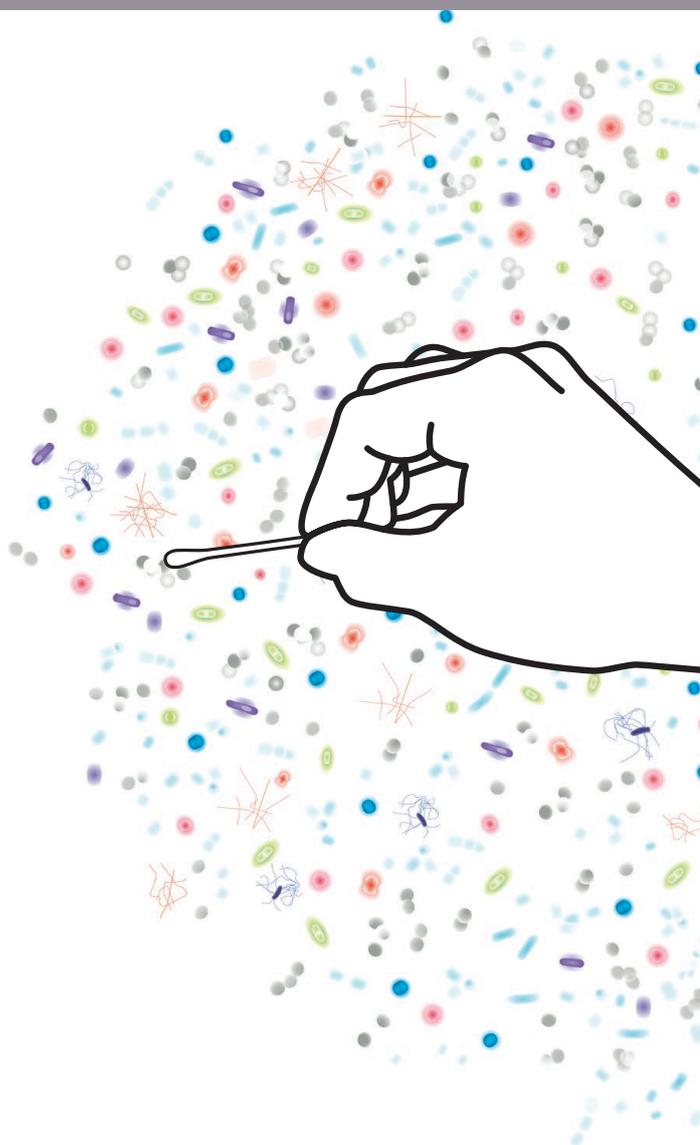


**RMT**  
ACTIA  
**CHLEAN**

HYGIÈNE DES ÉQUIPEMENTS

## GUIDE SUR LES BONNES PRATIQUES DE PRÉLÈVEMENT DE SURFACES EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE



### COORDINATEURS

CHRISTOPHE HERMON - [CHERMON@CTCPA.ORG](mailto:CHERMON@CTCPA.ORG)

GRAZIELLA MIDELET - [GRAZIELLA.MIDELET@ANSES.FR](mailto:GRAZIELLA.MIDELET@ANSES.FR)

CATHERINE DENIS - [C.DENIS@ACTALIA.EU](mailto:C.DENIS@ACTALIA.EU)

### ONT PARTICIPÉ À LA RÉDACTION DE CE GUIDE

Stéphane André - [sandre@ctcpa.org](mailto:sandre@ctcpa.org)

Anne-Laure Boutillier - [al.boutillier@adrianor.com](mailto:al.boutillier@adrianor.com)

Thomas Brauge - [thomas.brauge@anses.fr](mailto:thomas.brauge@anses.fr)

Bastien Frémaux - [bastien.fremaux@ifip.asso.fr](mailto:bastien.fremaux@ifip.asso.fr)

Morgan Guilbaud - [morgan.guilbaud@agroparistech.fr](mailto:morgan.guilbaud@agroparistech.fr)

Christine Faille - [christine.faille@inrae.fr](mailto:christine.faille@inrae.fr)

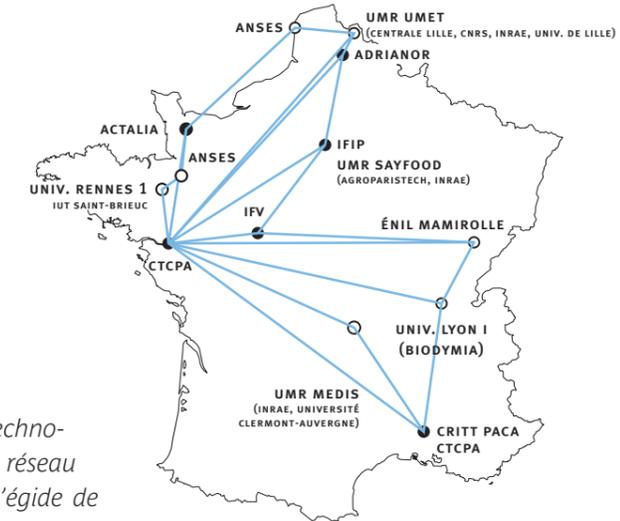
Nadia Oulahal - [nadia.oulahal@univ-lyon1.fr](mailto:nadia.oulahal@univ-lyon1.fr)

Nicolas Rossi - [n.rossi@actalia.eu](mailto:n.rossi@actalia.eu)

Christophe Soumet - [christophe.soumet@anses.fr](mailto:christophe.soumet@anses.fr)

## SOMMAIRE

Présentation du RMT Actia Chlean .....	3
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>PARTIE I : COMMENT RÉALISER UN PRÉLÈVEMENT DE SURFACE</b> .....	5
Où et quand faut-il réaliser le prélèvement de surface ? .....	5
Quelle est la dimension de la surface à examiner ? .....	5
Faut-il utiliser un neutralisant de biocides ? .....	5
Le matériau a-t-il une influence sur le décrochage des micro-organismes ? .....	6
Le résultat du prélèvement de surface est-il dépendant de la personne qui l'effectue ? .....	6
Certaines méthodes sont-elles plus efficaces ? .....	5
En conclusion : quelques recommandations .....	7
<b>PARTIE II : FICHES DESCRIPTIVES</b> .....	10
<b>1</b> Méthodes par empreinte : fiche boîte contact, lame biface .....	11
<b>2</b> Méthodes par empreinte : fiche Petrifilm® .....	13
<b>3</b> Méthodes par empreinte : fiche coulage de gélose en place .....	15
<b>4</b> Méthodes par frottis : fiche écouvillon .....	17
<b>5</b> Méthodes par frottis : fiche chiffonnette, éponge .....	20
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	23



## LE RMT ACTIA CHLEAN

Ce guide a été rédigé par les partenaires du Réseau mixte technologique (RMT) Actia Chlean « Hygiène des équipements ». Ce réseau agréé par le ministère chargé de l'Alimentation réunit sous l'égide de l'ACTIA treize partenaires sur le plan national.

Coordonné par le CTCPA, ce RMT regroupe des **Instituts techniques de l'Agro-alimentaire** (Actalia, CTCPA, Ifip - Institut du porc, IFV - Institut français de la vigne et du vin), un **partenaire interface** (Critt agroalimentaire Provence-Alpes-Côte d'Azur), un **centre technique** (Adrianor), un **organisme public français** (Anses), des **établissements d'enseignement et de recherche** (Énil de Mamirolle, UMR Medis [Inrae, université Clermont-Auvergne], UMR Sayfood [AgroParisTech, Inrae], UMR Umet [Centrale Lille, CNRS, Inrae, université de Lille]), université Lyon 1 - Biodymia, université Rennes 1 - IUT de Saint-Brieuc).

Le RMT Actia Chlean réunit les principaux acteurs en matière de recherche, développement, formation et transfert de technologie, impliqués dans la démarche de conception hygiénique des équipements avec l'étude de l'écologie bactérienne des lignes de transformation et des ateliers en industries alimentaires. Ce réseau regroupe des experts dans les domaines complémentaires que sont la microbiologie, la mécanique des fluides, la physico-chimie des surfaces, la mécanique et les matériaux.

La conception hygiénique des équipements, des lignes de fabrication et des ateliers est un élément majeur de l'activité d'une entreprise agro-alimentaire, tant les conséquences d'une bonne ou d'une mauvaise conception impactent les qualités sanitaires, organoleptiques, nutritionnelles des produits. La conception hygiénique a également des répercussions sur la rentabilité de l'entreprise (consommations d'eau, d'énergie, d'intrants, temps opérateur, coût du traitement des effluents), dans les conditions de travail des personnels et dans la limitation des impacts environnementaux.

L'émergence dans les ateliers de germes pathogènes ou non pathogènes très résistants (à la chaleur, aux biocides désinfectants ou encore à la dessiccation), et le renforcement des contrôles liés à la mise en place de plans de maîtrise du risque sanitaire nécessitent de nouvelles recherches pour comprendre les mécanismes d'installation, de maintien et d'élimination des biofilms microbiens.

Pour répondre aux enjeux industriels, le RMT Actia Chlean mène des actions pour limiter les intrants et les impacts environnementaux, développer des méthodologies de mesure de la contamination résiduelle biologique et chimique, renforcer les connaissances sur les contaminants résiduels biologiques et chimiques, dans l'objectif de mieux les maîtriser.

Dans ce contexte, quatre domaines d'investigation ont été identifiés par le RMT:

- acquisition de connaissances sur l'adaptation, la résistance et la sélection des espèces bactériennes au sein des biofilms industriels;
- étude des transferts de bactéries entre la surface d'équipement et l'aliment et inversement;
- évaluation des méthodes de prélèvements des contaminants microbiologiques sur les surfaces;
- optimisation des méthodes de détection et de quantification des résidus biologiques ou microbiologiques.

## INTRODUCTION

L'opération de nettoyage et désinfection (N & D) est une procédure quotidienne fondamentale en industrie agro-alimentaire car elle doit permettre de maîtriser la contamination des aliments via le matériel et l'environnement de production. Le contrôle de l'efficacité des procédures de N & D est un enjeu majeur pour les entreprises dans le cadre du plan de maîtrise sanitaire. Cet enjeu est renforcé par la loi EGalim <sup>[18]</sup> (loi pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous), qui impose la communication aux autorités du plan d'action correctif, mis en place suite à la détection d'un lot dépassant les critères microbiologiques, mais aussi en cas de détection d'un pathogène dans l'environnement de production.

Au sein des PME, le contrôle de l'efficacité des opérations de N & D est souvent limité à quelques analyses microbiologiques de surface. Les principales limites rencontrées pour évaluer l'efficacité des procédures de N & D sont la difficulté à décrocher la flore présente, fortement adhérente aux surfaces, intégrée ou non dans des biofilms, et à quantifier les contaminants chimiques résiduels. Les méthodes traditionnelles les plus utilisées actuellement consistent à faire une « empreinte » de la surface à analyser par contact de gélose ou à utiliser d'autres techniques de prélèvement telles que les écouvillons en coton, polyester, rayonne ou nylon, les éponges et chiffonnettes, pour décrocher les contaminants et les cellules résiduelles adhérentes.

L'efficacité de ces méthodes de « décrochage » est non seulement dépendante de l'opérateur qui effectue le prélèvement, mais également très variable selon le type de surface (matériau, rugosité, humidité...), selon la nature et la structure du biofilm (notamment pour les biofilms mixtes formés de plusieurs souches bactériennes souvent rencontrés sur site industriel).

Il existe quelques recommandations concernant les prélèvements de surface :

- la norme Afnor NF EN ISO 18593 (2018), *Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement de surfaces*. <sup>[1]</sup>
- le document plus complet rédigé par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour *Listeria monocytogenes*, l'Anses, qui concerne les prélèvements de surface en industrie agro-alimentaire pour *Listeria monocytogenes*, *Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of Listeria monocytogenes*, Midelet et al., 2021, sous presse ; <sup>[16]</sup>
- la publication issue d'un essai interlaboratoires mené dans le cadre du RMT Actia Chlean, qui compare l'efficacité des méthodes de prélèvement par empreinte et par frottis (Brauge et al., avril 2020) ; <sup>[5]</sup>
- *l'étude comparative des méthodes de surveillance*, publiée par l'Ifip (Institut du porc) (Garry, 2009). <sup>[10]</sup>

L'OBJECTIF DE CE GUIDE EST DE FORMULER DES RECOMMANDATIONS, DE MANIÈRE COMPLÉMENTAIRE AUX DOCUMENTS EXISTANTS, ET DE FOURNIR DES INFORMATIONS SUR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT DE SURFACE À LA DISPOSITION DES PROFESSIONNELS.

## PARTIE I - COMMENT RÉALISER UN PRÉLÈVEMENT DE SURFACE ?

### OÙ ET QUAND FAUT-IL RÉALISER LE PRÉLÈVEMENT ?

Cela dépend des objectifs du prélèvement de surface. Il peut s'agir de :

- mettre en évidence des sources de contamination potentielles ;
- évaluer le taux ou la vitesse d'encrassement d'une surface ;
- vérifier l'efficacité des opérations de N & D ;
- surveiller le niveau de contamination des surfaces ;
- détecter des dérives au cours du temps, de l'efficacité des opérations de N & D.

Dans tous les cas, le préalable est de bien définir les zones, matériels et ustensiles critiques à prélever, soit parce qu'ils sont en contact direct ou à proximité de l'aliment, soit parce qu'ils sont difficilement nettoyables : surfaces vieillissantes, rugueuses, présentant des anfractuosités ou peu accessibles...

Selon l'objectif, le prélèvement de surface pourra être effectué en fin de production, après l'opération de N & D, avant la reprise de production et/ou en cours de procédé de fabrication.

La fréquence des prélèvements doit également être définie en tenant compte de l'objectif du prélèvement, des cycles de production et idéalement des facteurs extérieurs, tels que la saisonnalité, l'interruption de production ou encore la réalisation de travaux.

### QUELLE EST LA DIMENSION DE LA SURFACE À EXAMINER ?

La dimension de la surface à traiter dépend des flores ou des micro-organismes recherchés et si l'on souhaite les dénombrer ou uniquement les détecter. Si l'on souhaite mettre en évidence la présence d'une bactérie pathogène, il est recommandé de réaliser le prélèvement sur une grande surface quand cela est possible, afin d'augmenter la probabilité de détecter la bactérie. Une surface de 1000 à 3000 cm<sup>2</sup> est préconisée (NF EN ISO 18593 <sup>[1]</sup>, Midelet et al., 2021, sous presse <sup>[16]</sup>).

Si l'on souhaite dénombrer des micro-organismes présents en plus grand nombre, telles que la flore aérobique mésophile ou des levures et moisissures, des surfaces plus petites peuvent être examinées. Des surfaces très petites peuvent aussi être d'intérêt car identifiées comme CCP (Critical control point - points critiques pour la maîtrise) ou à l'origine de contamination (gorge de joint...). Pour comparer le niveau de contamination de différentes surfaces entre elles ou dans le temps, il est nécessaire de définir, dans la mesure du possible, une dimension de surface unique et identique pour tous les prélèvements.

### FAUT-IL UTILISER UN NEUTRALISANT DE BIOCIDES ?

Si le prélèvement est effectué après les opérations de N & D, l'utilisation d'un neutralisant est fortement recommandée car d'éventuels résidus de biocides peuvent stresser ou inhiber des micro-organismes (Brauge et al. 2020) <sup>[6]</sup>. De nombreuses cellules encore présentes sur les surfaces peuvent être alors viables mais non cultivables sur les milieux de dénombrement (cet état est appelé « viable non cultivable » ou VNC) et la quantité de contamination résiduelle pourra être largement sous-estimée, voire non détectée (faux négatif).

C'est pourquoi, si l'on souhaite déterminer des zones critiques pouvant être à l'origine de la contamination des produits en cours ou en fin de procédés, il faudra privilégier les prélèvements de surface en cours de production. Dans ce cas, pour les surfaces n'ayant pas été désinfectées avant le prélèvement, l'utilisation de neutralisant, parfois nocif pour le recouvrement des bactéries, doit être évitée (NF EN ISO 18593 <sup>[14]</sup>, Midelet et al., 2021, sous presse <sup>[15]</sup>).

### LE MATÉRIAU A-T-IL UNE INFLUENCE SUR LE DÉCROCHAGE DES MICRO-ORGANISMES LORS DU PRÉLÈVEMENT DE SURFACE ?

Selon le type de matériau, sa rugosité, la présence d'anfractuosités, son caractère plus ou moins hydrophobe, les forces d'adhésion des micro-organismes ou l'architecture du biofilm pourront être différentes, ce qui affectera le décrochement des cellules microbiennes et/ou leur résistance aux désinfectants.

Les données disponibles dans la littérature, sont souvent contradictoires, ce qui traduit le fait que l'efficacité du décrochage des micro-organismes est liée à de multiples facteurs.

#### Quelques exemples

Des travaux décrits dans la littérature montrent que l'efficacité du décrochage peut être affectée par la rugosité du matériau. Ceci a été étudié sur des prélèvements à l'éponge (Krauter et al., 2012 <sup>[13]</sup>) et des prélèvements par écouvillonnage (Probst et al., 2010 <sup>[17]</sup>) de spores bactériennes.

Différents dispositifs de prélèvements ont été testés pour le décrochage de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* et de *Escherichia coli* constitués sur différents supports : acier inoxydable, téflon, polyéthylène, polypropylène et verre. Cette étude a montré que la récupération des biofilms était plus difficile sur les polymères que sur l'acier inoxydable ou le verre (Faille et al., 2014 <sup>[7]</sup>).

Un essai interlaboratoires a été réalisé dans le cadre du RMT Actia Chlean avec *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas fluorescens*. Pour ces deux espèces, des biofilms ont été constitués à 8 °C et 20 °C sur des coupons en acier inoxydable ou polyuréthane préalablement nettoyés et désinfectés. Quatre méthodes de décrochage ont été évaluées : boîte contact, chiffonnette, éponge et écouvillon. Ces essais ont montré que pour les quatre méthodes testées sur des surfaces de même superficie (8 cm<sup>2</sup>), il n'y avait pas d'impact du matériau sur le décrochage pour les deux espèces étudiées (Brauge et al. 2020 <sup>[5]</sup>).

### LE RÉSULTAT DU PRÉLÈVEMENT DE SURFACE EST-IL DÉPENDANT DE LA PERSONNE QUI L'EFFECTUE ?

La qualité des prélèvements de surface, quelle que soit la méthode, dépend de la façon dont le prélèvement est effectué : nombre de frottements ou de passage sur la surface, pression exercée sur le dispositif de prélèvement, durée et intensité du prélèvement..., autant de facteurs qui peuvent varier d'un opérateur à l'autre.

Dans le même essai interlaboratoires impliquant huit partenaires du RMT Actia Chlean, pour chaque dispositif testé (boîte contact, chiffonnette, éponge et écouvillon), une même référence de fournisseur a été utilisée par les huit laboratoires, selon un protocole précis et standardisé. Les résultats ont montré que si l'on respecte le protocole de prélèvement, l'influence de l'opérateur est négligeable dans le contexte de l'étude (surface des coupons plane et de petite taille).

Il est donc recommandé de bien décrire le protocole et de former les différents opérateurs susceptibles de réaliser les prélèvements de surface dans l'entreprise, afin que l'influence de l'opérateur soit négligeable.

### CERTAINES MÉTHODES SONT-ELLES PLUS EFFICACES ?

On distingue deux types de méthodes : par « empreinte » de la surface à analyser, c'est-à-dire par contact de gélose (boîte contact, lame gélosée, Petrifilm®...) ou par « frottis » avec différentes techniques de prélèvement (écouvillons en coton, polyester, rayonne, nylon ; mousse, éponges ; chiffonnettes...).

Une étude menée par l'Ifip a permis de comparer quatre méthodes par empreinte (boîtes contact Rodac, lame de surface, lame de contact et Petrifilm®) et deux méthodes par double écouvillonnage (écouvillons en alginate et en rayonne) sur le décrochage de *Citrobacter freundii* et d'*Enterococcus faecalis*, après adhésion sur des coupons en acier inoxydable ou en polyéthylène (Garry, 2009 <sup>[10]</sup>). Pour *E. faecalis*, le taux de récupération était nettement meilleur avec la lame de contact (76 à 80 %) puis avec la boîte Rodac (25 %) pour les deux matériaux. Pour les autres méthodes, les taux de récupération étaient inférieurs à 0,5 %. Pour *C. freundii*, les taux de récupération étaient très faibles (< 0,1 %) pour toutes les conditions testées, excepté pour l'écouvillon avec embout en rayonne pour le polyéthylène (5,6 %).

Faille et al. (2014 <sup>[7]</sup>) ont testé l'efficacité de différents dispositifs de prélèvement par frottis pour le décrochage de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* et de *Escherichia coli* constitués sur différents supports. Les écouvillons avec embout en rayonne ou polyester se sont révélés, dans cette étude, moins performants que les mousses biseautées, les chiffonnettes ou les écouvillons en nylon. Les éponges ont permis la meilleure récupération des biofilms sur les différents matériaux étudiés.

L'essai interlaboratoires réalisé dans le cadre du RMT Actia Chlean pour les deux espèces *L. monocytogenes* et *P. fluorescens* a montré que pour les deux matériaux étudiés (coupons en acier inoxydable ou polyuréthane de même « petite » superficie (8 cm<sup>2</sup>), il n'y avait pas d'impact significatif de la méthode de décrochage. Les taux de décrochage observés étaient équivalents pour la boîte de contact, la chiffonnette, l'éponge ou l'écouvillon (Brauge et al. 2020 <sup>[5]</sup>).

### EN CONCLUSION : QUELQUES RECOMMANDATIONS

- 1 Bien définir les objectifs du plan de contrôle des surfaces ;
- 2 Définir le plan de contrôle (quelles surfaces, à quel moment) ;
- 3 Ne pas hésiter à tester différentes méthodes de prélèvement ;
- 4 Choisir la méthode de prélèvement la plus adaptée en fonction de la superficie à prélever, de la nature des matériaux, et de l'accessibilité ;
- 5 Établir des protocoles précis et former le personnel ;
- 6 Pour la surveillance, lorsqu'un plan de contrôle a été établi, il convient de ne plus le modifier (sauf besoins particuliers), d'échantillonner les mêmes zones et d'utiliser systématiquement la même méthode (y compris le même fournisseur).

PRÉCONISATIONS PRATIQUES	
MÉTHODES	Deux types de méthodes : par empreinte ou par frottis.
PRINCIPE	<p><b>Prélèvement par empreinte :</b> mise en contact de la surface avec une gélose (boîte de contact, lame gélosée biface, Petrifilm®, ou coulage en place).</p> <p><b>Prélèvement par frottis :</b> utilisation d'écouvillons en coton, polyester, rayonne, nylon, ou mousses biseautées, d'éponges ou de chiffonnettes.</p>
DESCRIPTIF	<p>Différents dispositifs sont disponibles dans le commerce ou peuvent être réalisés par le laboratoire (voir fiches descriptives en partie 2).</p> <p>Dans le cadre de contrôle de surfaces après des opérations de nettoyage et désinfection, les milieux de culture doivent contenir une ou plusieurs substances neutralisantes, car il peut subsister des résidus de biocides sur les surfaces.</p>
QUEL DISPOSITIF DE PRÉLÈVEMENT CHOISIR ?	<p>Fonction de la surface à prélever (sèche, humide), de la zone à prélever (taille, accessibilité).</p> <p>Fonction de la flore ou du micro-organisme recherché.</p> <p>(Voir fiches descriptives en partie 2.)</p>
PROTOCOLE D'UTILISATION	<p><b>Réaliser les prélèvements de façon aseptique.</b> Porter des gants à usage unique et stériles si nécessaire. Ne pas manipuler ni contaminer les dispositifs de prélèvement avant usage. Respecter les préconisations d'utilisation des dispositifs de prélèvement.</p> <p><b>Prélever sur l'ensemble de la zone de prélèvement délimitée.</b> Veiller à prélever la totalité de la zone visée même au niveau des anfractuosités, jonctions...</p> <p>Dans la mesure du possible, <b>mesurer la surface prélevée.</b> Des gabarits à usage unique (fortement recommandé afin d'éviter toute contamination croisée) ou autoclavables peuvent être utilisés pour délimiter la surface à prélever. Prévoir autant de gabarits que de zones de surface à prélever, ou dans les cas de gabarits en acier inoxydable, les désinfecter avant de les utiliser sur une autre surface à prélever, afin d'éviter des contaminations croisées.</p> <p><b>Nettoyer les surfaces après le prélèvement</b> pour éliminer toute trace de milieu de culture ou de neutralisant.</p> <p>Stocker les prélèvements pendant 24 heures à 48 heures maximum, au froid (entre +1 et +8 °C) avant analyse.</p>

MÉTHODE D'ANALYSE	<p>Les prélèvements peuvent être destinés à rechercher la présence d'une bactérie pathogène après enrichissement ou à dénombrer une flore ou une espèce cible.</p> <p>Ces analyses peuvent être effectuées par des techniques classiques de microbiologie (détection des bactéries cultivables uniquement) ou par biologie moléculaire (<i>polymerase chain reaction</i> [PCR], détection des bactéries viables cultivables ou non et mortes). La cytométrie en flux peut être utilisée pour la quantification des bactéries viables.</p> <p>Les micro-organismes stressés par les opérations de nettoyage-désinfection peuvent nécessiter l'optimisation des techniques de détection ou de dénombrement (ce qui peut nécessiter des étapes de revivification). Une attention particulière doit être portée sur les bactéries viables non cultivables, pour lesquelles des techniques appropriées doivent être mises en œuvre.</p>
ÉLIMINATION DES DISPOSITIFS DE PRÉLÈVEMENT CONTAMINÉS	Respecter les consignes d'élimination des déchets biologiques.
INFLUENCE DE LA NATURE DU MATÉRIAU	<p>Les prélèvements de surface peuvent être effectués sur tous types de matériaux : acier inoxydable, PVC, Polyuréthane, céramique, résine...</p> <p>Le décrochage des micro-organismes peut dans certains cas être influencé par la nature du matériau. Cela dépend du micro-organisme et de la nature du biofilm (voir chapitre précédent).</p>
INFLUENCE DES PROPRIÉTÉS DE LA SURFACE À PRÉLEVER	<p>Plusieurs facteurs vont influencer le taux de décrochage des micro-organismes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ une surface plane sera plus facile à prélever que des zones incurvées ou au contraire bombées ;</li> <li>■ une surface rugueuse ou présentant des anfractuosités même microscopiques rend le décrochage des micro-organismes plus difficile ;</li> <li>■ l'humidité de la surface est également un facteur important : une surface très humide ou au contraire très sèche peut diminuer le décrochage des cellules microbiennes.</li> </ul>
INFLUENCE DU MANIPULATEUR	Influence de la durée du prélèvement, du nombre de passage et de la pression exercée. Il faut rédiger des protocoles précis et former le personnel, afin de standardiser au mieux les prélèvements.
LIMITES	L'efficacité des méthodes de décrochage est très variable et dépend de nombreux facteurs. Quelle que soit la méthode, il y a une sous-estimation de la quantité de micro-organismes présents sur les surfaces prélevées.
NORMES / GUIDES DE RÉFÉRENCE	<p>Afnor, <i>NF EN ISO 18593-2018, Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement de surfaces</i>, Paris, Afnor, juillet 2018, 15 p. <sup>[1]</sup></p> <p>Midelet (G.), Barre (L.), Brauge (T.), <i>Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of Listeria monocytogenes</i>, Maisons-Alfort, Anses Laboratory for Food Safety, EURL for <i>Listeria monocytogenes</i>, 2021, sous presse, 11 p. <sup>[16]</sup></p>

## PARTIE II FICHES DESCRIPTIVES

Cinq fiches descriptives sont fournies :

**TROIS FICHES CORRESPONDENT À DES MÉTHODES DE PRÉLÈVEMENT PAR EMPREINTE**

**1** Fiche boîtes contact, lame biface

**2** Fiche Petrifilm®

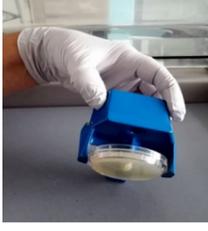
**3** Fiche coulage de gélose en place

**DEUX FICHES CORRESPONDENT À DES MÉTHODES DE PRÉLÈVEMENT PAR FROTTIS**

**4** Fiche écouvillons, mousse biseautée

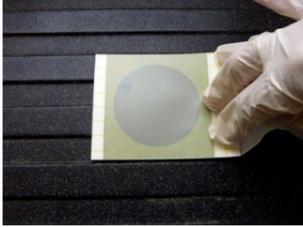
**5** Fiche chiffonnette, éponge

## FICHE N° 1

MÉTHODE	BOÎTES CONTACT (BOÎTES DE ROZIER-PANTALÉON OU <i>REPLICATE ORGANISM DETECTION AND COUNTING</i> , RODAC) / LAMES BIFACES
PRINCIPE	Prélèvement par empreinte
DESCRIPTIF	<p>Il existe différents modèles de lames bifaces ou de boîtes précoulées disponibles dans le commerce avec ou sans neutralisant. Ces géloses sont destinées au dénombrement de la flore aérobie mésophile, des levures moisissures, des streptocoques fécaux, des staphylocoques, des entérobactéries ou des coliformes.</p>  <p>Il est également possible de se procurer des boîtes de Petri vides (55 mm de diamètre) et de couler le milieu gélosé, de manière à ce qu'il dépasse le bord de la boîte sous la forme d'un ménisque convexe, permettant le développement du micro-organisme recherché.</p> <p><i>Rappel: dans le cadre du contrôle de surfaces après des opérations de nettoyage et désinfection, les milieux de culture doivent contenir un ou plusieurs neutralisants de ces produits ou de leurs résidus (ISO 18593 <sup>[62]</sup>).</i></p>
CONDITIONS DE CONSERVATION AVANT UTILISATION	Avant utilisation, stocker les boîtes contact à + 4 °C à l'abri de la lumière, jusqu'à trois semaines pour les boîtes coulées sur place, ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage pour les boîtes achetées dans le commerce.
PROTOCOLE D'UTILISATION	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Appliquer la gélose sur la surface à prélever et exercer une pression définie durant une durée déterminée (par exemple 500 g durant 10 secondes), pour une meilleure reproductibilité (NF EN ISO 18593 <sup>[62]</sup>).</li> <li>Des dispositifs de type « Applicateur » permettant d'appliquer une pression standardisée sont disponibles dans le commerce.</li> <li>■ Après avoir procédé au prélèvement, remettre rapidement le couvercle sur la boîte ou la lame dans son étui et l'identifier précisément.</li> <li>■ Nettoyer les surfaces de prélèvement.</li> <li>■ Stocker pendant 24 à 48 heures au maximum les boîtes entre 1 et 8 °C après les prélèvements avant incubation.</li> </ul>
QUELLE SURFACE PRÉLEVER ?	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ La boîte contact peut être utilisée pour un contrôle sur des surfaces sèches. Sur des surfaces humides, en cas de contaminations importantes, la lecture des boîtes devient impossible du fait de la formation d'un tapis bactérien.</li> <li>■ Méthode adaptée pour les petites surfaces planes, non poreuses et accessibles.</li> <li>■ Méthode adaptée aux surfaces faiblement contaminées en micro-organismes (préférentiellement après N &amp; D).</li> <li>■ Méthode moins bien adaptée aux matériaux rugueux ou présentant des anfractuosités.</li> </ul>

PROTOCOLE D'ANALYSE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber les boîtes à la température optimale de croissance du micro-organisme recherché (durée d'incubation selon le milieu utilisé et les préconisations du fournisseur).</li> <li>Compter le nombre de colonies (Unités formant colonies = UFC) caractéristiques du micro-organisme recherché présentes après incubation (au maximum 150 colonies pour une boîte de 55 mm de diamètre).</li> </ul>
SEUIL DE QUANTIFICATION	1 UFC par boîte à ramener à la surface prélevée en cm <sup>2</sup> (tenir compte du diamètre de la boîte).
SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE : TAUX DE DÉCROCHAGE	Décrochage ++
INFLUENCE DU MANIPULATEUR	Influence de la durée du contact et de la pression exercée.
COÛT CONSOMMABLES	Moins de deux euros HT.
LES +	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peu de manipulation.</li> <li>Pas de nécessité de port de gants stériles.</li> <li>Rapide et facile à mettre en œuvre.</li> <li>Utilisable pour tous types de micro-organismes (dépend du choix du milieu de dénombrement).</li> <li>Possibilité de préparer ses propres boîtes de contact.</li> <li>Standardisation de la pression lors du prélèvement plus aisée que pour d'autres méthodes de prélèvement.</li> </ul>
LES -	<ul style="list-style-type: none"> <li>Non recommandé sur des surfaces humides.</li> <li>Non recommandé sur des surfaces rugueuses.</li> <li>En cas de surface très contaminée, les boîtes ou les lames sont rapidement illisibles.</li> <li>Une boîte spécifique par germe.</li> <li>Pas d'enrichissement possible (dénombrement uniquement).</li> <li>Taille de la superficie de prélèvement faible.</li> </ul>
RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE	Afnor, <i>NF EN ISO 18593-2018, Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement de surfaces</i> , Paris, Afnor, juillet 2018, 15 p. <sup>[1]</sup>

## FICHE N° 2

MÉTHODE	LE PETRIFILM®
PRINCIPE	Prélèvement par empreinte
DESSCRIPTIF	<p>Dispositif commercialisé par 3M constitué de deux films : un film à mettre en contact avec la surface à prélever (surface de 20 à 30 cm<sup>2</sup>) et un film contenant le milieu nutritif. Il existe différents Petrifilms® en fonction de la flore à dénombrer :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>flore totale aérobie ;</li> <li>coliformes ;</li> <li>entérobactéries ;</li> <li><i>Escherichia coli</i> ;</li> <li><i>Listeria sp</i> ;</li> <li>Staphylocoques ;</li> <li>levures/ moisissures ;</li> <li>bactéries lactiques ;</li> <li>.....</li> </ul>
CONDITIONS DE CONSERVATION AVANT UTILISATION	La durée de conservation est de 12 à 18 mois à +4 °C.
PROTOCOLE D'UTILISATION	<ul style="list-style-type: none"> <li>Soulever le film supérieur et réhydrater le film inférieur du Petrifilm® avec 1 ml de diluant (eau distillée, eau distillée avec neutralisant). Laisser pendant 10 secondes pour que la réhydratation s'opère.</li> <li>Appliquer la gélose sur la surface à prélever (il existe un dispositif de type « Applicateur », pour exercer une pression durant 1 à 2 secondes) puis recouvrir rapidement la gélose avec le film, en prenant soin de ne pas avoir laissé de bulles, sans toucher ni endommager la gélose ; l'identifier précisément.</li> <li>Stocker les films au froid (+ 4 °C) après les prélèvements et procéder à l'incubation dans les 24 heures.</li> <li>Nettoyer les surfaces de prélèvement.</li> </ul>
	 <p>Utilisation d'un Petrifilm® 3M® lactique en vue d'un prélèvement de surface (©Actalia)</p>

QUELLE SURFACE PRÉLEVER ?	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le Petrifilm® peut être utilisé pour des contrôles sur surfaces sèches (sur des surfaces humides, en cas de contaminations importantes, le Petrifilm® devient rapidement illisible, car se forme alors un tapis bactérien).</li> <li>Méthode adaptée pour des surfaces planes, ou de forme bombée ou incurvées du fait de la souplesse du film.</li> <li>Méthode moins bien adaptée aux matériaux rugueux ou présentant des anfractuosités.</li> </ul>
PROTOCOLE D'ANALYSE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber les Petrifilms® à la température appropriée.</li> <li>Compter le nombre de colonies (Unités formant colonies = UFC) caractéristiques du micro-organisme recherché, présentes après incubation.</li> </ul>
SEUIL DE QUANTIFICATION	1 UFC par Petrifilm® à ramener à la surface prélevée en cm <sup>2</sup> (tenir compte du diamètre du Petrifilm®).
SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE : TAUX DE DÉCROCHAGE	Décrochage ++ Décrochage + pour des surfaces rugueuses
INFLUENCE MANIPULATEUR ?	Influence de la durée du contact et de la pression exercée.
COÛT CONSOMMABLES	Moins de trois euros HT.
LES +	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peu de manipulation.</li> <li>Pas de nécessité de port de gants stériles.</li> <li>Mise en œuvre simple et rapide.</li> <li>Utilisable pour certaines flores (dépend du choix du Petrifilm®).</li> <li>Prêt à l'emploi.</li> <li>Peu encombrant.</li> </ul>
LES -	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peu efficace sur des surfaces humides</li> <li>Peu efficace sur des surfaces rugueuses</li> <li>Pas d'enrichissement possible/dénombrement</li> <li>Impossible d'utiliser un neutralisant</li> <li>Taille de la superficie à prélever faible</li> </ul>

## FICHE N° 3

MÉTHODE	LE COULAGE DE GÉLOSE EN PLACE
PRINCIPE	Prélèvement par empreinte
DESRIPTIF	Mise en contact d'un milieu nutritif coulé sous forme liquide (gélose surfondue), directement sur la surface à échantillonner, en vue d'en effectuer un moulage.
CONDITIONS DE CONSERVATION AVANT UTILISATION	Les géloses préparées à l'avance peuvent être conservées à +4 °C durant un mois.
PROTOCOLE D'UTILISATION	<ul style="list-style-type: none"> <li>La gélose liquide en surfusion est versée en quantité suffisante afin d'englober l'ensemble de la surface à étudier. Le moulage ainsi réalisé est solidifié à température ambiante avant : <ul style="list-style-type: none"> <li>soit d'être démoulé puis incubé ;</li> <li>soit, de préférence, d'être placé (équipement + gélose) en étuve pour incubation, la phase de démoulage se faisant après l'incubation (méthode plus sensible permettant une meilleure détection).</li> </ul> </li> </ul>
FACILITÉ DE MISE EN ŒUVRE	Facile à mettre en œuvre mais suppose parfois une bonne dextérité pour réaliser le démoulage ; nécessite de disposer de milieux de culture en flacons, parfois en gros volumes selon la surface à échantillonner et d'un bain-marie pour mettre le milieu en surfusion.
QUELLE SURFACE PRÉLEVER ?	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cette méthode est applicable à toutes surfaces non planes et est particulièrement adaptée aux surfaces difficilement accessibles avec d'autres méthodes de prélèvements, telles que tuyaux, vannes, pompes... ainsi qu'aux surfaces présentant des anfractuosités.</li> <li>Bien nettoyer et désinfecter la surface prélevée.</li> </ul>
PROTOCOLE D'ANALYSE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incuber la gélose démoulée ou l'ensemble (équipement + gélose) à une température appropriée.</li> <li>Compter le nombre de colonies viables cultivées en surface du moulage. La gélose peut être additionnée d'un indicateur coloré pour faciliter la lecture. Le résultat est exprimé, soit en UFC par unité de surface, soit par pourcentage de surface présentant un virage colorimétrique. La position des colonies sur le moulage indique de surcroît la position précise de la colonie dans l'équipement.</li> </ul>



Bol d'échangeur à plaques - ©Inrae  
Les colonies de *Geobacillus stearothermophilus* apparaissent en rouge sur le milieu TSA additionné de chlorure de triphényltétrazolium.

SEUIL DE QUANTIFICATION	Une bactérie par surface prélevée.
SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE : TAUX DE DÉCROCHAGE	+++ Autorise en outre une localisation très précise de la contamination.
INFLUENCE DU MANIPULATEUR	Très importante pour l'extraction de la gélose (en cas de géométries complexes).
INFLUENCE DU MATÉRIAU	Faible.
COÛT CONSOMMABLES	1 à 5 euros HT selon la taille de l'équipement à tester.
LES + 	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Mise en œuvre simple et rapide.</li> <li>■ Utilisable pour certaines flores (dépend du choix du milieu gélosé).</li> <li>■ Permet d'échantillonner des surfaces peu accessibles ou d'architecture complexe.</li> </ul>
LES - 	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ En fonction de la composition, les milieux utilisés peuvent être non alimentaires et nécessiter des précautions d'emploi sur les surfaces (nettoyage après utilisation).</li> <li>■ Démoulage parfois délicat.</li> <li>■ Nécessité de port de gants stériles si le démoulage est réalisé avant incubation. (rappel : il est préférable de réaliser le démoulage après incubation, ce qui ne nécessite pas le port de gants stériles).</li> <li>■ Être vigilant à la température de surfusion qui ne doit pas excéder 48 °C pour la détection des bactéries non sporulées. Si la température de surfusion de la gélose est proche de 60 °C, seule les bactéries sporulées sont détectées.</li> </ul>
RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE	Bénézech (T.), Lelièvre (C.), Membré (J.-M.), Viet (A.-F.) et Faille (C.), <i>A new test method for in-place cleanability of food processing equipment</i> , Philadelphia, Elsevier, <i>Journal of Food Engineering</i> , volume 54 (1), août 2002, p. 7-15. <sup>[62]</sup> 4

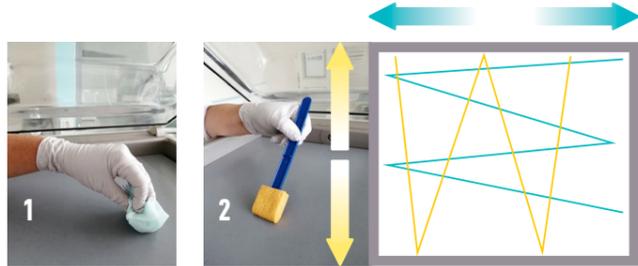
## FICHE N° 4

MÉTHODE	ÉCOUVILLON
PRINCIPE	Prélèvement par frottis
DESRIPTIF	<p>Il existe différents types d'écouvillons stériles disponibles dans le commerce, constitués d'une tige et d'une zone de prélèvement en :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ coton ;</li> <li>■ rayonne ;</li> <li>■ fibre de polyester (synthétique ou naturelle) ;</li> <li>■ nylon floqué ;</li> <li>■ mousse polyester biseautée.</li> </ul> <p>On trouve des écouvillons avec des indicateurs colorés permettant, par exemple, la détection des salmonelles.</p> <p>Les écouvillons peuvent être :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ secs : à utiliser tels quels sur des surfaces humides (sauf si l'ajout de neutralisant est nécessaire) ou à imbiber avant emploi avec le diluant stérile de son choix : eau peptonée salée, solution peptonée, eau peptonée tamponnée ou solution de <i>Ringer</i> diluée au quart) additionnée ou non de neutralisant (selon l'étape du procédé) ;</li> <li>■ pré-humidifiés ou humidifiés pour les surfaces sèches (sauf si un apport d'humidité est proscrit) préférentiellement.</li> </ul>
CONDITIONS DE CONSERVATION AVANT UTILISATION	Avant utilisation, le stockage des écouvillons se fait à température ambiante ou entre 2 et 8 °C. Pour les mousses, respecter les recommandations du fournisseur. Bien respecter la date de péremption indiquée par le fabricant.
PROTOCOLE D'UTILISATION	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ouvrir le sachet ou le tube, sortir l'écouvillon pour faire un prélèvement aseptique des surfaces selon les indications ci-dessous. L'utilisation de gabarits stériles est recommandée, lors de prélèvements de surfaces planes afin de délimiter la zone prélevée. Il existe des gabarits à usage unique (fortement recommandé afin d'éviter toute contamination croisée) ou autoclavables 10x10 ou 5x5 cm.</li> <li>■ Faire des stries dans deux directions perpendiculaires, en tournant régulièrement l'écouvillon et en exerçant une légère pression sur l'écouvillon. Par exemple, passer jusqu'à 10 fois de droite à gauche et 10 fois de haut en bas, de manière à prélever sur un maximum de la surface délimitée. Veiller à prélever la totalité de la zone visée, même au niveau des anfractuosités, jonctions...</li> </ul> <p><i>Remarque: l'utilisation de deux écouvillons successifs (double écouvillonnage) pour réaliser un prélèvement donnerait de meilleurs résultats qu'un simple écouvillonnage (Garry, 1996) <sup>[62]</sup>9</i></p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;">  <div> <p>Une fois le prélèvement réalisé, introduire l'écouvillon dans un sac à prélèvement stérile ou dans le tube d'origine. Refermer hermétiquement et identifier précisément le sac ou le tube. Stocker les écouvillons au froid (entre +1 et 8 °C) jusqu'à l'analyse. Réaliser les analyses dans les 24 heures suivant le prélèvement. Ce délai peut être prolongé de 24 heures de stockage à 3 °C ± 2 °C par le laboratoire d'analyse (NF EN ISO 18593) <sup>[62]</sup>1.</p> <p><i>Passage d'un écouvillon en coton (°Anses, LSAI B3PA)</i></p> </div> </div>

FACILITÉ DE MISE EN ŒUVRE	Très facile à utiliser
QUELLE SURFACE PRÉLEVER ?	L'écouvillon peut être utilisé pour des contrôles sur de petites surfaces ( $\leq 100 \text{ cm}^2$ ), sèches ou humides, et permet d'échantillonner les zones difficilement accessibles.
PROTOCOLE D'ANALYSE	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ajouter une quantité suffisante de diluant pour recouvrir l'écouvillon (e.g. 9 à 10 ml).</li> <li>■ Homogénéiser le contenu, par exemple à l'aide d'un agitateur de type vortex, durant une minute, à puissance maximale. Dans le cas d'un écouvillon dans un tube avec liquide, le remettre dans le tube d'origine.</li> <li>■ À partir de la suspension ainsi obtenue, réaliser les dénombrements selon les modes opératoires décrits dans l'ISO 6887 <sup>[1]</sup> 2.</li> </ul>
SEUIL DE QUANTIFICATION	<p>À déterminer selon la procédure employée. Il est exprimé en nombre d'UFC par surface prélevée ou par <math>\text{cm}^2</math> si la surface prélevée a pu être mesurée.</p> <p><math>N = (n \cdot V / S) \cdot d</math></p> <p><b>n</b> : nombre de colonies par ml  <b>V</b> : volume de diluant ajouté  <b>S</b> : surface en <math>\text{cm}^2</math> (surface non mesurée, <b>S</b> = 1)  <b>d</b> : inverse de la dilution utilisée</p> <p><b>Exemple de calcul</b> : prélèvement d'une surface non mesurée/contamination présente sur l'écouvillon remise en suspension dans 9 ml de diluant/1 ml de cette dilution est ensemencé pour le dénombrement/20 colonies sont dénombrées après incubation <b>n</b> = 20 colonies ; <b>V</b> = 9 ml ; <b>S</b> = 1 → <b>N</b> = 180 UFC par surface prélevée.</p> <p>Le seuil de quantification est de 9 UFC par surface prélevée (une colonie dénombrée).</p>
SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE : TAUX DE DÉCROCHAGE	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Décrochage ++</li> <li>■ Rétention de cellules dans l'écouvillon parfois démontrée.</li> </ul>
INFLUENCE DU MANIPULATEUR	Influence du nombre de stries par surface (à standardiser) et de la pression exercée sur l'écouvillon.
COÛT CONSOMMABLES	De 1 à 4 euros HT. (varie selon le type d'écouvillon et si l'on utilise des gabarits à usage unique).
LES +	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Prélèvements de surfaces difficiles d'accès.</li> <li>■ Utilisable pour tous types de micro-organismes (dépend du choix du milieu de dénombrement).</li> <li>■ Choix possible du diluant, avec ou sans neutralisant.</li> <li>■ Possibilité de réaliser des enrichissements si le diluant ne contient pas de neutralisant.</li> </ul>

LES -	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ne peut être adapté qu'à des petites surfaces &lt; 100 <math>\text{cm}^2</math>.</li> <li>■ Il est nécessaire d'exercer une pression constante sur l'écouvillon lors du prélèvement.</li> <li>■ Certains écouvillons ayant des tiges très souples, il est difficile d'exercer une pression suffisante.</li> </ul>
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	<p>Afnor, <i>NF EN ISO 18593-2018, Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement de surfaces</i>, Paris, Afnor, juillet 2018, 15 p. <sup>[1]</sup></p> <p>Afnor, <i>NF EN ISO 6887-V08-010, Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique</i>, Paris, Afnor, 4 juin 2017, 17 p. <sup>[2]</sup></p>

## FICHE N° 5

MÉTHODE	CHIFFONNETTE - ÉPONGE
PRINCIPE	Prélèvement par frottis
DESCRIPTIF	<p>Il existe deux types de chiffonnettes ou éponges disponibles dans le commerce :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ sèches : à utiliser telles quelles sur des surfaces humides ou à imbiber avant emploi avec le diluant stérile de son choix : eau peptonée salée, solution peptonée, eau peptonée tamponnée ou solution de Ringer diluée au quart, additionné ou non de neutralisant (selon l'étape du procédé) ;</li> <li>■ pré-humidifiées à l'aide de diluant stérile avec ou sans neutralisant. À utiliser pour les prélèvements sur des surfaces sèches préférentiellement.</li> </ul> <p>À noter que certaines éponges sont fournies avec un manche facilitant les prélèvements sur les surfaces (voir photo n° 2 ci-dessous).</p>
CONDITIONS DE CONSERVATION AVANT UTILISATION	Avant utilisation, le stockage des chiffonnettes et éponges se fait à température ambiante à l'abri de la lumière. Bien respecter la date de péremption indiquée par le fabricant.
PROTOCOLE D'UTILISATION	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ouvrir le sachet, sortir la chiffonnette ou l'éponge de son sachet de manière aseptique avec des gants ou des pinces stériles ou la tenir à travers le sachet et retourner le sachet sur la main (afin de s'en servir comme un gant). Prélever la surface choisie en changeant la face de l'éponge/chiffonnette et en maintenant une certaine pression favorisant le décrochage mécanique.</li> <li>■ Réaliser le prélèvement sur la surface en passant 4 fois de droite à gauche et 4 fois de haut en bas de manière à prélever sur un maximum de la surface délimitée (deux directions perpendiculaires).</li> </ul>  <p>Passage d'une chiffonnette ou d'une éponge avec schéma de prélèvement dans les deux directions perpendiculaires (©Anses, LSAI B3PA)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Une fois le prélèvement réalisé, remettre stérilement l'éponge ou la chiffonnette dans le sachet en plastique ou tout autre récipient stérile, le refermer hermétiquement et l'identifier précisément.</li> <li>Stocker la chiffonnette ou l'éponge au froid (entre +1 et 8 °C) et réaliser les analyses dans les 24 heures suivant le prélèvement. Ce délai peut être prolongé de 24 heures de stockage à 3 °C ± 2 °C par le laboratoire d'analyse (NF EN ISO 18593 <sup>[1]</sup>)</li> </ul>

FACILITÉ DE MISE EN ŒUVRE	Facile à mettre en œuvre.
QUELLE SURFACE PRÉLEVER ?	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ La chiffonnette ou l'éponge peuvent être utilisées pour des contrôles sur surfaces sèches ou humides.</li> <li>■ Adaptée pour des prélèvements sur de grandes surfaces (supérieures à 100 cm<sup>2</sup>, allant de 1000 à 3000 cm<sup>2</sup>) (NF EN ISO 18593 <sup>[1]</sup>).</li> <li>■ Des manches à chiffonnette permettent d'atteindre des endroits difficilement accessibles (photo n° 2).</li> </ul>
PROTOCOLE D'ANALYSE	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Ajouter une quantité appropriée de diluant pour recouvrir l'éponge ou la chiffonnette. Homogénéiser le contenu, par exemple au <i>Stomacher</i> durant une minute.</li> <li>■ À partir de la suspension ainsi obtenue, réaliser les dénombrements ou enrichissement selon les modes opératoires décrits dans l'ISO 6887 <sup>[2]</sup>.</li> </ul>
SEUIL DE QUANTIFICATION	<p>À déterminer selon la procédure employée. Il est exprimé en nombre d'UFC par chiffonnette ou éponge par surface prélevée ou par cm<sup>2</sup>.</p> <p><math>N = (n \cdot V / S) \cdot d</math>  <math>n</math> : nombre de colonies par ml  <math>V</math> : volume de diluant ajouté  <math>S</math> : surface en cm<sup>2</sup> (surface non mesurée, <math>S = 1</math>)  <math>d</math> : inverse de la dilution utilisée</p> <p><b>Exemple de calcul :</b> prélèvement d'une surface de 100 cm<sup>2</sup> / contamination présente sur l'écouvillon ou l'éponge remise en suspension dans 90 ml de diluant / 1 ml de cette dilution est ensemencé pour le dénombrement / 20 colonies sont dénombrées après incubation  <math>n = 20</math> colonies ; <math>V = 90</math> ml ; <math>S = 100</math> cm<sup>2</sup> → <math>N = 18</math> UFC par cm<sup>2</sup>.</p> <p>Le seuil de quantification est de 0,9 UFC par cm<sup>2</sup> (une colonie dénombrée).</p>
SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE : TAUX DE DÉCROCHAGE	<p>Décrochage ++            Toutefois, rétention possible de cellules dans la chiffonnette ou l'éponge lors de la remise en suspension.</p> <p><b>Remarque :</b> en prélevant au même endroit avec plusieurs chiffonnettes successivement (3 ou 5 fois), il est possible d'améliorer le décrochage.</p>
INFLUENCE DU MANIPULATEUR	Impact du nombre de passage et de la pression exercée.
COÛT CONSOMMABLES	De 1,5 à 3 euros HT la chiffonnette/éponge. Compter en plus le coût du manche (en option).

<p>LES +</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Prélèvements de grandes surfaces humides ou sèches.</li> <li>■ Utilisables pour tous les micro-organismes (dépend du choix du milieu de dénombrement).</li> <li>■ Possibilité de réaliser des enrichissements.</li> <li>■ Choix possible du diluant avec ou sans neutralisant.</li> <li>■ Pour une même surface on peut passer plusieurs lingettes successives pour améliorer le décrochage.</li> </ul>
<p>LES -</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Attention aux contaminations lors du prélèvement. L'opérateur doit manipuler la chiffonnette ou l'éponge de manière aseptique, à l'aide de gants ou de pinces stériles.</li> <li>■ Exercer une pression constante lors du prélèvement.</li> </ul>
<p>RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE</p>	<p>Afnor, <i>NF EN ISO 18593-2018, Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement de surfaces</i>, Paris, Afnor, juillet 2018, 15 p. <sup>[1]</sup></p>

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1]** Afnor,  
*NF EN ISO 18593-2018, Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement de surfaces*,  
Paris, Afnor, juillet 2018, 15 p.
- 2]** Afnor,  
*NF EN ISO 6887, Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*,  
Paris, Afnor, 4 juin 2017, 17 p.
- 3]** Bénézec (T.), Bourion (F.), Carpentier (B.), Curiel (G.-J.), Faille (C.), Gustavsson (P.), Hermon (C.), Hofmann (J.), Kastelein (J.), Kold (J.), Timperley (A.-W.), Wirtanen (G.),  
*Méthodes d'évaluation de l'aptitude au nettoyage en place d'équipements pour les industries alimentaires. Guide technique EHEDG*,  
Laval, guide technique EHEDG, doc 2, 3<sup>e</sup> édition, juillet 2004 complétée en juin 2007.
- 4]** Bénézec (T.), Lelièvre (C.), Membré (J.-M.), Viet (A.-F.) et Faille (C.),  
*A new test method for in-place cleanability of food processing equipment*,  
Philadelphia, Elsevier, *Journal of Food Engineering*, volume 54 (1), août 2002, p. 7-15.
- 5]** Brauge (T.), Barre (L.), Leleu (G.), André (S.), Denis (C.), Hanin (A.), Fréaux (B.), Guilbaud (M.), Herry (J.-M.), Oulahal (N.), Nager (B.), Soumet (C.), Midelet (G.),  
*European survey and Evaluation of sampling methods recommended by EN ISO 18593 for detection of Listeria monocytogenes and Pseudomonas fluorescens on industrial surfaces*,  
Oxford, *FEMS Microbiology Letters*, volume 367, issue 7, avril 2020, p. 1-6.
- 6]** Brauge (T.), Faille (C.), Leleu (G.), Denis (C.), Hanin (A.), Midelet (G.),  
*Treatment with disinfectants may induce an increase in viable but non culturable populations of Listeria monocytogenes in biofilms formed in smoked salmon processing environments*,  
Philadelphia, Elsevier, *Food Microbiology*, volume 92, décembre 2020, 103548, 6 p.
- 7]** Faille (C.), Lamour (J.-B.), Clarisse (M.), Rossi (N.), Hannequin (M.), Chéné (C.),  
*Validation des procédures de nettoyage et désinfection*,  
Paris, Éditions Ad hoc, *Industries agricoles et alimentaires*, mai juin 2014, p. 38-41.
- 8]** Faille (C.), Brauge (T.), Leleu (G.), Hanin (A.), Denis (C.), Midelet (G.),  
*Comparison of the performance of the biofilm sampling methods (swab, sponge, contact agar) in the recovery of Listeria monocytogenes populations, considering the seafood environment conditions*,  
Philadelphia, Elsevier, *International Journal of Food Microbiology*, volume 325, 16 juillet 2020, 7 p.

- 9]** Garry (P.), Gensdarmes (F.), Gonzalez (R.) et Vendœuvre (J.-L.), *Étude comparative de différentes techniques de contrôle microbiologique de surface*, Viandes et produits carnés, volume 17 (6), 1996, p. 275-276.
- 10]** Garry (P.), *Nettoyage-désinfection : étude comparative des méthodes de surveillance*, Rapport d'étude Ifip (Institut du porc) 2009, 25 p.
- 11]** Gomez (D.), Arino (A.), Carraminana (J.-J.), Rota (C.) & Yanguela (J.), *Comparison of sampling procedures for recovery of Listeria monocytogenes from stainless steel food contact surfaces*, USA, Des Moines, International Association for Food Protection, *Journal of Food Protection*, volume 75, juin 2012, p. 1077-1082.
- 12]** Kovacevic (J.), Bohaychuk (V.-M.), Barrios (P.-R.), Gensler (G.E.), Rolheiser (D.-L.) & McMullen (L.-M.), *Evaluation of environmental sampling methods and rapid detection assays for recovery and identification of Listeria spp. from meat processing facilities*, USA, Des Moines, International Association for Food Protection, *Journal of Food Protection*, volume 72, avril 2009, p. 696-701.
- 13]** Krauter (P.-A.), Piepel (G.-F.), Boucher (R.), Tezak (M.), Amidan (B.-G.) & Einfeld (W.), *False-negative rate and recovery efficiency performance of a validated sponge wipe sampling method*, Washington, American Society for Microbiology, *Apply & Environmental Microbiology*, volume 78, 2 décembre 2011, p. 846-854.
- 14]** López (D.), Vlamakis (H.) & Kolter (R.), *Biofilms*, USA, Cold Spring Harbor, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 juin 2010, 12 p.
- 15]** Luyckx (K.), Dewulf (J.), Van Weyenberg (S.), Herman (L.), Zoons (J.), Vervae (E.), Heyndrickx (M.), & De Reu (K.), *Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses*, Philadelphia, Elsevier, *Poultry Science*, volume 94, issue 4, 1<sup>er</sup> avril 2015, p. 740-749.
- 16]** Midelet (G.), Barre (L.), Brauge (T.), *Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort, Anses Laboratory for Food Safety, EURL for *Listeria monocytogenes*, 2021, sous presse, 11 p.
- 17]** Probst (A.), Facius (R.), Wirth (R.) & Moissl-Eichinger (C.), *Validation of a nylon-flocked-swab protocol for efficient recovery of bacterial spores from smooth and rough surfaces*, Washington, American Society for Microbiology, *Apply & Environmental Microbiology*, volume 76, n° 15, août 2010, p. 5148-5158.
- 18]** République française, *Loi Egalim n° 2018-938 du 30 octobre 2018 pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous*, JORF n° 0253 du 1<sup>er</sup> novembre 2018, 175 p.





**CHLEAN**

HYGIÈNE DES ÉQUIPEMENTS

## PLUS D'INFORMATIONS SUR LE RMT ACTIA CHLEAN



**MINISTÈRE  
DE L'AGRICULTURE  
ET DE L'ALIMENTATION**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*



**ACTIA**

**ACTIA, LE RÉSEAU FRANÇAIS  
DES INSTITUTS TECHNIQUES DE L'AGRO-ALIMENTAIRE**

16 rue Claude-Bernard. 75 231 Paris Cedex 05  
Téléphone : 01 44 08 86 20. Fax : 01 44 08 86 21  
Courriel : [actia@actia-asso.eu](mailto:actia@actia-asso.eu). Site web : [www.actia-asso.eu](http://www.actia-asso.eu)

*Avec le soutien financier du ministère chargé de l'Agro-alimentaire*

**COORDINATION DU RMT ACTIA CHLEAN**

**CTCPA**  
Rue de la Géraudière, B.P. 62 241. 44 322 Nantes Cedex  
Téléphone : 02 40 40 46 49. [www.ctcpa.org](http://www.ctcpa.org)