

MICROBIOLOGIE

Le serpent de mer des conditions d'incubation

P.61

HÔPITAL

Les principaux enjeux de la révision de la norme NF S90-351

P.42

FAITS & GESTES

→ Contamin@Lyon, deux jours pour faire le point sur les fondamentaux de la salle propre

→ L'Afnor publie la version française de l'ISO/TR 14644-21

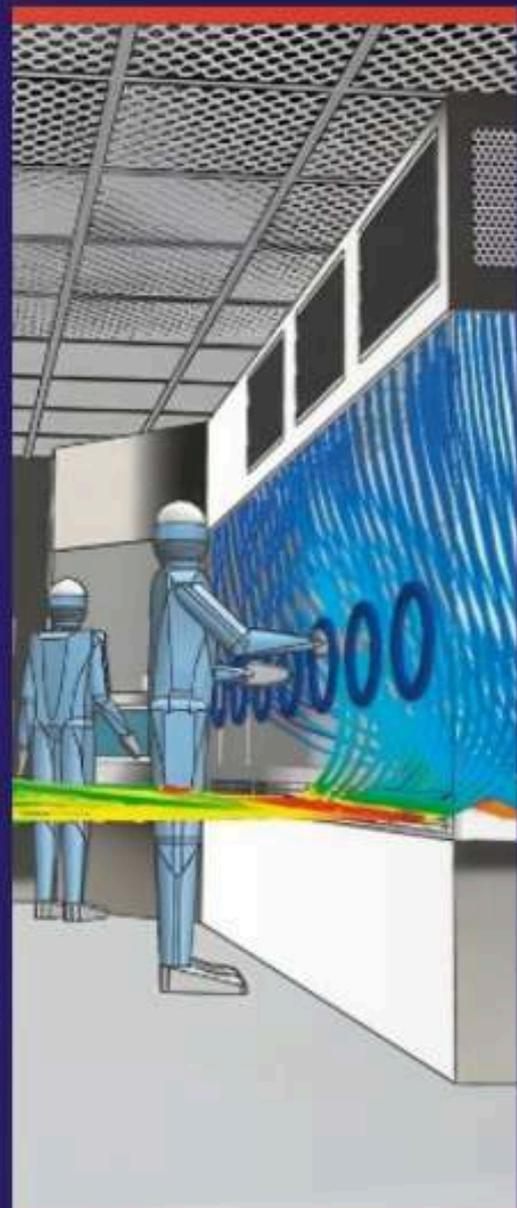
P.8

FÉVRIER-MARS 2024 NUMÉRO 143

BIMESTRIEL ISSN 1291-6978

SALLES PROPRES

N°143 LE MAGAZINE DE LA MAÎTRISE DE LA CONTAMINATION



DOSSIER

Économies d'énergie : comment aller plus loin ?

FOCUS

SIMULATION NUMÉRIQUE

P.49

ILS ONT PARTICIPÉ À CE NUMÉRO



16

Vincent Barbier
Pharmaplan SAS

Spécialiste QVA

Contact

21 rue du Faubourg Saint-Antoine
75011 Paris
Tél. : 06 74 71 51 00
E-mail :
vincent.barbier@pharmaplan.com
www.pharmaplan.com

Rodolphe Henriette, Novo Nordisk



22

Emmanuel Dupas
Dalkia - groupe EDF

Spécialiste Q/A, pôle Expertise
technique - direction technique
grands projets

Contact

Tour Europe
33 place des Corolles - TSA 77655
92099 Paris La Défense cedex
Tél. : 01 71 00 72 32
E-mail : emmanuel.dupas@dalkia.fr
www.dalkia.fr

Éric Jeanne, Dalkia
Cédric Mahieux, Dalkia



32

Sophie Bouchoule
CNRS, C2N

Responsable de la coordination
scientifique

Contact

UP Saclay UMR 9001
10 bd Thomas Gobert
91120 Palaiseau
Tél. : 01 70 27 06 27
E-mail :
sophie.bouchoule@c2n.upsaclay.fr
www.c2n.universite-paris-saclay.fr/en/

Aristide Lemaître, C2N



42

Sylvie Vandriessche
Commission Afnor X44B

Présidente

Contact

Tél. : 06 74 96 59 45
E-mail : sv@mailrisecontamination.fr

Jean-Paul Rignac, EDF R&D



50

Hyacinthe Ducharme
Andheo

Ingénieur d'études CFD

Contact

Centre de l'Onera
BP 72 - 29 av. de la Division Leclerc
92322 Châtillon cedex
Tél. : 01 46 73 40 93
E-mail : tristan.soubrie@andheo.fr
www.andheo.fr

Tristan Soubrié, Andheo



55

Syphax Ikardouchène
Synapse Concept

Référent en CFD

Contact

SYC SIM
7a rue de Bouxwiller
67270 Lixhausen
E-mail : s.ikardouchene@syccsim.com
https://syccsim.com

Luce Kern, Synapse Concept



61

Édith Filaire
Icare

Directrice recherche et innovation,
professeure des universités

Contact

Biopôle Clermont-Limagne
6 rue Émile Duclaux
63360 Saint-Beauzire
E-mail : edith.filaire@groupeicare.com
www.groupeicare.com

Anaïs Georgeault, Icare
Christian Poinsot, Icare

RÉPERTOIRE DES ANNONCEURS

Aerometrik	11
Aspec	48, Couv. III
Balimpro Charrier	39
Carrier France SCS	21
Contec INC	Couv. IV
Devea	45
Exyte	Couv. I
Gerflor	4
HEX Group	19
Oxypharm	Couv. II
Pyc Média	14, 29, 31
Sauermann	13
Solidfog	25
Swan Analytical Instruments	6
Vépres	9
VWR International SAS	53

CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE ENVIRONNEMENTAL

Le serpent de mer des **conditions d'incubation**

Par É. FILAIRE, A. GEORGEAULT et C. POINSOT, groupe Icare

La température et le milieu d'incubation sont des problématiques récurrentes dans le domaine du contrôle environnemental, sans réel consensus. Ce travail de recherche étudie leur influence sur la croissance de différentes souches microbiennes, et propose l'hypothèse qu'une température d'incubation et un milieu unique pourraient contribuer à améliorer la qualité, le délai d'obtention des résultats et la mise en œuvre de systèmes d'incubation automatisés.

Le contrôle environnemental, permettant d'identifier et d'évaluer les micro-organismes présents dans des environnements critiques, constitue une étape essentielle pour maintenir des conditions sanitaires optimales, notamment dans des zones sensibles telles que les salles propres de fabrication pharmaceutique. Il garantit le respect des normes microbiologiques et assure un contrôle conforme aux exigences prédéfinies. Ce monitoring est encadré par un certain nombre de textes réglementaires, normes et guidelines, qui n'apportent que peu de précisions quant aux températures et durées d'incubation. Or, comme le souligne Guinet *et al.* [1], ces éléments revêtent une importance cruciale pour la croissance et la récupération des micro-organismes. Les milieux de culture, qui sont composés d'éléments de base (eau, nutriments) auxquels s'ajoutent différents facteurs de



croissance, sont spécifiques à chaque micro-organisme [2]. Même si aucune ligne directrice ne préconise un milieu de culture spécifique, la gélose tryptone soja (TSA pour Tryptone Soy Agar), aussi appelée gélose tryptocaséine soja ou gélose trypticase soja, semble être le meilleur milieu pour la récupération des bactéries et moisissures [3]. Ceci cependant est à nuancer en fonction des durées et températures d'incubation, peu d'études étant encore disponibles à ce sujet [4]. Gordon *et al.* [5] notent que le milieu TSA est adéquat pour obtenir une croissance des bactéries aérobies incubées à $32,5 \pm 2,5$ °C, l'agar Sabouraud ou Sabouraud Dextrose Agar (SDA) étant, lui, le milieu le plus intéressant pour les moisissures incubées à $22,5 \pm 2,5$ °C. Plus récemment, Poloni *et al.* [4] ont montré que le milieu TSA incubé à une ou deux températures ne pouvait pas compenser l'absence de milieu SDA pour certaines moisissures environnementales. Par ailleurs, l'approche ciblant une température d'incubation unique ($27,5 \pm 2,5$ °C) conduisait à une croissance égale ou supérieure ➔

→ à l'approche à double température d'incubation ($22,5 \pm 2,5$ °C suivie de $32,5 \pm 2,5$ °C). Pour Guinet *et al* [1], l'incubation d'un même échantillon à deux températures différentes peut entraîner un choc thermique, réduisant le taux de récupération total. Il apparaît donc que les approches fondées sur une température d'incubation unique induisent des taux de récupération plus élevés des bactéries et des moisissures, une température intermédiaire unique d'environ 28 °C étant une alternative prometteuse pour la récupération de ces deux types de micro-organismes [6]. Ces mêmes auteurs suggèrent qu'une durée d'incubation de 3 jours est suffisante pour récupérer la plupart des micro-organismes. Néanmoins, à l'heure actuelle, malgré un certain nombre de publications scientifiques sur le sujet, il n'existe pas de consensus sur ces paramètres. Par ailleurs, la quantité d'air et de surfaces régulièrement échantillonnées dans les zones propres est faible par rapport au volume total d'air et aux surfaces présentes. Ceci peut en partie expliquer le fait que l'évaluation ne représente pas la quantité totale de contamination microbiologique, et donc l'absence de consensus dans la littérature.

La présente étude visait donc à étudier l'influence du milieu de culture et de la température d'incubation pour la croissance de différentes souches microbiennes, incluant des levures et moisissures de collection et des souches environnementales prélevées sur différents sites de production. En lien avec les données récentes de la littérature, nous avons émis l'hypothèse qu'une température d'incubation unique et un milieu unique pouvaient contribuer à améliorer la qualité, le délai d'obtention des résultats et *in fine* la mise en œuvre de systèmes d'incubation automatisés.

Matériel et méthodes

L'étude s'appuyait sur des tests de laboratoire visant à comparer les conditions d'incubation et de température en utilisant

plusieurs souches CIP (collection de l'Institut Pasteur), ATCC (American Type Culture Collection), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) et des souches internes issues de prélèvements environnementaux (nommées *in situ*). Les souches environnementales provenaient de prélèvements d'air effectués à l'aide d'un biocollecteur (ABS Sampl'Air Lite, 35172 Bruz, France), issus de trois environnements différents : pharmaceutique, hospitalier et fabricant de dispositifs médicaux (DM). La sélection des autres souches a été réalisée en tenant compte de celles qui avaient déjà fait l'objet d'investigation sur cette problématique par d'autres auteurs [7]. Concernant les conditions d'incubation, celles-ci ont été sélectionnées en s'appuyant sur la norme NF EN 17141:2020 pour le choix de comparaison des milieux (TSA versus SDA) et sur les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé mettant en avant la synergie d'une double incubation de 3 à 5 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C puis 2 à 3 jours supplémentaires à $32,5 \pm 2,5$ °C. Le **tableau A** répertorie l'ensemble des micro-organismes testés.

L'étude a été réalisée sur des boîtes de 90 mm de diamètre avec un milieu TSA ou SDA pour toutes les souches ($n = 5$). Les géloses ont été incubées dans les conditions suivantes :

- 7 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C ;
- 7 jours à $30,0 \pm 1,0$ °C ;
- 7 jours à $37,0 \pm 1,0$ °C ;
- 3 jours à $30,0 \pm 1,0$ °C suivis de 4 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C ;
- 3 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C suivis de 4 jours à $30,0 \pm 1,0$ °C.

Le milieu de référence était le milieu SDA à une température d'incubation $22,5 \pm 2,5$ °C pour les levures et moisissures [8].

Chaque boîte a été inoculée avec 10-100 UFC. Pour les différentes approches d'incubation, toutes les boîtes pour une souche donnée ont été inoculées le même jour et à la même heure afin de limiter

Micro-organismes utilisés pour l'étude

Souches de levures	Souches de moisissures	Souches environnementales
<i>Candida albicans</i> CIP 48-72	<i>Alternaria alternata</i> DSMZ 1102	<i>Penicillium spp</i> Envt pharmaceutique
<i>Candida glabrata</i> ATCC 3449	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Penicillium spp</i> Envt hospitalier
<i>Candida lusitanae</i> ATCC MYA-2950	<i>Cladosporium cladosporioides</i> DSMZ 62121	<i>Penicillium spp</i> Fabricant DM
<i>Candida utilis</i> ATCC 9950	<i>Cladosporium herbarum</i> DSMZ 63422	
<i>Geotrichum capitatum</i> ATCC 28576	<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	
<i>Kloeckera apiculata</i> ATCC 32857	<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10106	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CIP 1432.83		

CIP : collection de l'Institut Pasteur ; ATCC : American Type Culture Collection ; DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

les biais. Des lectures quotidiennes ont été effectuées à partir du jour 2, avec deux opérateurs indépendants (principe des quatre yeux) par boîte. Dans le cas où les comptages différaient entre les deux analystes, le résultat final par boîte a été obtenu en faisant la moyenne des deux lectures. Les résultats ont été calculés en considérant les moyennes des cinq répétitions par condition. En outre, une comparaison des caractéristiques morphologiques des colonies (par exemple, couleur, texture, taille) a été effectuée entre les différentes conditions d'incubation. Des photos des boîtes ont été prises quotidiennement à partir du jour 2 (non montré).

Critères d'acceptation

Pour être considérées comme équivalentes, les numérations obtenues ne devaient pas différer d'un facteur supérieur à 2 (50 à 200 %) par rapport aux numérations obtenues dans les conditions de référence d'incubation et de température de la pharmacopée (milieu SDA, 7 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C) pour le type de micro-organisme choisi [8].

Résultats

Effet de la température d'incubation pour le milieu SDA sur le taux de recouvrement

La moyenne des unités formant colonie (UFC) obtenues le jour 7 par micro-organisme ainsi que la température et la durée d'incubation sont indiquées dans les **tableaux B**.

Sur le milieu SDA, l'incubation à double température donnait des résultats similaires en termes de recouvrement des levures en comparaison à la température de référence utilisée dans notre étude, à savoir $22,5 \pm 2,5$ °C (**tableau B1**). On note que la croissance des moisissures *Cladosporium cladosporioides* et *Cladosporium herbarum* était totalement inhibée pour des températures d'incubation supérieures à $22,5 \pm 2,5$ °C. Seule la condition à double température d'incubation, 3 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C suivis de 4 jours à $30,0 \pm 1,0$ °C, a induit des résultats comparables à la condition de référence.

Les moyennes des UFC étaient similaires, quelle que soit la condition de température d'incubation (**tableau B3**). Seule la température à $37,0 \pm 1,0$ °C induisait une inhibition de la croissance des souches *Penicillium* sauvages.

Effet de la température d'incubation et du milieu de culture sur le taux de recouvrement des micro-organismes

La moyenne des unités formant colonies (UFC) obtenue le jour 7 par micro-organisme ainsi que la température, la durée d'incubation et le milieu de culture sont indiqués dans les **tableaux C**. À l'exception de *Kloeckera apiculata*, levure pour laquelle l'incubation à 37 ± 1 °C durant 7 jours dans un milieu TSA a induit une inhibition de la croissance, l'ensemble des levures a obtenu des résultats conformes aux critères d'acceptation pour toutes les conditions d'incubation (température et milieu) en →

● Moyenne et écart type des UFC récupérées pour chaque température d'incubation donnée en comparaison à la condition de référence (7 j d'incubation à $22,5 \pm 2,5$ °C)

Tableau B1

Organismes	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies
	7 j $22,5 \pm 2,5$ °C	7 j $30,0 \pm 1,0$ °C	7 j $37,0 \pm 1,0$ °C	3 j $30,0 \pm 1,0$ °C 4 j $22,5 \pm 2,5$ °C	3 j $22,5 \pm 2,5$ °C 4 j $30,0 \pm 1,0$ °C
<i>Candida albicans</i>	33 ± 3	39 ± 4	44 ± 9	46 ± 7	42 ± 10
<i>Candida glabrata</i>	40 ± 3	31 ± 5	33 ± 5	33 ± 4	35 ± 5
<i>Candida lusitanae</i>	42 ± 4	40 ± 1	37 ± 9	43 ± 5	46 ± 8
<i>Candida utilis</i>	99 ± 7	97 ± 5	91 ± 3	91 ± 9	96 ± 4
<i>Geotrichum capitatum</i>	47 ± 5	42 ± 6	49 ± 8	42 ± 8	41 ± 7
<i>Kloeckera apiculata</i>	58 ± 1	56 ± 4	55 ± 4	58 ± 3	58 ± 5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95 ± 20	87 ± 6	89 ± 22	92 ± 6	80 ± 10

Tableau B2

Organismes	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies
	7 j $22,5 \pm 2,5$ °C	7 j $30,0 \pm 1,0$ °C	7 j $37,0 \pm 1,0$ °C	3 j $30,0 \pm 1,0$ °C 4 j $22,5 \pm 2,5$ °C	3 j $22,5 \pm 2,5$ °C 4 j $30,0 \pm 1,0$ °C
<i>Alternaria alternata</i>	17 ± 2	16 ± 1	14 ± 1	16 ± 2	16 ± 2
<i>Aspergillus niger</i>	15 ± 5	19 ± 5	16 ± 2	16 ± 2	16 ± 4
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	46 ± 1	0	0	7 ± 4	45 ± 1
<i>Cladosporium herbarum</i>	36 ± 4	0	0	0	33 ± 2
<i>Fusarium solani</i>	46 ± 6	43 ± 4	42 ± 9	46 ± 2	48 ± 2

Tableau B3

Organismes	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies	Moyenne colonies
	7 j $22,5 \pm 2,5$ °C	7 j $30,0 \pm 1,0$ °C	7 j $37,0 \pm 1,0$ °C	3 j $30,0 \pm 1,0$ °C 4 j $22,5 \pm 2,5$ °C	3 j $22,5 \pm 2,5$ °C 4 j $30,0 \pm 1,0$ °C
<i>Penicillium spp 1</i>	46 ± 6	43 ± 10	18 ± 5	50 ± 11	47 ± 3
<i>Penicillium spp 2</i>	19 ± 3	26 ± 10	0	19 ± 1	22 ± 4
<i>Penicillium spp 3</i>	61 ± 5	72 ± 4	0	57 ± 11	60 ± 4

1. Levures. 2. Moisissures. 3. Moisissures issues des prélèvements *in situ*.
Penicillium spp 1: environnement issu d'entreprise DM; *Penicillium spp 2*: environnement issu d'entreprise pharmaceutique; *Penicillium spp 3*: environnement issu d'environnement hospitalier

● Moyenne et écart type des UFC récupérées pour les micro-organismes cultivés dans un milieu TSA en comparaison à la condition de référence (milieu SDA, 7 j d'incubation à 22,5 ± 2,5 °C)

Tableau C1

Organismes	Moyennes des colonies SDA	Moyennes des colonies TSA	Moyennes des colonies TSA			
	7 j 22,5 ± 2,5 °C	7 j 22,5 ± 2,5 °C	7 j 30,0 ± 1,0 °C	7 j 37,0 ± 1,0 °C	3 j 30,0 ± 1,0 °C 4 j 22,5 ± 2,5 °C	3 j 22,5 ± 2,5 °C 4 j 30,0 ± 1,0 °C
<i>Candida albicans</i>	33 ± 3	38 ± 4	43 ± 6	45 ± 3	39 ± 9	40 ± 5
<i>Candida glabrata</i>	40 ± 3	32 ± 6	36 ± 3	37 ± 7	31 ± 1	34 ± 6
<i>Candida lusitanae</i>	42 ± 4	31 ± 9	33 ± 6	34 ± 8	32 ± 6	38 ± 3
<i>Candida utilis</i>	99 ± 7	92 ± 4	93 ± 4	96 ± 5	97 ± 4	93 ± 3
<i>Geotrichum capitatum</i>	47 ± 5	38 ± 6	50 ± 11	51 ± 5	48 ± 7	45 ± 8
<i>Kloeckera apiculata</i>	58 ± 1	57 ± 4	39 ± 8	0	42 ± 3	56 ± 5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95 ± 20	90 ± 5	95 ± 3	93 ± 6	98 ± 4	91 ± 5

SDA: Sabouraud Dextrose Agar ; TSA : Tryplone soja.

Tableau C2

Organismes	Moyennes des colonies SDA	Moyennes des colonies TSA	Moyennes des colonies TSA			
	7 j 22,5 ± 2,5 °C	7 j 22,5 ± 2,5 °C	7 j 30,0 ± 1,0 °C	7 j 37,0 ± 1,0 °C	3 j 30,0 ± 1,0 °C 4 j 22,5 ± 2,5 °C	3 j 22,5 ± 2,5 °C 4 j 30,0 ± 1,0 °C
<i>Alternaria alternata</i>	17 ± 2	19 ± 2	19 ± 2	19 ± 4	18 ± 4	18 ± 2
<i>Aspergillus niger</i>	15 ± 5	13 ± 3	16 ± 3	15 ± 0	14 ± 3	15 ± 4
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	46 ± 1	59 ± 3	0	0	10 ± 5	45 ± 5
<i>Cladosporium herbarum</i>	36 ± 4	31 ± 3	5 ± 3	0	0	28 ± 4
<i>Fusarium solani</i>	46 ± 6	44 ± 4	52 ± 5	54 ± 7	48 ± 3	49 ± 7

Tableau C3

Organismes	Moyennes des colonies SDA	Moyennes des colonies TSA	Moyennes des colonies TSA			
	7 j 22,5 ± 2,5 °C	7 j 22,5 ± 2,5 °C	7 j 30,0 ± 1,0 °C	7 j 37,0 ± 1,0 °C	3 j 30,0 ± 1,0 °C 4 j 22,5 ± 2,5 °C	3 j 22,5 ± 2,5 °C 4 j 30,0 ± 1,0 °C
<i>Penicillium spp 1</i>	46 ± 6	47 ± 6	46 ± 6	12 ± 4	40 ± 4	46 ± 3
<i>Penicillium spp 2</i>	19 ± 3	24 ± 5	31 ± 3	0	23 ± 4	27 ± 3
<i>Penicillium spp 3</i>	61 ± 5	67 ± 7	65 ± 7	0	68 ± 8	68 ± 7

1. Levures, 2. Moisissures, 3. Moisissures issues des prélèvements *in situ*. *Penicillium spp 1* : environnement issu d'entreprise DM ; *Penicillium spp 2* : environnement issu d'entreprise pharmaceutique ; *Penicillium spp 3* : environnement issu d'environnement hospitalier



→ comparaison avec les conditions de référence (milieu SDA, 7 jours d'incubation à $22,5 \pm 2,5$ °C).

À l'exception de *Cladosporium cladosporioides* et *Cladosporium herbarum*, la croissance des moisissures à 7 jours ne semble pas être impactée par la température et le milieu de culture (tableau C2). Concernant ces deux moisissures, seules les conditions de température à $22,5 \pm 2,5$ °C durant 7 jours ou de double température d'incubation, à savoir 3 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C suivis de 4 jours à $30,0 \pm 1,0$ °C dans un milieu TSA, donnaient des résultats similaires à une incubation unique dans un milieu SDA avec 7 jours d'incubation à $22,5 \pm 2,5$ °C.

Les données issues du tableau C3 suggèrent que les conditions de culture, à savoir milieu TSA à $37,0 \pm 1,0$ °C, étaient des conditions qui ne permettaient pas la croissance des souches *Penicillium* issues d'environnement de production, les autres conditions de températures sur milieu TSA donnant des résultats similaires à la condition de référence (milieu SDA, 7 jours d'incubation à $22,5 \pm 2,5$ °C).

Discussion

La surveillance de l'environnement fait partie intégrante du système de contrôle de la qualité microbiologique d'une opération de fabrication tant en pharmaceutique que dans les domaines des dispositifs médicaux, hospitaliers et agro-alimentaire. D'un point de vue réglementaire, différents textes apportent des exigences en matière d'exploitation des données de cette surveillance, mais peu de précisions sont apportées sur les paramètres d'incubation. L'EN 17141:2020 [9] apporte un éclairage sur des températures et durées d'incubation mais c'est une norme d'application volontaire et non un texte réglementaire. Les deux plages de température les plus communément utilisées pour le monitoring environnemental des salles propres sont les plages de température comprises entre 20 et 25 °C et entre 30 et 35 °C, la première plage favorisant la croissance de la plupart des levures et moisissures, la seconde étant plus adaptée pour la croissance des bactéries aérobies totales [10]. L'approche à double température

d'incubation, par exemple $22,5 \pm 2,5$ °C pendant 2 à 3 jours suivis de $32,5 \pm 2,5$ °C pendant 2 à 3 jours supplémentaires, est également utilisée même si elle peut être critiquable (choc thermique, retard de croissance microbienne) [3]. À ce jour, l'utilisation de l'incubation à double température est la pratique la plus courante dans les industries pharmaceutiques (60 %) [11]. Dans cette étude, le taux de recouvrement de micro-organismes incubés à une température d'incubation unique ($22,5 \pm 2,5$ °C sur SDA) a été comparée à d'autres approches à simple et double température d'incubation ainsi qu'à un autre milieu de culture, le milieu TSA.

Effet de la température d'incubation pour un milieu donné, le SDA

Les résultats ont montré des récupérations similaires entre les approches à plage d'incubation unique comparativement à l'utilisation des plages d'incubation à double température pour toutes les levures et trois moisissures testées (tableaux B). Pour *Cladosporium cladosporioides* et *Cladosporium herbarum*, espèces fongiques les plus retrouvées sur les sites industriels, seule la condition à double température d'incubation, 3 jours à $22,5 \pm 2,5$ °C suivis de 4 jours à $30,0 \pm 1,0$ °C, induisait des résultats comparables à la condition de référence (tableau B2). Pour les souches sauvages, la condition de référence était celle qui permettait un taux de recouvrement maximal.

Ainsi, il apparaît qu'en utilisant un milieu de culture SDA, 7 jours d'incubation à $22,5 \pm 2,5$ °C sont suffisants pour obtenir de bonnes récupérations microbiennes. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Bonnevey et Leblanc [11]. En effet, dans cette étude a été mis en évidence qu'une plage de température de $27,5 \pm 2,5$ °C pendant 7 jours entraînait un taux de recouvrement satisfaisant pour la plupart des micro-organismes (souches de références et souches sauvages site) étudiés (entre 50 et 200 %) par rapport à la valeur référence ($22,5 \pm 2,5$ °C : 5 jours suivis de $32,5 \pm 2,5$ °C : 2 jours). Néanmoins, ces mêmes auteurs ont noté qu'un programme d'incubation unique pouvait se révéler moins →

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

□ **R. Guinet, N. Berthoumieu, P. Dutot, J. Triquet, M. Ratajczak, M. Thibaudon, P. Bechaud, C. Arliaud, E. Miclet, F. Giordano, M. Larcon, C. Arthaud**, Multicenter study on incubation conditions for environmental monitoring and aseptic process stimulation. *PDA J Pharm Sci Tech*, 71: 43-49, 2017.

□ **É. Filaire, V. Rochette, E. Jarousse, C. Poinot**, Focus on bioburden culture media and medical devices. *PDA J Pharm Sci Tech*, 77(1): 38-44, 2023.

□ **I. D. Symonds, D. L. Martin, M. C. Davies**, Facility-based case study: A comparison of the recovery of naturally occurring species of bacteria and fungi on semi-solid media when incubated under standard and dual temperature conditions and its impact on microbial environmental monitoring approach. *Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.*, 21(1), 7-15, 2016.

□ **A. Poloni, J. Goncalves, M. Pereira, A. Stoll**, Establishment of a single temperature incubation approach for environmental monitoring samples with focus on mold recoveries. *PDA J Pharm Sci Tech*, 2023.

□ **O. Gordon, M. Berchtold, A. Staeri, D. Roesti**, Comparison of different incubation conditions for microbiological environmental monitoring. *PDA J Pharm Sci Tech*, 68: 394-406, 2014.

□ **A. Sage, N. Timas, D. Jones**, Determining incubation regime and time to results for automated rapid microbiology EM methods. *Eur. J. Parenter. Pharm. Sci.* 19 (2), 45-55, 2014.

□ **V. Marshall, S. Poulson-Cook, J. Moldenhauer**, Comparative mold and yeast recovery analysis (the effect of differing incubation temperature ranges and growth media). *PDA J Pharm Sci Technol*. 52 (4):165-9, 1998.

□ **Pharmacopée européenne** 11^e édition, chap. 2.6.12. Examen microbiologique des produits non stériles : tests de dénombrement microbien, 2023.

□ **Afnor, NF EN 17141**, Salles propres et environnements maîtrisés apparentés. Maîtrise de la biocontamination, 2020.

□ **PDA Technical Report 13**, Fundamentals of an Environmental Monitoring Program. Parenteral Drug Association: Bethesda, MD, 2022.

□ **T. Bonnevey, L. Leblanc**, Suitability of a single incubation temperature for environmental monitoring program. *PDA Pharmaceutical Microbiology Conference*, en ligne, 2021.

→ efficace sur certains genres de micro-organismes tel *Cladosporium* spp, genre qui se cultive mal entre 25 et 30 °C, leur croissance optimale s'établissant, comme dans notre étude, pour des températures comprises entre 20 et 25 °C, avec un recouvrement satisfaisant. Il apparaît donc que l'utilisation d'un milieu SDA couplé à une température unique d'incubation (22,5 ± 2,5 °C) pendant 7 jours est un paramètre à prendre en compte pour un programme de monitoring environnemental.

Effet de la température d'incubation et du milieu de culture sur le taux de recouvrement des micro-organismes

Les résultats ont montré que la croissance des micro-organismes testés est similaire entre un milieu TSA et SDA lors de l'utilisation d'une plage de température équivalente à 22,5 ± 2,5 °C (tableaux C). Il en va de même lorsqu'on utilise un milieu TSA avec la double température 3 jours à 22,5 ± 2,5 °C suivis de 4 jours à 30,0 ± 1,0 °C en comparaison à notre référence (milieu SDA, 7 jours d'incubation à 22,5 ± 2,5 °C).

L'utilisation d'un milieu nutritif généraliste tel le milieu TSA à une température modérée permet donc une récupération maximale des moisissures et levures. Symonds *et al.* [3] ont comparé la récupération de micro-organismes sauvages en utilisant du milieu TSA et du milieu SDA à des températures d'incubation de 32,5 ± 2,5 °C ou de 22,5 ± 2,5 °C pendant 5 jours et à des températures d'incubation doubles (22,5 ± 2,5 °C pendant 3 jours suivis de 32,5 ± 2,5 °C pendant 2 jours). Les récupérations fongiques sur milieux TSA et SDA étaient similaires à 22,5 ± 2,5 °C, cette température étant considérée pour leur étude comme la meilleure température, cela étant en accord avec nos données. Ainsi, une seule température d'incubation sur milieu TSA à 22,5 ± 2,5 °C pendant 7 jours permet de récupérer tous les types de micro-organismes comprenant à la fois les moisissures des souches de référence pharmacopée, des levures et les micro-organismes sauvages issus de site de production.

Conclusion

Même si des recommandations existent à ce jour [9], les spécificités techniques liées à la détection de micro-organismes font qu'il n'existe aucune réglementation précise quant au milieu de culture, température et durée d'incubation pour le monitoring environnemental. Cette étude montre qu'une température unique d'incubation avec un milieu généraliste, tel le TSA, est possible pour un programme de monitoring environnemental et, en outre, est plus pertinent que le milieu SDA pour la récupération d'un spectre plus large de micro-organismes. À notre connaissance, ce résultat est très novateur. Néanmoins, il serait intéressant de compléter cette étude par une étude multicentrique *in situ* dont l'objectif serait d'étudier l'impact du milieu de culture et de la température sur la récupération des micro-organismes afin d'affiner nos recommandations. ■