

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 22/01/2024

(21) Numéro de demande : BE2022/5480

(22) Date de dépôt : 20/06/2022

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12Q 1/04

(30) Données de priorité :

(71) Demandeur(s) :

REALCO
SA
1348, LOUVAIN-LA-NEUVE
Belgique

(72) Inventeur(s) :

DELHALLE Laurent
4130 ESNEUX
Belgique

FASTREZ Sébastien
7022 NOUVELLES
Belgique

(54) METHODE DE DETECTION DE MICROORGANISMES

(57) Utilisation d'une composition de prélèvement liquide comprenant un ou plusieurs agents tensioactifs et une ou plusieurs enzymes pour la détection par immunologie ou génétique de bactéries choisies parmi Salmonella, Pseudomonas et/ou Listeria.

METHODE DE DETECTION DE MICROORGANISMES

Domaine technique

La présente invention se rapporte à une méthode de détection de microorganismes, basée sur un échantillonnage de ces
5 microorganismes, puis par un marquage immunologique ou génétique ou impliquant la mise en culture de ces microorganismes, ainsi que sur les compositions permettant un échantillonnage compatible avec les tests immunologiques ou génétiques.

L'art antérieur

10 Dans de nombreux domaines d'activités comme les secteurs agroalimentaires, les collectivités, les secteurs médicaux et vétérinaires, des contaminations problématiques dues à la présence de microorganismes sont observées très fréquemment.

Classiquement, dans les hôpitaux et dans les cabinets
15 médicaux ou vétérinaires, la présence de microorganismes est responsable de maladies nosocomiales tandis qu'en agroalimentaire et en collectivité, ces microorganismes sont responsables de la dégradation de denrées périssables mais aussi du transfert de contaminants vers les consommateurs des produits issus par exemple d'une chaîne de
20 production de viande, de fruits, de légumes ou autres.

Or, de nos jours, des normes strictes en matière d'hygiène sont imposées et il convient donc de s'assurer que le nombre de microorganismes responsables de telles contaminations soit maintenu sous une valeur seuil acceptable, cette valeur seuil acceptable étant
25 propre à chaque domaine d'activité.

Les bactéries planctoniques sont un premier exemple de microorganismes contaminants, ces bactéries sont libres au niveau d'un

substrat liquide ou solide et posent un problème en soi car elles sont à même de contaminer directement tout type de surface comme les denrées alimentaires, les outils médicaux, les bandes transporteuses, les réservoirs de stockage ou encore les patients humains ou les animaux eux-mêmes.

Toutefois, aujourd'hui, il est largement reconnu que les problématiques liés à la contamination par des microorganismes sont d'autant plus importants que ces derniers forment des biofilms.

En effet, dans tout type d'industrie et plus particulièrement dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, les biofilms se forment de manière inévitable, cela au vu de la richesse du milieu environnant.

Les biofilms sont définis comme un consortium de microorganismes enchâssés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. Autrement dit, les biofilms sont des pellicules visqueuses qui se développent sur toutes les surfaces, suite à l'adhésion de microorganismes sur ces surfaces et à la sécrétion par ceux-ci de polymères les recouvrant, facilitant leur adhésion à la surface et formant ainsi la matrice extracellulaire. Les biofilms constituent ainsi une couche de protection autour des microorganismes très résistante aux agressions chimiques et thermiques ce qui rend ainsi leur élimination très difficile au moyen des biocides conventionnels et représentent de plus une source récurrente et important de contamination du milieu environnant.

Cette résistance est expliquée d'une part par la matrice de substances polymériques extracellulaires qui forme une barrière physique à la diffusion des molécules biocides dans le biofilm et, d'autre part, à l'état sessile des microorganismes et à leur capacité à s'échanger entre eux très rapidement des gènes responsables de certains mécanismes de résistance aux biocides.

Dès lors, on comprend aisément que les biofilms sont des structures très résistantes et extrêmement variées, par exemple des souches différentes d'une même bactérie peuvent former des biofilms différents, ces biofilms étant encore plus variés qu'ils sont composés de plusieurs bactéries différentes. De plus, les bactéries s'échangeant entre elles des gènes de résistance et l'environnement influe également sur le biofilms, accentuant encore leur complexité et leur résistance.

En outre, la matrice extracellulaire des biofilms peut être identifiée lorsqu'elle est fortement développée mais, dans la majorité des cas, le biofilm se développe insidieusement dans les installations et sa présence ne sera détectée que lors de l'analyse de la qualité du produit fini.

Concernant la croissance du biofilm, celle-ci a lieu de manière cyclique en comprenant une phase de croissance durant laquelle se produit l'accumulation des microorganismes et une phase de détachement durant laquelle des morceaux entiers de biofilms et des microorganismes se détachent par érosion et sous l'effet de leur poids pour contaminer les surfaces, les denrées alimentaires, les outils médicaux, les bandes transporteuses, les réservoirs de stockage ou encore les patients humains, consommateurs ou les animaux eux-mêmes.

Cela devant entraîner pour l'industriel, l'arrêt de sa chaîne de production, effectuer un cycle de nettoyage pour éliminer le biofilm, représentant de nombreuses heures de travail, ressources déployées et de perte de rendement.

De tout ceci, il ressort que les microorganismes contaminants et/ou les biofilms constituent une réelle problématique, tout particulièrement dans le domaine des soins de santé (hôpitaux, cabinets dentaires ou médicaux), des soins vétérinaires et de l'agroalimentaire. Cette problématique est d'autant plus critique que les microorganismes

et/ou les biofilms peuvent impliquer des bactéries responsables d'infections potentiellement mortelles chez les individus, que ces bactéries soient présentes dans les hôpitaux, les cabinets vétérinaires ou encore dans l'industrie agroalimentaire et se retrouvent au final sur les
5 produits alimentaires destinés à la consommation.

Comme cela a été indiqué plus haut, la problématique des microorganismes et plus particulièrement des biofilms est double. D'une part, les désinfectants et biocides classiques sont très souvent inefficaces car ils ne parviennent pas à atteindre les microorganismes protégés par
10 la matrice extracellulaire du biofilm, cette matrice étant de structure et de composition complexe et très variable. D'autre part, un biofilm est généralement mixte, c'est-à-dire qu'il contient une multitude de bactéries différentes ou de mêmes bactéries mais qui sont de souches différentes, ce qui favorise la propagation des gènes de résistance entre
15 les bactéries du biofilm et rend ainsi leur traitement très difficile voire inefficace.

Par conséquent, d'un environnement à l'autre ou d'un secteur d'activité à l'autre, il est plutôt fréquent que les biofilms détectés soient totalement différents. Afin de détecter les biofilms, il existe des kits
20 de détection de la présence de biofilms sur des surfaces ou dans des installations plus spécifiques (circuits d'eau, etc...), ces kits (tel que celui divulgué dans le document EP2537601) permettent de réaliser une coloration sélective des biofilms. Il est donc actuellement possible de déterminer des zones où sont présents des biofilms afin de procéder à une
25 élimination de ces derniers sans toutefois connaître la nature précise des microorganismes (bactéries) à l'origine du biofilm ciblé.

Il en résulte que des compositions d'élimination des biofilms comprenant plusieurs enzymes sont employées sans toutefois savoir si les enzymes utilisées et éventuellement formulées dans une base détergente

(voir par exemple le document EP2243821) sont réellement adéquates pour agir sur un biofilm donné. Pour cette raison, les traitements actuels sont plutôt aléatoires et non spécifiques, ce qui est économiquement non rentable et peut entraîner une perte de temps et un arrêt considérable des installations.

Par ailleurs, des techniques de prélèvement de microorganismes au départ de surfaces ont été développées afin de caractériser et/ou de quantifier les populations de microorganismes présentes sur des surfaces et responsables de contaminations. Ces méthodes de prélèvement permettent donc de déterminer, sur une surface, les différents types (de souches) de bactéries et de microorganismes présents.

Parmi les méthodes de prélèvement de microorganismes présents sur une surface, l'une des références en la matière est la Norme ISO 18593 :2004(F) qui prévoit et définit des méthodes horizontales pour des techniques de prélèvement sur des surfaces (plus spécifiquement sur des surfaces se rencontrant dans l'environnement des industries agroalimentaire). La méthode à « l'étoffe/éponge » est un exemple de techniques de prélèvement cité dans cette Norme, cette méthode permettant de rechercher et/ou de dénombrer des microorganismes présents sur une surface. Brièvement, selon cette méthode de prélèvement, il s'agit de mouiller l'étoffe/éponge avec une quantité de diluant qui est du sérum physiologique stérile, d'échantillonner la surface dans deux directions perpendiculaires avant d'introduire l'étoffe/éponge dans un récipient stérile avec le diluant. Par la suite, après un éventuel stockage du prélèvement, ce dernier est analysé quantitativement et/ou qualitativement.

Malheureusement, si une telle méthode permet d'assurer un prélèvement de microorganismes libres à la surface d'un substrat, c'est-

à-dire un prélèvement de microorganismes planctoniques, elle se relève être inefficace lorsque la surface est contaminée par des microorganismes ayant formé un biofilm. En effet, comme expliqué plus haut, les microorganismes protégés par la matrice extracellulaire du biofilm, cette matrice étant de structure et de composition complexe et très variable et les biofilms étant mixtes, ils sont encore plus variés et complexes qu'ils sont composés de plusieurs bactéries différentes ou de souches différentes.

De plus, il s'avère que les techniques de prélèvement reposant sur un support imprégné d'eau peuvent avoir un effet bénéfique sur le développement des microorganismes, même lors de la réalisation d'un prélèvement au départ d'une surface. En effet, il est reconnu que certaines bactéries présentent une croissance accrue en présence d'eau, le support imbibé d'eau favorisant donc cette croissance pendant le prélèvement mais également après celui-ci puisqu'une fine pellicule d'eau subsiste sur le support traité où a eu lieu le prélèvement. Ceci peut donc favoriser le développement de certains microorganismes non prélevés, en particulier lorsqu'ils sont protégés par un biofilm.

Afin de pallier aux inconvénients des supports de prélèvement imprégnés d'eau, on connaît de l'état de la technique le document DE10304331 qui divulgue une préparation enzymatique qui peut être utilisée pour éliminer les biofilms des surfaces en l'absence de biocides. Cette préparation enzymatique comprend une ou plusieurs enzymes du groupe des polysaccharidase et/ou protéases et éventuellement des nucléases.

Malheureusement, même si les compositions selon le document DE10304331 présentent une certaine efficacité en terme de prélèvement des microorganismes, il apparaît qu'elles sont insuffisantes compte tenu de la diversité et de la complexité des microorganismes et

des biofilms qui peuvent être présents sur une surface d'une installation et qu'elles ne permettent pas un prélèvement représentatif des populations bactériennes y étant pourtant bien présentes, c'est-à-dire qu'elles ne permettent qu'un faible recouvrement des microorganismes.

5 En effet, les biofilms et/ou les microorganismes présents sur une surface d'une installation sont d'une part composés d'une population de microorganismes variée et complexe, c'est-à-dire différents microorganismes mais également ces différents microorganismes pouvant encore être de souches différents, cela
10 entraînant des résistances différentes mais également la formation de matrices extracellulaires de biofilms variées, complexes et différentes, parfois au sein d'une même surface d'une installation.

Il existe donc un réel besoin de fournir une composition qui a pour but de pallier les inconvénients de l'état de la technique en
15 permettant un prélèvement efficace, représentatif et de manière adéquate des populations de microorganismes, qu'ils soient libres mais également sous la forme d'un biofilm de structure complexe qui peut varier considérablement d'un prélèvement à un autre. En outre, il existe un besoin de fournir une composition permettant le prélèvement des
20 microorganismes sur différents types de surfaces, dans différents environnements, stable dans le temps et qui soit compatible avec les utilisateurs ou encore avec la chaîne de production, par exemple les aliments dans une industrie agroalimentaire.

A ce titre, la demande de brevet WO 2018/002013 décrit une
25 solution aqueuse visqueuse comprenant une ou plusieurs enzymes et 8,4% de surfactants pour une application sur une surface horizontale ou même verticale, en vue d'une imprégnation prolongée d'un tissu placé sur cette surface, de manière à récupérer un maximum des micro-organismes

éventuellement présents tout en préservant leur viabilité et de quantifier leur présence.

Cependant, la durée de prélèvement est longue et les composants ont été sélectionnés dans le but de préserver la viabilité des microorganismes, pas de permettre un test immunologique en aval.

Finalement, ces étapes de prélèvement et d'échantillonnage doivent être compatibles avec les tests de détection immunologiques, ce qui implique des fortes contraintes au niveau des réactifs à utiliser.

10

Bref résumé de l'invention

Un premier aspect de la présente invention porte sur l'utilisation d'une composition de prélèvement liquide comprenant un ou plusieurs agents tensioactifs et une ou plusieurs enzymes choisies dans le groupe constitué d'une protéase, une polysaccharidase, une laccase, une lipase, une cellulase et une mannanase, pour la détection de bactéries choisies parmi *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*) potentiellement présentes sur une surface.

Avantageusement, la détection se fait par immunologie ou par test génétique et/ou après culture des bactéries.

De préférence, pour cette utilisation, la composition de prélèvement comprend des tensioactifs présents à une teneur comprise entre 0,02% et 1% en poids par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.

De préférence, dans cette utilisation, ces tensioactifs (présents dans la composition de prélèvement) comprennent au moins

un tensioactif anionique, de préférence ledit tensioactif anionique étant choisi dans le groupe constitué des alkyle éther sulfate, de préférence un sel de laureth sulfate, alkyle sulfate, alkylbenzène sulfonate et les savons, de préférence le(s) tensioactif(s) est (sont) essentiellement un ou plusieurs
5 tensioactifs anioniques.

De préférence, dans cette utilisation, la composition de prélèvement comprend en outre au moins 15% d'un agent stabilisant choisis parmi un polyol, de préférence le glycérol, et le propylène glycol, par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.

10 De préférence, dans cette utilisation, la composition de prélèvement comprend une protéase étant une sérine protéase.

Un aspect connexe à la présente invention porte sur un kit pour la détection de microorganismes choisis parmi *Salmonella* sp. et/ou *Listeria* sp. potentiellement présents sur une surface comprenant :

15 - une composition de prélèvement liquide stérile comprenant un ou plusieurs agents tensioactifs et une ou plusieurs enzymes choisies dans le groupe constitué d'une protéase, une polysaccharidase, une laccase, une lipase, une cellulase et une mannanase ;

20 - des moyens d'application contrôlée de ladite composition de prélèvement et/ou des moyens de stockage stérile de la composition de prélèvement après son application.

De préférence, la composition de prélèvement de ce kit comprend des tensioactifs à une teneur comprise entre 0,02% et 1% en
25 poids par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.

De préférence, les tensioactifs de cette composition de prélèvement (qui fait partie du kit) comprennent au moins un tensioactif anionique étant choisi dans le groupe constitué des alkyle éther sulfate,

de préférence un sel de laureth sulfate, alkyle sulfate, alkylbenzène sulfonate et les savons.

De préférence les tensioactifs de cette composition de prélèvement (qui fait partie du kit) sont (essentiellement) un ou plusieurs
5 tensioactifs anioniques.

Avantageusement, la composition de prélèvement (qui fait partie du kit) comprend en outre au moins 15% d'un agent stabilisant choisis parmi un polyol, de préférence le glycérol, et le propylène glycol, par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.

10 De préférence, ce kit comprend en outre une solution de conservation comprenant un dérivé de polyoxyéthylène sorbitane, de préférence le monooléate de polyoxyéthylène sorbitane, et/ou un dérivé de phosphoglycéride, de préférence la phosphatidylcholine, et/ou un hydrolysate de protéines.

15 Avantageusement, dans ce kit, la composition de prélèvement comprend une protéase étant une sérine protéase et, optionnellement, la composition de conservation comprend un inhibiteur de sérine protéase, de préférence le PMSF.

De préférence, dans ce kit, la solution de conservation
20 comprend un hydrolysate de protéine, de préférence de la peptone, à une teneur d'au moins 10 g/L.

De préférence, dans ce kit, la solution de conservation comprend en outre au moins un agent osmotique choisi dans le groupe constitué du chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le sulfate de
25 potassium, le phosphate tribasique de sodium, le phosphate dibasique de sodium, le phosphate monobasique de sodium, de préférence ledit au moins un agent osmotique est le chlorure de sodium.

De préférence, ce kit comprend en outre des moyens de détection spécifique et/ou de quantification spécifique par immunologie ou génétique de bactéries, de préférence choisies parmi *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*).

Description détaillée d'une réalisation de l'invention

Les inventeurs ont remarqué que de nombreux composés utilisés pour un prélèvement efficace de microorganismes interfèrent avec les différents tests de détection de microorganismes, des tests qui impliquent une culture de microorganismes, et au moins un parmi les tests de mesure de l'ATP générée, des tests génétiques et des tests immunologiques.

Ces tests sont importants pour mesurer qualitativement quels microorganismes sont présents, mais également pour mesurer la variation en nombre au cours du temps sur une surface donnée, ce qui est un paramètre important, en tout cas pour les industries telles que les industries alimentaires (au sens large), ou les hôpitaux, ou encore les cantines. En particulier en ce qui concerne des microorganismes dangereux tels que *Listeria* sp. ou *Salmonella* sp.

Pour résoudre ce problème, il est prévu suivant l'invention l'utilisation d'une composition stérile d'échantillonnage, de décrochage et de prélèvement de microorganismes pour l'identification de microorganismes (ex. *Listeria* sp. et/ou de *Salmonella* sp.), comprenant :

- un ou plusieurs tensioactifs représentant au moins 0,01% en poids par rapport au poids de ladite composition et au maximum 1,5%, de préférence au maximum 0,5%, voire 0,1% en poids de ladite composition,

ce tensioactif ou ces tensioactifs comprenant, voire consistant (essentiellement) en un (ou plusieurs) tensioactif anionique,

- au moins un polyol et/ou le propylène glycol en tant qu'agent stabilisant (et/ou agent viscosant), représentant au moins 15%, de
5 préférence au moins 18%, en poids par rapport au poids de ladite composition,

- avantageusement, au moins un agent séquestrant (les cations di- ou multi-valents),

- au moins deux enzymes (en concentration apte à dégrader les
10 éventuels biofilms bactériens ou les souillures), lesdites au moins deux enzymes étant choisies dans le groupe constitué d'une protéase, une polysaccharidase, une laccase, une lipase, une cellulase et une mannanase,

cette composition présentant de préférence (i) un pH
15 compris entre 5 et 11 et/ou (ii) une viscosité dynamique (20°C) comprise entre 10 et 100 mPa.s ;

de préférence, ces au moins deux enzymes présents dans la composition sont choisis et incorporés en une teneur de manière à ne pas interférer avec les tests microbiologiques qui seront réalisé par après.

20 Avantageusement, la composition de prélèvement a été stérilisée par des moyens physiques, tels que l'irradiation, par exemple aux rayons gamma ou par faisceau d'électrons ou par filtration stérilisante.

Avantageusement, la composition de prélèvement comprend en outre une teneur en conservateur, tel que le (2-
25)phénoxyéthanol, ne dépassant pas 50 ppm. Les compositions préférées ont, avantageusement, une concentration en conservateurs moindre, par exemple moins de 20 ppm en 2-phénoxyéthanol, moins de 10 ppm 2-phénoxyéthanol, moins de 5 ppm 2-phénoxyéthanol (partie pour million : poids de la somme des conservateurs (2-phénoxyéthanol) : poids total de

la composition), une teneur en-dessous de la limite de détection et/ou en-dessous de 0,1 ppm.

Cette composition de prélèvement est de préférence pour une application sur une surface, telle qu'une surface utilisée dans les industries, par exemple les industries alimentaires, ou les hôpitaux ou les cantines.

Les caractéristiques de la composition de prélèvement présentent l'avantage de fournir une composition de prélèvement de microorganismes, qu'ils soient sous forme planctoniques ou bien sous forme de biofilms complexes et variés. Cette composition permet un échantillonnage précis des microorganismes.

La composition de prélèvement, en comprenant au moins deux enzymes choisies dans le groupe comprenant une (sérine) protéase, une polysaccharidase, une laccase, une lipase, une cellulase et une mannanase, permet avantageusement de dégrader et de déstructurer efficacement la matrice extracellulaire des biofilms et notamment d'une population variée et complexe de biofilms ayant des matrices extracellulaires différentes permettant ainsi de libérer les bactéries afin de les prélever.

Les teneurs en agents de conservation (ex. le 2-phénoxyéthanol) des enzymes utilisées dans la composition de prélèvement est donc avantageusement connue ou mesurée. Ceci permet avantageusement de choisir des compositions enzymatiques relativement pauvres en agents de conservation.

L'incorporation d'une (sérine) protéase dans la composition de prélèvement est préférée. Cependant les inventeurs ont remarqué (i) que les protéases interfèrent avec les tests microbiologiques en aval, tels que les tests impliquant des enzymes (PCR, luciférase) ou des

reconnaitances d'antigènes (ELISA). En outre, les inventeurs ont remarqué que de nombreux lots commerciaux de protéase contenaient des teneurs très importantes en agent de conservation, et les inventeurs ont remarqué que ces agents interféraient avec plusieurs tests microbiologiques en aval, surtout ceux impliquant la culture de microorganisme pour leur amplification, en particulier les inventeurs ont remarqué que *Listeria* sp. était particulièrement sensible à de tels agents.

En outre, l'agent séquestrant ainsi que le pH compris entre 5 et 11 de la composition de prélèvement permet avantageusement de former des complexes avec des ions minéraux qui vont être fixés sous une forme empêchant leur précipitation par les réactions habituelles et ainsi de stabiliser dans le temps la composition de prélèvement, notamment au vu des enzymes présentes dans de telles proportions.

Dans le contexte de la présente invention, l'agent séquestrant potentiellement présent dans la composition de prélèvement est de préférence une substance chimique ayant la capacité à former des complexes avec des ions minéraux qu'il fixe sous une forme empêchant leur précipitation par les réactions habituelles. A titre d'exemple, l'agent séquestrant peut être l'acide éthylène-diamine-tétraacétique, le glucono-delta-lactone, le gluconate de sodium, le gluconate de potassium, le gluconate de calcium, l'acide citrique, l'acide phosphorique, l'acide tartrique, l'acétate de sodium, le sorbitol, un composé comportant un atome de phosphore, voire la carboxyméthyl inuline (le sel sodique). Alternativement, l'agent séquestrant peut être un oxyde de phosphore tel qu'un phosphonate, un phosphinate ou un phosphate ou leur mélange, ou un sel de celui-ci, une amine ou un oxyde d'amine portant au moins, dans sa structure, un groupement fonctionnel phosphine, oxyde de phosphine, phosphinite, phosphonite, phosphite, phosphonate, phosphinate ou phosphate, seul ou en combinaison, ou un sel de ceux-ci.

Dans le cadre de la présente invention, il a été déterminé que la composition de prélèvement suivant l'invention en comprenant au moins un tensioactif anionique qui représentent au moins 0,01% (de préférence moins de 1,5%, voire moins de 1%, voire moins de 0,5% ou encore moins de 0,1%) en poids par rapport au poids de cette composition, permet de manière particulièrement avantageuse de décrocher et de prélever une proportion représentative et complète d'une population de microorganismes présents sur une surface, qu'ils soient planctoniques ou bien sous la forme de biofilms, tout en n'interférant pas de manière problématique avec les tests de détection, y compris ceux qui sont spécifiques pour *Listeria* (culture, marquage et/ou détection par anticorps, identification génétique, PCR, biologie moléculaire).

Avantageusement, parmi ces tensioactifs anioniques se trouvent des tensioactifs moussants, cela présentant l'avantage d'une part de décrocher et prélever les microorganismes et d'autre part d'emprisonner les microorganismes prélevés dans la composition selon l'invention afin de réaliser un prélèvement efficace et représentatif de la population de contaminants d'une surface.

De préférence les tensioactifs sont choisis de manière à ce que, globalement, ils aient une valeur HLB comprise entre 10 et 16.

De préférence, l'au moins un tensioactif anionique de la composition de prélèvement est un sel (ex. sodique) de laureth sulfate, (numéro CAS 9004-82-4). Il s'agit, de préférence du laureth-2 sulfate de sodium et/ou du laureth-3 sulfate de sodium

De préférence, la composition de prélèvement comprend au moins 15%, de préférence au moins 18% en poids d'un agent stabilisant, de préférence le glycérol.

De préférence, la composition de prélèvement comprend au moins 60% en poids d'eau, de préférence au moins 70% en poids, voire au moins 75% en poids d'eau

- 5 Ainsi, la composition en comprenant au moins un tensioactif anionique (à faible teneur) ainsi qu'au moins un agent stabilisant est stable dans le temps, tout en étant compatible avec les tests microbiologiques, y compris ceux pour la détection de *Salmonella* et de *Listeria*.

- 10 Il en résulte que la composition de prélèvement, au contraire des compositions actuelles, permet d'obtenir un prélèvement réellement représentatif et complet des contaminants présents sur une surface, pour différents types de surfaces et pour différents environnements. Cela est particulièrement avantageux car, en ayant un prélèvement représentatif et suffisamment complet des microorganismes, ceux-ci pourront par la
- 15 suite être identifiés et un traitement d'élimination ciblé et efficace, en utilisant les composés adéquats et non plus un cocktail de composés bien souvent inefficace, voire écotoxiques pourra être appliqué sur la surface. Ceci représente bien entendu un avantage économique et de temps considérable.

- 20 L'intérêt de la composition de prélèvement est donc double en ce sens qu'elle permet d'une part de prélever et d'échantillonner l'ensemble des contaminants d'une surface qu'ils soient planctoniques ou sous forme de biofilms en vue de leur analyse et qu'elle permet ensuite de déterminer précisément quel traitement d'élimination de ces
- 25 contaminants sera à appliquer.

De préférence, la composition de prélèvement comprend en outre un agent régulateur de pH.

De préférence, la composition de prélèvement présente un pH compris entre 6 et 10, de préférence entre 7 et 9, préférentiellement entre 8 et 9, de manière particulièrement avantageuse entre 8,2 et 8,6.

De préférence, la composition de prélèvement est sous forme
5 liquide, de préférence sous forme liquide pulvérisable.

De préférence, la composition de prélèvement comprend en outre au moins une enzyme additionnelle choisie dans le groupe constitué des oxydo-réductases, des lyases, des transférases, des estérases, des glucosaminidases, des nucléases. Cependant, de telles enzymes
10 additionnelles ne sont préférées que si elles sont présentes dans des compositions pauvres en agents conservateurs.

Comme expliqué ci-avant, l'intérêt de la composition de prélèvement est double en ce sens qu'elle permet d'une part de prélever et d'échantillonner l'ensemble des contaminants d'une surface qu'ils
15 soient planctoniques ou sous forme de biofilms et qu'elle permet ensuite de déterminer précisément quel traitement d'élimination de ces contaminants sera à appliquer après que des analyses aient été réalisées pour identifier et caractériser précisément les contaminants.

Par conséquent, il est important que la composition
20 d'échantillonnage (de prélèvement), qui contient les contaminants, microorganismes et biofilms suite au prélèvement, puisse permettre une analyse fiable, correcte et représentative de la population prélevée sans que ladite composition après prélèvement n'interfère avec les analyses ultérieures.

25 L'invention se rapporte donc également à un kit de décrochage, de prélèvement et de conservation de microorganismes à l'état vivant ou revivifiable en vue d'analyses de laboratoire ultérieures. Ce kit est utile pour la détection de *Listeria* et/ou de *Salmonella*.

Ce kit comprend la composition de prélèvement décrite ci-dessus, et un moyen d'application contrôlée de celle-ci. Par exemple un pulvérisateur calibré de manière à projeter la même quantité de composition, avec la même dispersion et en gouttelettes de volume
5 identiques.

Un volume à pulvériser est, de préférence, de 0,2 ml. Un volume plus faible (ex. 0,1 ; 0,15 ml) ou plus important (0,25 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ml) peut être choisi, pour autant qu'il soit bien calibré. De préférence, le pulvérisateur calibré a un angle de dispersion large, ce qui permet de
10 couvrir une surface de 10 cm² avec une application de 0,2 ml de volume, voire moins.

En d'autres termes, il est prévu un kit de décrochage (d'une surface), de prélèvement et de conservation de microorganismes à l'état vivant ou revivifiable en vue d'analyses de laboratoire ultérieures
15 comprenant :

- une composition d'échantillonnage (de décrochage et/ou de prélèvement) stérile de microorganismes telle que décrite ci-dessus,
- au moins un dispositif d'application contrôlée de cette composition
20 d'échantillonnage (de décrochage et de prélèvement) sur la surface ;
- de préférence au moins un moyen de récolte stérile de ces microorganismes,
- de préférence au moins un récipient stérile, par exemple un sachet
25 stérile, comprenant avantageusement une solution de conservation des microorganismes à l'état vivant ou revivifiable en vue d'analyses de laboratoire ultérieures ;
- de préférence des moyens de détection par immunologie ou par biologie moléculaire (séquençage, PCR, sondes ou amorces

nucléotidiques spécifiques) de bactéries, avantageusement de détection de *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica* et/ou *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou de *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*).

- 5 De préférence, l'au moins un moyen de récolte stérile des microorganismes du kit selon la présente invention est un tissu, une lingette ou une éponge.

La solution de conservation, dans le contexte de la présente invention, comprend, de préférence, un hydrolysate de protéines (peptone), et/ou du polyoxyéthylène sorbitane et/ou un dérivé de phosphoglycéride (ex. de la lécithine) ; cette composition a, de préférence, comme fonction de neutraliser une quelconque potentielle activité protéolytique et/ou biocide qui serait présente dans la composition de prélèvement tout en assurant la viabilité des microorganismes récupérés.

L'invention se rapporte en outre à un procédé d'identification et/ou de quantification de microorganismes comprenant les étapes suivantes :

au moins une application (pulvérisation) contrôlée d'une composition d'échantillonnage, de décrochage et de prélèvement, de microorganismes décrite ci-dessus,

- laisser agir cette composition d'échantillonnage (de décrochage, de prélèvement) sur cette surface à prélever,
- déposer au moins un moyen de récolte de ces microorganismes sur cette surface à prélever,
- laisser imbiber ce moyen de récolte par cette composition d'échantillonnage (de décrochage, de prélèvement),

- prélever stérilement ce moyen de récolte des microorganismes imbibé et le déposer dans au moins un récipient stérile, par exemple un sachet stérile, comprenant une solution de conservation de microorganismes à l'état vivant ou revivifiable,
- 5 - mesurer et/ou quantifier la présence de microorganismes par un test immunologique ou génétique (ex. par séquençage et/ou PCR), le ou les microorganismes comprenant *Salmonella* sp. et/ou *Listeria* sp.

10 Dans le contexte de la présente invention, un test immunologique s'entend, de préférence, par tout test comprenant un ou plusieurs anticorps capables de se lier spécifiquement à un composant d'une bactérie déterminée. Un tel test immunologique est donc qualitatif (identité de la souche bactérienne, présence d'un facteur donné) et/ou
15 quantitatif. Ce test peut comprendre des moyens de marquage secondaires, tels que fluorescents, qui permettent une analyse rapide et précise.

20 Dans le contexte de la présente invention, un test génétique s'entend, de préférence, par tout test où la présence, voire l'abondance, d'une molécule d'acide nucléique cible dans l'échantillon est analysée. Les tests génétiques préférés sont le séquençage et la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou d'autres types d'amplification génétique (y compris les techniques d'amplifications isothermes) impliquant des sondes et/ou des amorces spécifiques du ou des microorganismes à identifier (ex. *Listeria* et/ou *Salmonella*).

25 Avantageusement les bactéries à détecter sont choisies parmi *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*).

Avantageusement, l'étape d'action de la composition de prélèvement a lieu pendant une durée d'au moins 10 secondes, 20 secondes, 30 secondes, 1 mn, de préférence d'au moins 2mn, préférentiellement d'au moins 3mn, avantageusement d'au moins 4mn, 5 de manière particulièrement avantageuse d'au moins 5 mn ; de préférence moins de 15 minutes.

De préférence, le procédé selon l'invention comprend en outre au moins une étape de stockage de ce récipient stérile contenant ce moyen de récolte imbibé, à une température inférieure à 15 °C, de 10 préférence inférieure à 10°C, avantageusement inférieure à 5°C, qui précède le test immunologique.

Un aspect lié de la présente invention est donc l'utilisation de la composition de prélèvement ou du kit comprenant cette composition de prélèvement pour la détection par immunologie ou génétique (ex. par 15 séquençage et/ou PCR) de bactéries, avantageusement choisies parmi *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*).

D'autres caractéristiques et avantages de la présente 20 invention seront tirés de la description non limitative qui suit, et en faisant référence aux exemples.

Exemples.

Les premiers obstacles que les inventeurs ont dus surmonter 25 portent sur le manque de représentativité des biofilms générés au laboratoire, par rapport à la situation sur site. Ceci complique en particulier les choix des activités enzymatiques (nature des enzymes, leurs abondances, présence de composés potentiellement délétères). Sur

base de ces tests préliminaires, les inventeurs ont donc décidé que toutes les compositions qui seraient formulées au laboratoire devraient être testées en conditions réelles : de nombreuses formulations prometteuses à l'échelle du laboratoire sont inutilisables, en pratique, et les inventeurs n'ont pas trouvé de directives publiées, même à l'aide de leur expertise, qui aurait pu les aider à identifier les compositions fonctionnelles. Cependant, une fois qu'une formulation complexe a été identifiée, telles celles décrites ci-dessous, certains composés de cette formulation peuvent être remplacés par d'autres, ce qui est facilement testable au laboratoire (efficacité, absence de toxicité pour les microorganismes), puis sur site, ou directement sur site. Ainsi, dans une certaine mesure, une protéase est substituable par une autre, en particulier lorsque celles-ci sont des sérine-protéases (subtilisines). Cependant, lorsque des compositions enzymatiques commerciales sont utilisées, les inventeurs ont remarqué que, selon les fournisseurs, et même les marques, différents additifs risquent d'interférer avec les analyses de microbiologie, ainsi les variations de la composition de la présente invention sont possibles, grâce à l'enseignement de la présente invention, mais nécessitent de suivre les règles de prudence décrites dans la présente invention.

20

Exemple 1

Une société de transformation de viande située en Belgique a été sélectionnée pour cette étude. Toutes les installations ont été préalablement nettoyées et désinfectées avant de réaliser les prélèvements.

25

Le protocole de décrochage est appliqué avec une limitation des actions mécaniques pouvant introduire une erreur de reproductibilité ; il comporte les étapes suivantes :

Parcourir rapidement (screener) les zones à prélever avec la lampe UV et kit de détection BDK (Realco) ;

Préchauffer la solution de prélèvement à 45°C ;

- 5 Déposer deux gabarits sur les surfaces à prélever (afin de délimiter une surface de 10cm sur 10 cm) : eau physiologique vs composition de prélèvement (14 sprays pour couvrir la zone ;1,2 g /spray) ;

Laisser agir 5 minutes la solution de prélèvement ;

Déposer la lingette stérile sur les deux zones de prélèvement et laisser imbiber ;

- 10 Prélever stérilement à l'aide de pince et déposé dans un sachet stérile de transport ;

Stocker les échantillons dans des bacs frigos à 4°C ;

Évaluer après les deux zones avec la lampe et le BDK.

- 15 Au total 6 zones de prélèvements ont été incluses dans cette étude : Zone 1 table ronde ; Zone 2 couvercle pour table poubelle ; Zone 3 bac inox ; Zone 4 table scie ; Zone 5 surface plastique ; Zone 6 découenneuse.

- 20 Dans ces 6 zones, la composition de prélèvement comprenant des enzymes (dont une subtilisine, activité équivalente à 10 Unités Anson/kg) et des détergents (environ 10% en poids) permet une bien meilleure récupération des microorganismes, tant en microbiologie classique que par mesure ATP (2G) ou par culture. Réciproquement, il ne resta plus de microorganismes sur les surfaces où la solution de
- 25 prélèvement a été placée, contrairement à la surface traitée par l'eau physiologique. La différence est surtout marquée au niveau de la

microbiologie classique, par rapport à l'ATP 2G ou par test impliquent une étape de culture (peu de différence remarquées).

Les inventeurs ont reproduit l'exemple, pour y inclure des analyses métagénomiques, tout en variant le temps de contact de la composition de prélèvement sur la surface (30 secondes et 5 minutes). A nouveau, la composition enzymatique permet un bien meilleur prélèvement (ex. 100 fois mieux en microbiologie classique et 14 fois mieux en qPCR). Les bactéries retrouvées montrent une proportion accrue en *Pseudomonas*.

10

Exemple 2 – addition d'une solution de conservation ;
Salmonella

Les inventeurs, suspectant des effets délétères associés à la composition de prélèvement, ont cherché à déterminer dans quelle mesure une solution adjuvante pouvait contrecarrer ceux-ci, dans le cadre de tests visant à déterminer la présence de *Salmonella* et/ou de *Listeria*, soit par PCR ou qPCR, soit en utilisant des kits de détection commerciaux, par exemple ceux de BioMérieux. Pour ce faire, une solution dite 'de conservation a été testée (en g/l) : Protéines (extrait de viande de bœuf ; 5) ; Peptone, 10 ; Polysorbate 80 (Tween 80 ; 5) ; Lecithin 0,7 ; NaCl, 5. En outre, divers inhibiteurs de sérine protéase ont été utilisés, dans le but de neutraliser l'activité de la subtilisine de la solution de prélèvement.

La première série de tests a été réalisée en laboratoire, où des quantités connues des bactéries (0,1 ml de 10^7 UFC/ml de *Salmonella*) ont été incubées soit dans une solution physiologique (100 ml), soit dans la composition de prélèvement de l'exemple 1 (6ml + 94 ml eau physiologique), soit dans la composition de l'exemple 1, avant que la

solution de conservation ne soit ajoutée (6 ml composition de prélèvement, 90 ml eau, 4 ml de la solution de conservation).

Lorsque 10^7 UFC/ml de *Salmonella* sont analysés (donc 10^4 UFC/ml dans le mélange final), les différentes situations sont compatibles avec l'identification du microorganisme au moyen d'analyses PCR ou du test Vidas® *Salmonella*. Cependant, une mise en évidence par le test Vidas SLM® (bouillon culture, puis mesure spécifique par test antigénique et fluorescence ; ce test renseigne quant à l'absence ou à la présence de *Salmonella*) échoue lorsque la composition de prélèvement est présente, alors qu'il fonctionne lorsque les bactéries sont diluées dans l'eau physiologique ou lorsque la solution de conservation a été ajoutée.

En outre, dans cet exemple, les inventeurs considèrent que les concentrations en *Salmonella* sont élevées, ce qui ne représente pas nécessairement, voire rarement, la situation sur le terrain, où même 1 CFU doit être détecté.

Exemple 3 – addition d'une solution de conservation ; *Listeria*

Dans ce cas, la solution enzymatique cause des problèmes au niveau de la détection (dénombrement et qPCR) ; ces problèmes sont réduits grâce à la solution de conservation, cependant le kit commercial Vidas® (LMX) ne fonctionne toujours pas.

En outre, lorsque la quantité de *Listeria*ensemencée est réduite, le microorganisme n'est généralement plus détecté suite au mélange (Vidas LMX®, jamais ; Vidas LMO2®, pas à chaque fois) avec la composition de prélèvement, alors que la détection reste robuste lorsque le mélange a été effectué uniquement dans l'eau physiologique. Dans ce cas (volontairement extrême), la composition de conservation n'a pas amélioré la détection. Par prudence, les tests ont été reproduits et trois

souches de *Listeria* ont été testée avec toujours les mêmes résultats ; il s'agit des souches ATCC 19114, NCTC 11994 et ATCC 13932.

En comparant tous les résultats, les inventeurs concluent que la composition de prélèvement ralentit la croissance de microorganismes (*Listeria*), problème qui est partiellement résolu par la composition de conservation. Par contre, la composition de prélèvement interfère avec certains tests microbiologiques en aval. Vu que la nature et l'abondance des microorganismes sur une surface à tester est inconnue à l'avance, les inventeurs concluent donc que les compositions des exemples 1 à 3 sont utiles, mais gagneraient à être encore améliorées.

Exemple 4 - Identifications des composés délétères

Les inventeurs ont recherché dans les différentes enzymes commerciales si certains composés interféraient avec les tests microbiologiques en aval. Les inventeurs ont remarqué que la présence de composés tels que le phénoxyéthanol, le sorbate de potassium ou des dérivés de thiazolinone est assez répandue. Ainsi, les inventeurs ont sélectionné des compositions enzymatiques qui sont dépourvues de tels composés, ou les plus pauvres possibles, même si les inventeurs ont retrouvé des concentrations importantes de 2-phénoxyéthanol dans de nombreuses compositions enzymatiques commerciales. Parmi les composés recherchés se retrouvent le Bronopol, le triclosan, l'idocarb, le chlorhexidine, le DCOIT, le BIT, le OIT, le CIT, le MIT, l'éthyl-parabène, le méthylparabène, le butylparabène, le phénylparabène, l'isopropylparabène, l'isobutylparabène, le propylparabène, l'acide salicylique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide 4-méthylbenzoïque, l'acide benzoïque, l'acide sorbique, l'acide déhydroacétique, le 1-phénoxypropane-2-ol, le 1,2-dibromo-2,4-dicyanobutane, le 2-

hydroxybiphényle, le 2-phénoxyéthanol (le plus abondamment retrouvé, parfois jusqu'à 0,4% en poids), l'alcool benzylique et le chlorophénésin.

Exemple comparatif 1

5 Suspectant une interférence entre les protéases de la composition de prélèvement et les enzymes ou les anticorps des tests en aval, les inventeurs ont testé l'effet de l'addition d'inhibiteurs de protéases dans la solution de conservation (cfr exemple 3), tout en évitant au maximum les compositions enzymatiques commerciales comprenant des
10 composés identifiés comme délétères (cfr. exemple 4).

Différentes manières d'appliquer l'inhibiteur de protéase ont été testées. La protéase choisie étant une subtilisine ou la trypsine, deux inhibiteurs de serine-protéase ont été testés : le PMSF et l'AEBSF.

Le PMSF a permis une bonne inhibition des activités
15 protéolytiques des sérine-protéases testées. Par contre, l'AEBSF n'a inhibé que la trypsine. Des tests de mesure où *Listeria* (les 3 souches ci-dessus ont été testées) est mise en contact avec une composition comprenant une subtilisine, puis l'AEBSF en concentration suffisante pour causer l'inhibition complète de la subtilisine ont montré que différents tests microbiologiques
20 donnaient des valeurs plus basses, voire même ne détectaient pas *Listeria* dans les conditions du test, au contraire du contrôle sans les enzymes ou lorsque le PMSF est ajouté.

Ainsi, les inventeurs ont choisi d'incorporer le PMSF dans la solution de conservation à tester, malgré les inconvénients de cette
25 molécule.

Malheureusement, même dans ces conditions, le test Vidas® LMX ne permet pas de mettre en évidence la présence de *Listeria monocytogenes*.

Exemple 5 – Optimisation de la composition de prélèvement

Les inventeurs ont alors décidé de tester l'efficacité d'une composition de prélèvement fortement diluée et évitant autant que possible les composés identifiés comme délétères. En outre, les activités enzymatiques sont réduites, tout comme la teneur en détergent. Les détergents sont choisis après des tests au laboratoire pour leur compatibilité avec la vie des microorganismes, y compris de *Listeria*, qui a été identifiée comme plus sensible.

Tout d'abord, avec des concentrations en détergent de 10% en poids, même en présence d'activité enzymatique faible, en présence de teneur minimales en agents conservateurs (ex. non-détectables pour la quasi-totalité ; phénoxyéthanol inférieur à 4 ppm) et en absence de PMSF, les tests de détection de *Listeria*, de type Vidas®, ne fonctionnent pas bien (sous-quantification massive), ou pas de manière reproductible. Même des tests moins spécifiques ne fonctionnent pas lorsqu'une culture de *Listeria* est soumise à ces différents traitements.

Ainsi, tous les paramètres de la composition doivent être vérifiés, avec le problème qu'une trop forte dilution des activités enzymatiques risque de ne plus permettre le décrochage des microorganismes, alors qu'une trop forte dilution des détergents risque de ne plus permettre une application homogène de la composition ou un bon contact avec le biofilm. Ainsi, les inventeurs ont remarqué que, outre la quantité des composants, leur nature devait être reconsidérée.

Une formulation diluée a été testée comprenant environ 20% en poids de glycérol, environ 0,03% en poids d'un détergent anionique de type laureth sulfate (de sodium), 0,4% en poids de séquestrant (carboxyméthylinuline) ; 0,4% en poids de glycolate de sodium; 0,04 % en poids d'une subtilisine (activité 1 Unité Anson), ainsi qu'une lipase ; une amylase, une cellulase et une mannanase. Les inventeurs ont sélectionné

des enzymes, ici des enzymes commerciales, dépourvues d'agents conservateurs tels que le sorbate de potassium, le MIT, l'OIT, le BIT et le CIT. Lorsque c'était possible, les inventeurs ont utilisé des enzymes commerciales dépourvues de phénoxyéthanol (cellulase et mannanase),
5 ou à faible teneur en cette molécule (subtilisine ; 4 g/kg de la formulation enzymatique, lipase ; 0,249 g/kg et amylase ; 0,233 g/kg). Les enzymes autres que la subtilisine ont été ajoutées dans des teneurs pondérales comprises entre 0,1 et 0,5% (poids de la composition enzymatique : poids total) et la quantité d'enzyme est typiquement de 1 à 10% en poids par
10 rapport à la formulation commerciale.

Suite à l'utilisation de cette composition, la présence de *Listeria* est détectée, et le test Vidas® LMX pour *Listeria* est, enfin, positif et reproductible. Les inventeurs ont remarqué en outre que, dans ces conditions diluées, l'ajout de l'inhibiteur de protéase PMSF n'est pas
15 nécessaire, et même réduit la propagation de *Listeria*.

Les inventeurs considèrent que la concentration des enzymes autres que les protéases (ici, une subtilisine) peuvent encore être quelque peu réduites, ex. la concentration la plus faible qui permet le détachement, tout comme celles de l'agent séquestrant. A la lumière de
20 la présente invention, ceci peut se tester au laboratoire sur les 3 souches de *Listeria* ou dans d'autres modèles, y compris, de préférence, plus complexes.

Les inventeurs ont ensuite testé une éventuelle synergie avec la solution de conservation (cfr. exemples 2 et 3) : vu que les résultats sont
25 déjà très bons, l'amélioration associée à l'ajout de la solution de conservation est marginale, mais elle a été cependant intéressante dans le cas d'un test qui comprend une propagation suivie d'une détection par PCR.

Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'une composition de prélèvement liquide comprenant un ou plusieurs agents tensioactifs et une ou plusieurs enzymes choisies dans le groupe constitué d'une protéase, une polysaccharidase, une laccase, une lipase, une cellulase et une mannanase, pour la détection de bactéries choisies parmi *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*) potentiellement présentes sur une surface.
5
- 10 2. L'utilisation selon la revendication 1, dans laquelle la détection se fait par immunologie ou par test génétique et/ou après culture des bactéries.
3. L'utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la composition de prélèvement comprend des tensioactifs présents à une teneur comprise entre 0,02% et 1% en poids par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.
15
4. L'utilisation selon la revendication 3, dans laquelle les tensioactifs comprennent un tensioactif anionique, de préférence ledit tensioactif anionique étant choisi dans le groupe constitué des alkyle éther sulfate, de préférence un sel de laureth sulfate, alkyle sulfate, alkylbenzène sulfonate et les savons, de préférence les tensioactifs sont essentiellement un ou plusieurs tensioactifs anioniques.
20
5. L'utilisation selon une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la composition de prélèvement comprend en outre au moins 15% d'un agent stabilisant choisis parmi un polyol, de préférence le glycérol, et le propylène glycol, par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.
25

6. L'utilisation selon une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la composition de prélèvement comprend une protéase étant une sérine protéase.

7. Kit pour la détection de microorganismes choisis parmi
5 *Salmonella* sp. et/ou *Listeria* sp. potentiellement présents sur une surface comprenant :

- une composition de prélèvement liquide stérile comprenant un ou plusieurs agents tensioactifs et une ou plusieurs enzymes choisies dans le groupe constitué d'une protéase, une polysaccharidase,
10 une laccase, une lipase, une cellulase et une mannanase ;
- des moyens d'application contrôlée de ladite composition de prélèvement et/ou des moyens de stockage stérile de la composition de prélèvement après son application.

8. Le kit pour la détection de microorganismes selon la revendication
15 7, dans lequel la composition de prélèvement comprend des tensioactifs à une teneur comprise entre 0,02% et 1% en poids par rapport au poids de ladite composition de prélèvement.

9. Le kit pour la détection de microorganismes selon la revendication
20 8, dans lequel les tensioactifs comprennent au moins un tensioactif anionique, de préférence ledit tensioactif anionique étant choisi dans le groupe constitué des alkyle éther sulfate, de préférence un sel de laureth sulfate, alkyle sulfate, alkylbenzène sulfonate et les savons, de préférence les tensioactifs sont essentiellement un ou plusieurs tensioactifs anioniques.

25 10. Le kit pour la détection de microorganismes selon une quelconque des revendications précédentes 7 à 9, dans lequel la composition de prélèvement comprend en outre au moins 15% d'un agent stabilisant choisis parmi un polyol, de préférence le glycérol, et le propylène glycol, par rapport au poids de ladite composition de
30 prélèvement.

11. Le kit pour la détection de microorganismes selon une quelconque des revendications précédentes 7 à 10 comprenant une solution de conservation comprenant un dérivé de polyoxyéthylène sorbitane, de préférence le monooléate de polyoxyéthylène sorbitane, et/ou un dérivé de phosphoglycéride, de préférence la phosphatidylcholine, et/ou un hydrolysate de protéines.
12. Le kit pour la détection de microorganismes selon une quelconque des revendications précédentes 7 à 11, dans lequel la composition de prélèvement comprend une protéase étant une sérine protéase.
13. Le kit pour la détection de microorganismes selon la revendication 11 ou 12, dans lequel la solution de conservation comprend un hydrolysate de protéine, de préférence de la peptone à une teneur d'au moins 10 g/L.
14. Le kit pour la détection de microorganismes selon l'une quelconque des revendication précédentes 11 à 13, dans lequel la solution de conservation comprend en outre au moins un agent osmotique choisi dans le groupe constitué du chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le sulfate de potassium, le phosphate tribasique de sodium, le phosphate dibasique de sodium, le phosphate monobasique de sodium, de préférence ledit au moins un agent osmotique est le chlorure de sodium.
15. Le kit pour la détection de microorganismes selon l'une quelconque des revendication précédentes 7 à 14 comprenant en outre des moyens de détection spécifique et/ou de quantification spécifique par immunologie ou génétique de bactéries, de préférence choisies parmi *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*), *Pseudomonas* (ex. *Pseudomonas aeruginosa*) et/ou *Listeria* (ex. *Listeria monocytogenes*).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE PAT-20060-BE00
Demande nationale belge n° 202205480	Date du dépôt 20-06-2022
	Date de priorité revendiquée
Déposant (Nom) REALCO	
Date de la requête d'une recherche de type international 16-07-2022	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN81652
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
IPC	Voir rapport de recherche
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. ☐ IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. ☐ ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202205480

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12Q1/04 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 078 898 A (JARS METTE U [DK]) 7 janvier 1992 (1992-01-07) * col 3, 1 60-65 ; exemple 1 ; revendications * -----	7-15
X	US 2020/181539 A9 (NOVOZYMES AS [DK]; NOVOZYMES NORTH AMERICA INC [US]) 11 juin 2020 (2020-06-11) * para 39 ; exemple 3-4 * -----	7-11, 14, 15
Y	* para 39 ; exemple 3-4 * -----	1-6
X	JP 5 466782 B1 (AMTEC CO LTD) 9 avril 2014 (2014-04-09) * para 10, 31, 39-41, 47, 67 ; revendications * -----	7-10, 14, 15
Y	* para 10, 31, 39-41, 47, 67 ; revendications * -----	1-6
	-/--	
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée		Date d'expédition du rapport de recherche de type international
1 février 2023		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Vadot-Van Geldre, E

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	YANNICK LEQUETTE ET AL: "Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry", BIOFOULING, vol. 26, no. 4, 1 mai 2010 (2010-05-01), pages 421-431, XP055018824, ISSN: 0892-7014, DOI: 10.1080/08927011003699535	7-10, 14, 15
Y	* abrégé ; pg 422, col 2, para 3 ; pg 423, col 1, para continuant sur la col 2 *	1-6
Y	----- GONZÁLEZ-RIVAS FABIÁN ET AL: "Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods : Biofilms DQR in the food industry...", COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY, vol. 17, no. 5, 30 juillet 2018 (2018-07-30), pages 1261-1276, XP093019373, US ISSN: 1541-4337, DOI: 10.1111/1541-4337.12378 Extrait de l'Internet: URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111%2F1541-4337.12378> * Fig 1 ; Tableau 3 ; pg 1268, col 1, para 1 - col 2, l 13 *	1-6
A	----- HUANG HUI ET AL: "Towards physicochemical and biological effects on detachment and activity recovery of aging biofilm by enzyme and surfactant treatments", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 247, 13 septembre 2017 (2017-09-13), pages 319-326, XP085298898, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2017.09.082 * abrégé ; pg 320, col 2, para 2.2 - 2.3 ; Fig 5 *	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202205480

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5078898	A	07-01-1992	AT 77650 T 15-07-1992
		DE 3872398 T2 10-12-1992	
		DK 98090 A 20-04-1990	
		EP 0395678 A1 07-11-1990	
		JP 2744268 B2 28-04-1998	
		JP H03501031 A 07-03-1991	
		US 5078898 A 07-01-1992	
		WO 8904361 A1 18-05-1989	
US 2020181539	A9	11-06-2020	CN 101040052 A 19-09-2007
		CN 102919273 A 13-02-2013	
		CN 103181400 A 03-07-2013	
		CN 103182387 A 03-07-2013	
		DK 2258836 T3 25-07-2016	
		EP 1791966 A2 06-06-2007	
		EP 2258836 A1 08-12-2010	
		EP 2258837 A1 08-12-2010	
		JP 5345781 B2 20-11-2013	
		JP 2008512468 A 24-04-2008	
		US 2008248558 A1 09-10-2008	
		US 2011104141 A1 05-05-2011	
		US 2013217099 A1 22-08-2013	
		US 2019256803 A1 22-08-2019	
		WO 2006031554 A2 23-03-2006	
JP 5466782	B1	09-04-2014	JP 5466782 B1 09-04-2014
			JP 2015017151 A 29-01-2015



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN81652	Date du dépôt(jour/mois/année) 20.06.2022	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE202205480
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C12Q1/04			
Déposant REALCO			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Vadot-Van Geldre, E
--	----------------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE202205480

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - ☐ un listage de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - ☐ sur papier
 - ☐ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE202205480

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	1-6, 10
	Non :	Revendications	7-9, 11-15
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-15
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-15
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: US5078898

D2: US2020181539

D3: JP5466782

D4: Lequette et al, 2010. Biofouling, 26(4), 421-431 [XP055018824]

D5: Gonzalez-Rivas et al, 2018. Comp Rev, 17(5), 1261-1276 [XP093019373]

1 **Ad point V**

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1.1 L'objet des revendications 7-9, 11-15 n'est pas nouveau.

1.1.1 D1 (col 3, l 60-65 ; exemple 1 ; revendications) décrit une composition comprenant une protéase (subtilisin), une lipase lipase, protéase (subtilisin) et un tensioactif anionique (p.e. savon). Cette composition est apte à être utilisé pour la détection de bactéries, comme p.e. Salmonella ou Listeria, dans de biofilms potentiellement présentes sur une surface. Ce document décrit également une solution comprenant du peptone (i.e. solution de conservation). Ce document anticipe l'objet des revendications 7-9, 11-15 (voir également point 2.2).

1.1.2 D2 (para 39 ; exemple 3-4) décrit l'utilisation d'une composition comprenant un tensioactif (p.e. savon) et des enzymes (p.e. amylase et protéase (subtilisin)) pour enlever des bactéries présentes sur une surface. Le document décrit également la quantification des bactéries (et donc de facto les moyens pour). Les considérations évoquées ci-dessus, s'appliquent mutatis mutandis (point 1.1.1). Ce document anticipe l'objet des revendications 7-9, 11, 14-15 (voir également point 2.2).

1.1.3 D3 (para 10, 31, 39-41, 47, 67 ; revendications) décrit une composition comprenant une protéase (p.e. subtilisin), propylene glycol (i.e. un stabilisant) et un tensioactif anionique (p.e. savon, alkylbenzène sulfonate,...). Les considérations évoquées ci-dessus, s'appliquent mutatis mutandis (point 1.1.1). Ce document anticipe l'objet des revendications 7-9, 14-15 (voir également point 2.2).

- 1.1.4 D4 (abrégé ; pg 422, col 2, para 3 ; pg 423, col 1, para continuant sur la col 2) décrit une solution comprenant un tensioactif anionique, des enzymes (subtilisin, cellulase, amylase, glucanase) et son utilisation pour prélever un biofilm (comprenant des bactéries telles que p.e. *Pseudomonas*). Ce document décrit également des moyens de détection des EPS présents dans les biofilm (i.e. des moyens de détection spécifique et/ou de quantification spécifique de bactéries voir également point 2.2). Les considérations évoquées ci-dessus, s'appliquent mutatis mutandis (point 1.1.1). Ce document anticipe l'objet des revendications 7-9, 14-15.
- 1.2 L'objet des revendications 1-6 est nouveau, mais n'implique pas d'activité inventive.
- 1.2.1 D5 (Fig 1 ; Tableau 3 ; pg 1268, col 1, para 1 - col 2, l 13) décrit des méthodes de détection de biofilm et les bactéries contenus dedans, y inclus *Salmonella* et *Listeria*. Ces méthodes comprennent l'utilisation d'un swab ou une éponge pour prélever le biofilm, suivi pas une analyse comprenant e.a. croissance sur plaques spécifiques, activité métabolique, ...
- 1.2.2 L'objet de la revendication 1 diffère en ce que une composition comprenant un agent tensioactif et un enzyme tels que définis dans la revendication sont utilisés pour prélever le biofilm.
- 1.2.3 L'effet et que le biofilm peut être prélevé pour analyse et détection des bactéries contenus dedans (*Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*).
- 1.2.4 Le problème objectif résolu par la revendication 1 peut donc être formulé comme la provision d'une méthode alternative pour prélever le biofilm afin de détecter les bactéries contenus dedans (*Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*).
- 1.2.5 La solution - telle qu'identifié par la différence défini ci-dessus - n'implique pas d'activité inventive pour les raisons suivantes:
- 1.2.6 L'homme du métier, confronté avec le problème identifié va étudier d'autres manières permettant d'enlever un biofilm formés par des bactéries sur une surface. Il va donc considérer des documents telles que D2-D4 (voir point 1.1.2-1.1.4), tous appartenant au domaine d'enlèvement de biofilm. Ces documents décrivent tous l'utilisation de compositions comprenant tensioactif et enzyme et leur utilisation pour enlever des biofilms. D2 et D3 vantent même l'effet supérieur d'une telle composition pour enlever un biofilm comprenant *Pseudomonas*. L'homme du métier va substituer le swab utilisé dans D5 avec un espoir raisonnable de succès, ainsi arrivant à un objet tombant sous la

portée des revendications sans déployer un effort inventif. Ceci est d'autant plus vrai que p.e. D2 décrit l'analyse de bactéries (E. coli) après application de la composition comprenant un enzyme et un tensioactif.

- 1.2.7 Les revendications dépendantes 2-6, 10 ne contiennent pas de caractéristiques qui satisfassent aux exigences d'activité inventive en étant combinées aux caractéristiques de l'une quelconque des revendications auxquelles lesdites revendications dépendantes sont liées. En effet, l'incorporation des caractéristiques supplémentaires des revendications 2-6 dans les revendications indépendantes correspondantes fait partie des connaissances ou compétences de la personne du métier ou est déjà décrit dans l'art antérieur (D2-D4, passage relevant cités dans le rapport de recherche). L'utilisation de sérine protéases pour enlever un biofilm était déjà décrit dans l'art antérieur (D2-D4). L'homme du métier connaît - de par sa connaissance générale des tensioactifs anioniques et est en mesure de choisir le tensioactif approprié selon les circonstances ainsi que sa concentration. L'utilisation d'agents stabilisants telle que propylène glycol est également bien connu dans l'art. Aucun préjudice technique a dû être surmonté et aucun effet surprenant est montré pour ces caractéristiques techniques.

- 1.3 Les revendications sont industriellement applicables.

2 Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

- 2.1 Le "cellulose" (rev. 1) n'est pas une enzyme. Il en résulte un problème de clarté.
- 2.2 Les expressions "moyens d'application contrôlée" (p.e. rev 7) et "des moyens de détection spécifique et/ou de quantification spécifique par immunologie ou génétique de bactéries" (p.e. rev. 15) ne sont pas claires et n'informent pas l'homme du métier sur les caractéristiques techniques nécessaires pour être considérés comme tel. Même de simples boîtes pétri, tampon ou pointe de pipette représentent des moyens que sont utiles et utilisables pour de telle détection et/ou quantification. Un problème de clarté concernant la portée exacte des revendications concernées en résulte.