...) sont considérés comme des déchets contaminés.

2.4- Traitement des déchets

*Les déchets de laboratoire doivent être triés, afin d'être traités selon une procédure adaptée. Seront ainsi distingués :

-Les papiers, emballages,... : ils sont assimilés aux ordures ménagères.

-Les produits souillés en matière plastique (boites de Pétri, pipettes à usage unique,...) : Ces produits doivent faire l'objet d'un autoclavage (au minimum 121°C/30 mn) ; après autoclavage, ils ne sont pas assimilables aux ordures ménagères ; ils restent classés comme déchets biologiques, et doivent donc être incinérés.

-Les objets contaminés piquants et tranchants (pipettes Pasteur, lames de microscopes,...) : Après avoir séjourné dans de l'eau de Javel à 3°Cl, ces objets sont placés dans un container spécialement adapté à cet usage, ne pouvant être transpercé.

-Les déchets chimiques.

Chaque type de déchets devra être placé dans un container approprié et éliminé selon un procédé adapté. Un système de collecte spécifique à chacun d'eux sera mis en place, assurant une traçabilité rigoureuse, jusqu'à la destruction.

Afin d'organiser cette collecte, chaque établissement prendra contact avec des sociétés spécialisées.

*Afin de favoriser le tri des déchets, seront disposés :

-A chaque poste de travail : Deux bacs à pipettes contenant de l'eau de Javel à 3°Cl, l'un pour le matériel en verre, l'autre pour le matériel en matières plastiques.
Une corbeille à papiers
Un bac contenant de l'eau de Javel devra être placé à proximité des microscopes afin de recueillir les états frais sur lame.

-Dans le laboratoire : Une poubelle à papier
Un sac pour autoclavage, destiné à recueillir les matières plastiques contaminées
Un container approprié pour la collecte du matériel en verre

2.5- Nettoyage et désinfection

*Avant et après son utilisation, chaque poste de travail sera nettoyé et désinfecté, à l'aide d'eau de Javel à 3°Cl ou de tout autre produit de désinfection d'efficacité équivalente. Dans tous les cas, la désinfection par flambage d'alcool répandu sur la paillasse est à proscrire.

*Un plan de nettoyage et de désinfection des laboratoires de microbiologie doit être établi, et porté à la connaissance du personnel chargé de sa mise en application. Ce plan ne doit pas omettre le nettoyage régulier des bouches d'aération.

2.6 - Utilisation du gaz

Lors de l'utilisation du gaz, les consignes suivantes doivent impérativement être respectées :

-vérifier la fermeture de la vanne principale du gaz, avant sortie

-vérifier les dates de péremption des tuyaux d'alimentation et la présence d'un collier de serrage sur le tuyau, (autant que possible les raccordement des appareils à l'alimentation en gaz seront conformes à la norme XP D 36 126, prévue notamment pour les laboratoires de recherche et d'enseignement)

-vérifier la présence, à proximité, d'extincteurs en bon état de fonctionnement.

2.7 - Produits chimiques

- En cas d'emploi de produits chimiques dangereux, les obligations d'étiquetage et de communication des fiches de données de sécurité doivent être respectées.
- Ces produits doivent être stockés dans une armoire fermant à clé. Les solvants doivent être tenus éloignés des sources de chaleur (bec bunsen...).

3- Réalisation des manipulations

A chaque niveau de formation, les manipulations devront être strictement limitées à celles prévues dans les référentiels.

3.1- Souches microbiennes manipulées

Les caractères des souches fournies aux établissement doivent être attestés par écrit par le fournisseur, et régulièrement vérifiés. Elles doivent être stockées dans un réfrigérateur fermant à clé et sur lequel est affiché le pictogramme « danger biologique ».
Toute autre souche ou toute souche mutante doit être immédiatement détruite.

*Les prescriptions de la circulaire du 8 Août 1973 sont applicables aux établissements d'enseignement agricole.
La liste des souches fournies par l'Institut Pasteur dont la manipulation est autorisée par les élèves, actualisée en 1994, est fournie en annexe.

3.2- Echantillons analysés

Des analyses de produits alimentaires sont incluses dans les référentiels de formation. Dans ce cas, cependant, certaines précautions doivent être prises :
*Ces analyses ne peuvent intervenir avant que les élèves n'aient reçu, au préalable, un enseignement leur permettant d'acquérir une maîtrise suffisante des techniques de base et une formation à la sécurité (connaissance des risques, des précautions à prendre, de la nécessité du port des équipement de protection individuelle).
Cette maîtrise n'est en général acquise qu'en fin de formation. Elle aura été vérifiée par l'enseignant.
Les échantillons doivent provenir d'un établissement contrôlé par les services vétérinaires, et dont l'étiquette comporte une marque de salubrité et une date limite de vente ou de consommation. Le produit est acheminé et stocké dans les meilleures conditions de conservation.
*Les produits de l'atelier technologique de l'établissement peuvent être analysés par les élèves, sous réserve que la traçabilité du produit soit parfaitement assurée, et atteste de la maîtrise des conditions d'hygiène de fabrication.
*En cas d'isolement d'une souche inconnue potentiellement pathogène, les élèves ne procéderont pas à son identification. La manipulation ne pourra être poursuivie qu'à partir d'une souche autorisée préalablement isolée par le personnel du laboratoire.
*Des produits destinés à l'analyse peuvent être artificiellement contaminés, sous réserve de se limiter aux souches autorisées.

3.3- Méthodes d'analyse

*Les méthodes d'analyse mises en oeuvre sont les méthodes normalisées ou, à défaut, celles préconisées par les services officiels de contrôle.
A titre de comparaison, des méthodes rapides ou alternatives peuvent être mises en œuvre par les élèves ou en démonstration, sous réserve qu'elles s'insèrent dans le programme n° 59 du Comité français d'accréditation (COFRAC - 37, rue de Lyon - Paris 75012 - Tél. : 01.44.68.82.20) relatif à l'analyse microbiologique des produits alimentaires.

3.4- Préparation des échantillons et ensemencement

*Le broyage des denrées alimentaires est exclusivement réalisé à l'aide d'appareils utilisant des sacs à usage unique, ou de mixer à bols fermés et autoclavables.
*Tout prélèvement à la pipette doit être réalisé à l'aide d'un système d'aspiration mécanique. En effet, tout pipettage à la bouche est strictement interdit.
*Les techniques d'ensemencement doivent éviter toute projection ou formation d'aérosols, en particulier lors du flambage des anses de platine.

Le Sous-Directeur de l'Administration de la Communauté Educative

A. DETAILLE

Le Sous-Directeur du Travail et de l'Emploi

P. DEDINGER

ANNEXE : Liste des souches bactériennes dont la délivrance est autorisée fournie par l'Institut Pasteur

Liste proposée par la circulaire de 1973		Liste actualisée par l'Institut Pasteur en 1994		
Acetobacter suboxydans	53-162	Acetobacter calcoacaticus	52-90	
		Acetobacter lwoffi	53-82	
Aeromonas hydrophila	57-49	Aeromonas hydrophila	74-30	
Agrobacterium tumefaciens	67-1	Agrobacterium tumefaciens	67-1	
Alkalescens-Dispar, serotype O :1	59-42	Voir E.coli biovar alkalescens-dispar		
Alcaligenes faecalis	57-58	Alcaligenes faecalis	67-23	
Arizona	58-61	voir Salm. enterica subsp arizonae		
Bacillus cereus	A-30	Bacillus cereus	78-3	
Bacillus megaterium	51-17	Bacillus megaterium	51-17	
Bacillus subtilis	52-65	Bacillus subtilis	52-65	
Bordetella pertussis	58-10	Bordetella pertussis	58-10	* 2
		Campylobacter fetus	A-168	* 2
		Campylobacter jejuni	70-2	* 2
Citrobacter	57-32	Citrobacter freundeii	57-32	
		Citrobacter koseri	72-11	
Clostridium histolyticum	60-34	Clostridium histolyticum	60-34	
		Clostridium perfringens	60-60	* 2
Clostridium sporogenes	60-53	Clostridium sporogenes	60-53	
Corynabacterium pseudodiphtericum	A-105	Corynebacterium pseudodiphtericum	A-105	
Corynebacterium xerosis	52-16	Corynebacterium xerosis	52-165	
Diplococcus pneumoniae serotype 1	69-2	voir Streptococcus pneumoniae		
Enterobacter aerogenes	60-86	Enterobacter aerogenes	60-86	
Enterobacter cloacae	68-1	Enterobacter cloacae	60-85	* 2
		Enterobacter faecalis	76-117	
		Enterobacter faecum	55-125	
Enterobacter agglomerans		Pantoea agglomerans	57-51	
Escherichia coli	54-8	Escherichia coli	54-8	
Escherichia coli sérotype O26 :B6	52-172	Escherichia coli O26 :B6	52-172	
Escherichia coli O55 :B5	52-170	Escherichia coli O55 :B5	52-170	
Escherichia coli O111 :B4	52-167	Escherichia coli O111 :B4	52-167	
		E. coli biovar alkalescens-dispar	59-42	
		Gluconobacter oxydans	53-162	
Haemophilus influenzae	52-151	Haemophilus influenzae	52-151	* 2
Haemophilus parainfluenzae	A-62	Haemo. Parainfluenzae biotype IV	A-62	
Hafnia	57-31	Hafnia alvei	57-31	
Klebsiella pneumoniae	52-145	Klebs. Pneumoniae subsp.	52-145	* 2
Lactobacillus acidiphilus	62-18	Pneumoniae	62-18	
		Lactobacillus acidophilus	55-1	
Micrococcus flavus	53-160	Lact. Delbrueckii subsp. Bulgaricus	53-45	
Moraxella duplex	A-166	Micrococcus luteus	A-166	
Moraxella glucidolytica	52-90	Moraxella nonliquefaciens		
Moraxella lwoffi	53-82			
Mycobacterium phlei	64-29			
Neisseria catharralis	A-151	Mycobacterieum phlei	64-29	
Neisseria gonorrhoeae	A-51	voir Branhamella catharralis		
		Neisseria gonorrhoeae	A-51	* 2
		Neisseria mucosa	59-47	
Pasteurella multocida	56-3	Neisseria sicca	52-183	
Proteus mirabilis	A-235	Past. Multocida subsp. Multocida	56-3	* 2
Proteus morganii	A-236	Proteus mirabilis	A-235	* 2
Proteus rettgeri	69-24	voir Morganella morganii		
Proteus vulgaris	A-232	voir Providencia rettgeri		
Providencia	58-62	Proteus vulgaris	A-232	* 2
		Providencia alcalifaciens	58-62	* 2

Pseudomonas aeruginosa	A-22		Providencia rettgeri	69-24	* 2
Pseudomonas fluorescens	56-90		Pseudomonas aeruginosa	A-22	* 2
Pseudomonas maltophilia	54-90		Pseudomonas fluorescens	69-13	
			voir Xanthomonas maltophilia		
Ramibacterium ramosum	60-29		Pseudomonas stutzeri	67-17	
Salmonella anatum	56-30				
			Salm. Enterica subsp. Enterica	56-30	
			sérotype Anatum		
Salmonella cholerae suis	58-27		Salm enterica subsp. Arizonae	58-61	* 2
Salmonella enteritidis	57-29				
			Salm. Enterica subsp. Enterica	81-3	
Salmonella gallinarum	56-8		sérotype Enteritidis		* 2
			Salm. Enterica subsp. Enterica	56-8	* 2
Salmonella paratyphi B	55-42		sérotype Gallinarum		
			Salm. Enterica subsp. Enterica	55-42	
Salmonella typhimurium	58-58		sétotype Paratyphi B		* 2
			Salm. Enterica subsp. Enterica	58-58	
Sarcina lutea	53-45		sérotype Typhimurium		* 2
Serratia marcescens	58-14		voir Micrococcus luteus		
Serratia marcescens (non pigmentée)	60-93		Serratia marcescens	58-14	
			Serratia marcescens (non pigmentée)	60-93	
Shigella boydii sérotype 1	54-73		Shigella boydii sérotype 1	54-73	*2
Shigella dysenteriae sérotype 1	62-17				
Shigella flexneri sérotype 1	52-36		Shigella flexneri sérotype 1	52-36	* 2
Shigella sonnei	52-55		Shigella sonnei	52-55	* 2
Sphaerophorus funduliformis	60-38				
Staphylococcus aureus	53-156		Staphylococcus aureus	53-156	*2
Staphylococcus epidermidis	53-124		Staphylococcus epidermidis	53-124	
			Staphylococcus saprophyticus	6-125	
Staphylococcus durans, groupe D	55-125				
Streptococcus faecalis groupe D	52-32		voir Enterococcus faecalis		
Streptococcus pyogenes groupe A	56-1		Streptococcus pyogenes	56-1	* 2
			Streptococcus pneumoniae	69-2	* 2
Vibrio foetus	A-168				
Vibrio sp.	56-38		Vibrio cholerae sérovar non O :1	56-38	* 2
			Vibrio parahaemolyticus	78-26	* 2
			Xanthomonas maltophilia	54-90	
Welchia perfringens	60-60		voir Clostridium perfringens		* 2
			Yersinia enterocolitica	81-41	* 2
Yersinia pseudotuberculosis	67-6		Yersinia pseudotuberculosis		* 2

Souches bactériennes autorisées uniquement en démonstration, en BTS IAA et en BTS ANABIOTEC

Corynebacterium diphtheriae	52-110	* 2
Erysipelothrix rhusiopathiae	69-1	* 2
Listeria monocytogenes	55-143	* 2
Neisseria meningitidis	67-64	* 2

PS : Les souches ne portant pas de numéro dans la colonne de droite du tableau sont classées catégorie 1.
La définition des catégories d'agents biologiques est donnée par l'article R.231-61-1 du code du travail.
Les agents du groupe 1 ne sont pas pathogènes.
Ceux du groupe 2 peuvent provoquer une maladie chez l'homme et constituer un danger pour les travailleurs ; leur propagation dans la collectivité est peu probable ; il existe généralement une prophylaxie ou un traitement efficace.
Certaines souches de la classe 3 figurent dans la liste de la circulaire du 8 août 1973. Elles ont été volontairement exclues des manipulations autorisées dans l'enseignement agricole faisant l'objet de cette note.