**Techniques d’analyses pour le contrôle de l’efficacité du nettoyage-désinfection des surfaces inertes**

1. **Matériels de prélèvements et d’analyses microbiologiques des surfaces : dénombrement de la flore totale**
* Ecouvillons stériles
* Gabarits spécifiques de 10 cm2  pour chaque surface
* Alcool
* Bec bunsen
* Gants stériles
* Matériel de stérilisation composé d’un autoclave et d’un bec bunsen.
* Une étuve à 30°C.
* Un bain-marie et le bec bunsen pour régénérer le milieu de culture semi-solide afin de le couler dans des boites de pétri.
* Pipettes ou micropipettes automatiques, des tubes à essai.
* Des boites de pétri.
* Des portoirs.
* Milieux de culture : PCA, TSE.
* Deux réactifs : lécithine et Tween 80.
1. **Mode de prélèvement des échantillons**

Concernant la première méthode, les échantillons ont été prélevés selon les dispositions de la réglementation française par la technique de l'écouvillonnage humide d’une surface de 10 cm2 délimitée par un gabarit stérile spécifique pour chaque surface, Ces écouvillons se présentent sous forme de cotons-tiges stériles protégés par des étuis plastiques.

Cette technique comprend les étapes suivantes :

* ouvrir le tube, sortir l’écouvillon,
* humidifier l’écouvillon dans un millilitre de solution NaCl peptone à 0,1% (TSE), 30 g/l de Tween 80 et 3 g/l de lécithine ont été ajoutés à la solution d’humidification des écouvillons comme neutralisants.
* écouvillonner la surface à tester en frottant dix fois verticalement et dix fois horizontalement en appuyant fermement sur la surface tout en tournant l’écouvillon dans les deux sens, l’angle de prélèvement est de 45°, une pression constante a été appliquée pendant la totalité du prélèvement .
* replacer soigneusement l’écouvillon dans l’étui en évitant qu’il ne frotte sur les parois sans toucher l’ouverture de l’étui.
* noter sur l’étui la date du prélèvement et le type de surface.

L’ajout de Tween et de lécithine à la solution d'humidification permet la neutralisation de l’activité bactéricide du détergent chloré, permettant ainsi le dénombrement des bactéries cultivables restantes après le traitement de désinfection.

1. **Préparations des échantillons**

Chaque écouvillon est alors transféré dans un tube en verre contenant 10 ml d’eau physiologique, puis soumis à une homogénéisation pendant 30 secondes à l’aide d’un vortex. Cette technique est inspirée de la norme ISO 18593.

Pour déterminer la quantité de microorganismes adsorbés sur un écouvillon, des dilutions en série au dixième sont réalisées dans de l’eau physiologique conformément à la norme ISO 6887-1 relatives aux règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. Puis, 0.1 ml de la solution mère (100 : car la solution mère est considérée comme une prise d’essai) ainsi que de chacune des dilutions est ensemencée en surface (par étalement) sur le milieu gélosé PCA (Plate Count Agar) dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Le nombre d’Unités Formant Colonies (UFC) est évalué après 72 h d’incubation à 30 ± 2 °C en aérobiose. Les colonies sont dénombrées avec une limite de lisibilité de 300 UFC par boîte de Pétri.

Les résultats des charges microbiennes sont exprimés en UFC/cm2 selon la norme ISO 18593.

Pour calculer le nombre de microorganismes dénombrés à 30°C par cm2, nous avons utilisé la formule suivante selon la norme ISO 18593:

 Ns= (N x F) / A

Ns: nombre de colonies par centimètre carré de la surface contrôlée;

N: nombre des UFC par millilitre de la solution mère ;



F : volume en millilitres de la solution mère ;

A: surface contrôlée en centimètre carré.