



# Guide utilisateur pour le dénombrement microbien sur les surfaces avec les testeurs **nomad**

## introduction

Les testeurs nomad sont des dispositifs simples, faciles à utiliser et prêts à l'emploi, permettant d'évaluer les niveaux de contamination microbiologique même lorsque l'accès à un laboratoire, à un équipement dédié ou à une technique experte est limité.

Les applications comprennent le dénombrement des micro-organismes dans les eaux environnementales, les eaux traitées, les eaux purifiées, les eaux de rinçage des équipements, les produits alimentaires et les boissons, les équipements de fabrication, y compris les surfaces de travail, pour la surveillance de l'hygiène, de l'environnement ou des processus.

La conception tout-en-un unique des dispositifs permet l'échantillonnage et les tests simultanés, éliminant ainsi le besoin d'un contenant stérile de transport et d'une étape de transfert de liquide aseptique.

Les testeurs nomad sont basés sur la méthode de dénombrement par culture et la technique de filtration sur membrane établies. Les testeurs combinent un filtre à membrane de 0,45 µm associé à un tampon absorbant contenant des éléments nutritifs, thermoscellé dans une languette support facile à manipuler. La configuration du dispositif permet d'extraire 1 ml d'échantillon et retenir les micro-organismes à la surface du filtre, pour une mise en culture ultérieure dans sa chambre en plastique transparent. Le filtre est quadrillé pour faciliter le comptage des colonies microbiennes développées à sa surface. Chaque dispositif est emballé dans une enveloppe en plastique scellée.

Des tests isolés peuvent fournir des informations utiles lorsque son résultat est comparable à une norme ou un standard acceptés. Étant donné que les installations, les processus et les procédures diffèrent les uns des autres, des tests réguliers aboutissant à la constitution d'un historique utile pour évaluer ensuite des risques de contamination:

- Mesurer la conception sanitaire d'un équipement, des pratiques du personnel et des méthodes opérationnelles.
- Fournir des informations sur les micro-organismes présents, indicateurs de risque ou ceux nuisibles responsables de détériorations, de sorte que des mesures correctives appropriées puissent être prises pour prévenir les contaminations microbiennes potentielles.
- Agir comme un système d'alerte précoce des risques microbiologiques dans l'environnement de production et de post-production
- Aider à identifier les niches et les points chauds qui pourraient constituer une source de contamination.
- Documenter l'état sanitaire général d'une installation.
- Valider un programme de décontamination et aider à déterminer la fréquence requise pour le nettoyage et décontamination.

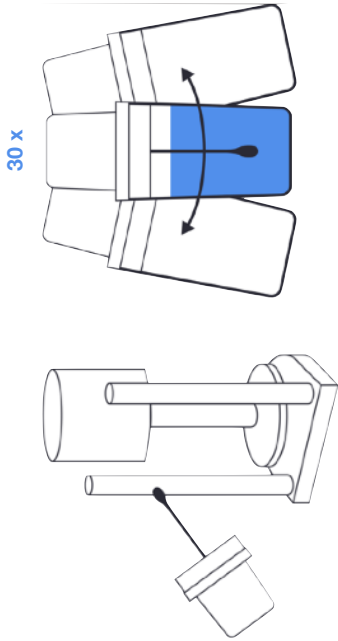
La cohérence dans l'application des protocoles de test est importante pour la constitution d'un ensemble de données solide.

Si un programme de surveillance microbienne est en place, les pratiques existantes doivent se substituer aux recommandations fournies dans ce guide.

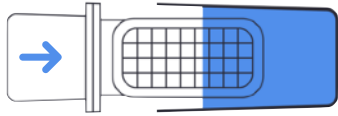
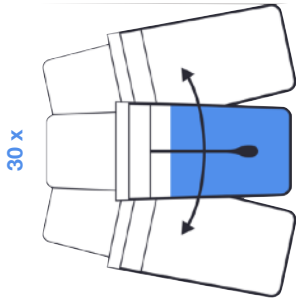
# Protocole résumé - Surfaces



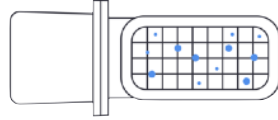
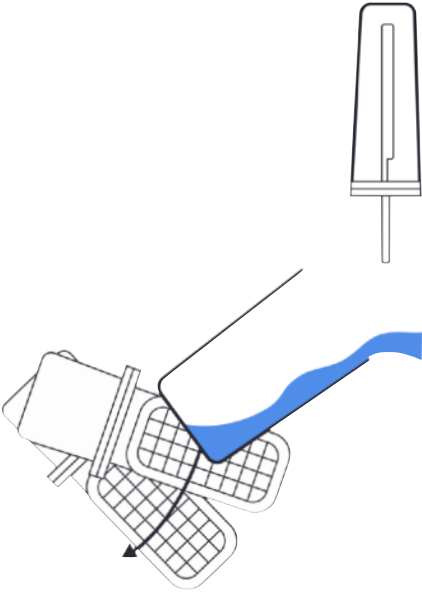
## 1-Tester



30 x



30 sec.



35°C / 95°F	22-24H
25-35°C / 77-95°F	48-72H
28-32°C / 82-90°F	48-72H

Coliformes

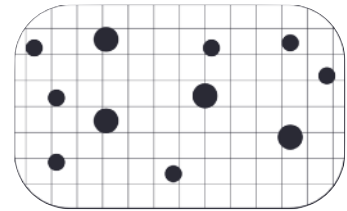
Flore Totale (HPC)

Levures & Moisissures

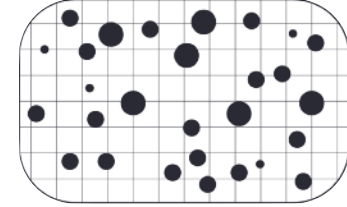


## 2-Incuber

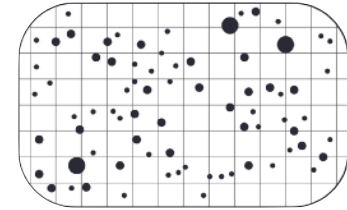
10



30

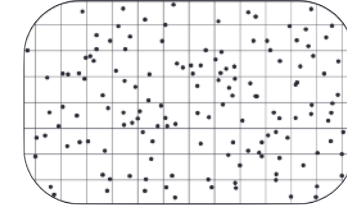


100



TNTC\*

too numerous to count\*

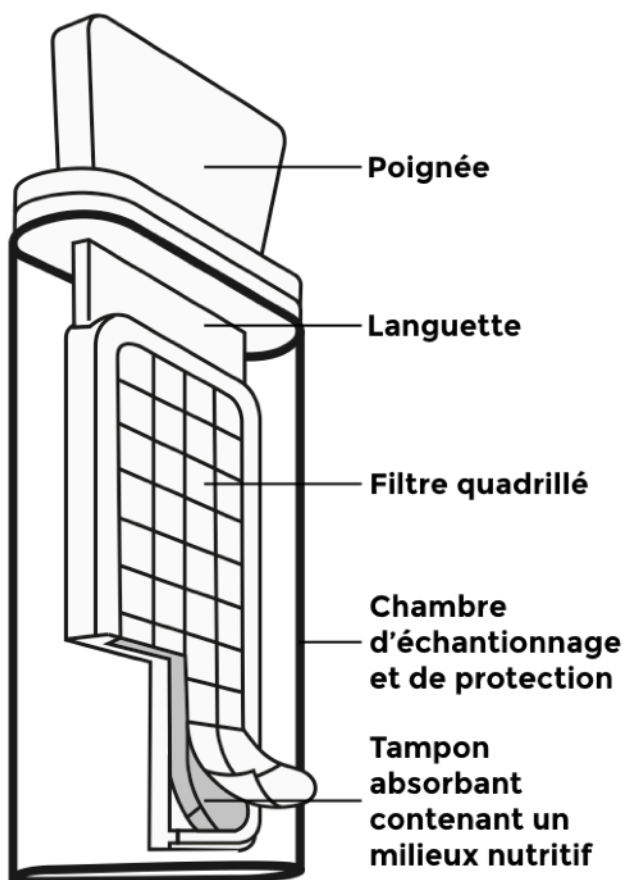


## 3-Compter

## Sections

Protocole résumé - Surfaces	2
Composants	4
Préambule	5
Échantillonnage	6
Instructions pour tester les surfaces (linéaire)	7
Instructions pour tester les surfaces (zone)	9
Guide de culture-incubation	11
Guide de dénombrement des colonies	11
Dénombrement des colonies	13
Guide d'achat	15

## Composants



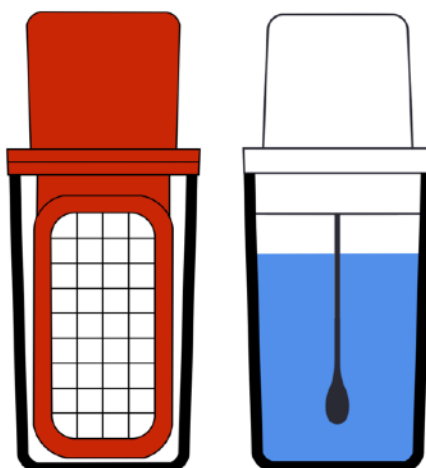
Un testeur est composé de deux parties:

- Une chambre en plastique externe utilisée pour collecter des échantillons de liquide et comme enveloppe protectrice pour la languette. Chaque chambre porte 2 marques de graduation, une pour la collection d'échantillons de 18 ml, une autre marque de 1,8 ml facilitant les dilutions au 1/10<sup>ème</sup>.
- Une poignée de test en plastique associée à une languette avec un filtre rétentif quadrillé et un tampon absorbant.
- Le tampon contient le milieu nutritif déshydraté pour assurer la croissance des organismes recherchés.
- Le filtre à membrane de 0,45 µm est lié au tampon absorbant contenant le milieu de culture et thermoscellé dans une languette facile à manipuler.
- Chaque ensemble de testeur est emballé dans une enveloppe en plastique scellée.

Un écouvillon se compose de deux parties:

- Un capuchon en plastique relié à un coton-tige,
- Une chambre externe, identique à la chambre du testeur, contenant 18 ml d'une solution tampon stérile de dilution et de neutralisation.

Un kit de test pour surfaces combine un testeur et un écouvillon



# Instructions

---

## Préambule

La collecte d'échantillons alimentaires, d'eau et de l'environnement peut avoir lieu dans divers endroits. Chaque emplacement et protocole d'échantillonnage sera associé à ses propres risques. Il est recommandé de procéder à une évaluation de ces risques et de mettre en place des mesures de contrôle appropriées avant de procéder à tout échantillonnage.

Exemples de dangers:

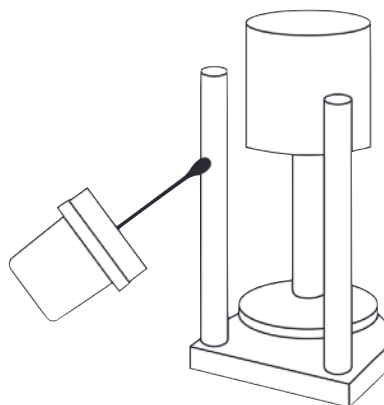
- Sols humides présentant un risque de glissade
- Travailler en hauteur lorsque des échelles / marches sont nécessaires pour atteindre les points d'échantillonnage
- Travailler dans des espaces confinés lors de l'échantillonnage de pièces mécaniques difficiles à atteindre
- Exposition aux aérosols lors de l'échantillonnage des tours de refroidissement et des douches
- Exposition à des produits chimiques irritants, corrosifs ou toxiques
- Exposition à des pièces mécaniques en mouvement
- Travailleurs isolés dans des zones telles que des locaux techniques

## Échantillonnage

### A. Échantillonnage linéaire

Les écouvillons constituent la méthode d'échantillonnage de surface la plus indiquée pour les surfaces rugueuses, inégales, courbes, difficiles à atteindre ou humides, telles que les surfaces d'équipement, les outils, les planches à découper, les claviers, les surfaces intérieures des réservoirs, les poignées de porte. Ils peuvent également être utilisés pour des surfaces planes sur lesquelles le niveau de contamination peut varier d'une partie de la surface à une autre, pour indiquer le niveau de contamination moyen.

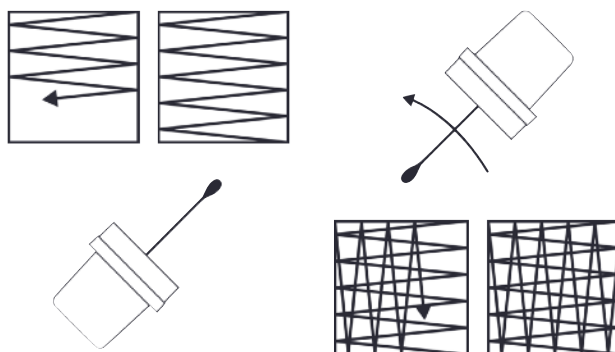
L'échantillonnage linéaire consiste à appliquer l'écouvillon de manière reproductible (angle d'écouvillon avec la surface, pression appliquée sur l'écouvillon, rotation de l'écouvillon pendant l'écouvillonnage, longueur de l'échantillon) le long d'un motif linéaire choisi. Les résultats ne doivent pas être enregistrés sous forme de nombre de microorganismes par surface car la surface frottée est difficile à estimer, mais peut être enregistrée en tant que «nombre par écouvillonnage de longueur X cm» ou « nombre



par écouvillonnage complet du joint/pièce Y ».

### B. Echantillonnage d'une surface

1. Les écouvillons peuvent être utilisés sur des surfaces planes, sèches et lisses, qui sont généralement testées avec des boîtes contact. La technique peut alors être utilisée avantageusement en écouvillonnant plusieurs surfaces plus petites que le disque de diamètre 55 mm (25 cm<sup>2</sup>) échantillonné avec une boîte contact.
2. Un certain nombre de publications indiquent que les 2 techniques appliquées à des surfaces planes, sèches et lisses ne sont pas équivalentes.
3. Les résultats doivent être enregistrés sous forme de «nombre par surface écouvillonnée» pour éviter toute confusion entre les méthodes.



## Instructions pour tester les surfaces (linéaire)

Lors du test de la surface d'équipements, de planches à découper, etc., le kit testeur nomad fournit une image globale/moyenne de la contamination sur cette surface (en n'utilisant qu'un écouvillon et testeur).

L'échantillonnage d'un point isolé peut ne pas être représentatif de l'ensemble de la zone examinée, si la contamination n'est pas répartie de façon homogène sur toute la surface. Les écouvillons sont adaptés aux prélèvements dans des crevasses, des surfaces rugueuses et incurvées et d'autres zones difficiles à atteindre. Pour la surveillance de l'efficacité d'une décontamination, la combinaison écouvillon en son tampon de dilution et de neutralisation des décontaminants usuels combiné au testeur pour germes stressés (Rouge) constitue donc une méthode de choix pour l'échantillonnage de ces zones critiques.

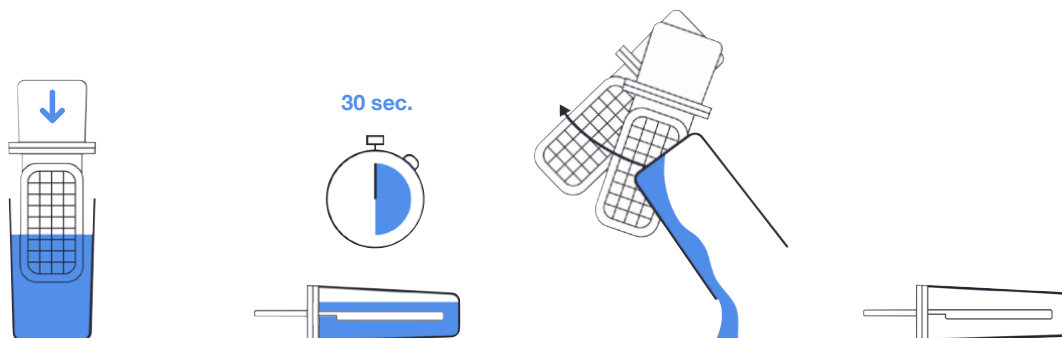
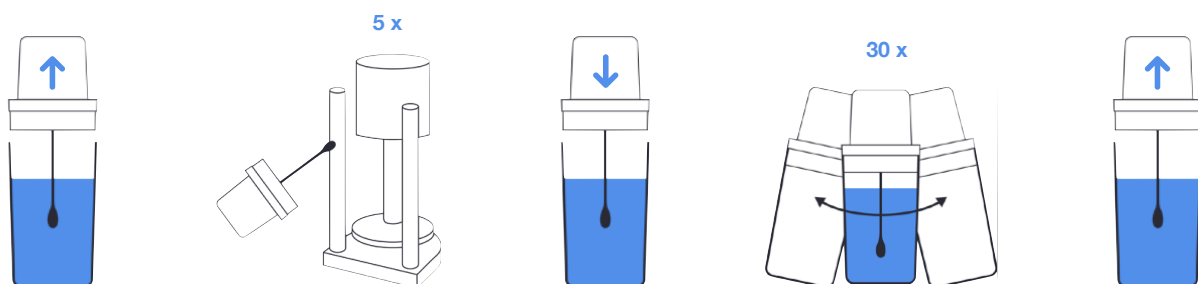
1. Écrire sur la chambre de l'écouvillon avec un marqueur indélébile : la date, le type et le lieu de l'échantillonnage.
2. Dégager l'écouvillon de sa chambre, en effectuant un mouvement de bascule avant-arrière.
3. Faire rouler la pointe de l'écouvillon sur l'intérieur du boîtier, au dessus du niveau du tampon pour essorer le tampon en excès.
4. Sélectionner 5 zones de la surface à surveiller. En tenant fermement l'écouvillon à un angle de 45° ou un autre angle choisi mais connu (qui puisse être reproduit d'une fois sur l'autre), tracez la lettre «N» sur la surface en tournant l'embout du coton-tige pendant la procédure. Chaque section droite de la lettre "N" dessinée doit avoir une longueur de 6,5 cm (la distance entre 2 coins opposés de la chambre).
5. Répéter ce test pour les quatre zones restantes sélectionnées. Chaque lettre "N" échantillonnée représente 20 cm. Ainsi 5 zones échantillonnées sont égales à 1 mètre pour chaque équipement ou surface échantillonnée. Cette méthode d'échantillonnage doit être utilisée chaque fois que le test est exécuté afin de fournir une comparaison équivalente des résultats. Lorsque la lettre "N" ne peut pas être appliquée (lames de scie, tranchouses, etc.), frottez 5 zones différentes de 20 cm.
6. Après avoir écouvillonné les cinq points sélectionnés, insérer fermement l'écouvillon dans sa chambre et agitez-le 30 fois pour suspendre dans le tampon les organismes prélevés.

Peu de temps après le prélèvement, dans l'heure qui suit si l'échantillon est maintenu à la température ambiante, procédez à un test.

7. Ouvrir l'emballage du testeur, en extraire le dispositif.
8. Écrire sur la chambre du testeur avec un marqueur indélébile : la date, le type et le lieu de l'échantillonnage.
9. Retirer délicatement la languette de son boîtier. Pour faciliter le retrait de la languette, tenir la chambre du testeur avec la membrane face à vous et basculer la poignée vers vous. Si les deux mains sont nécessaires pour réaliser cette étape, attraper la poignée entre l'index et le majeur, avec la languette coté arrière de la main. La dégager de la chambre (facilité par un mouvement d'avant en arrière de la poignée). En procédant ainsi, la main tenant la languette est libre pour d'autres actions associées à la collecte d'échantillons. Éviter de toucher la surface du filtre quadrillée à tout moment.
10. Retirer et jeter l'écouvillon en gardant sa chambre.

11. Placer la languette au dessus de la chambre de l'écouvillon et la laisser tomber dans le tampon. Enfoncer la languette fermement dans la chambre et poser le dispositif horizontalement avec la membrane vers le bas sur une surface plane. S'assurer que la membrane est uniformément mouillée. Le dispositif ne doit pas être agité pendant cette étape. Attendre 20 secondes pour que l'échantillon soit aspiré à travers le filtre et s'assurer que la bulle sortant de l'évent ait cessé de grossir avant de retirer la languette du tampon. Le filtre doit apparaître en gris uniforme.
12. Enlever la languette et, en tenant fermement la poignée, éliminer l'excès de liquide en secouant vigoureusement. Vider la chambre et réinsérer la languette. Pour éviter que la languette ne se dessèche pendant l'incubation, l'enfoncer fermement dans le chambre pour former un joint hermétique.
13. Incuber le testeur, filtre en bas, en se basant par défaut, sur la durée et la température indiquées dans le tableau du "Guide de culture-incubation".
14. Pour le dénombrement des colonies, se reporter à la section « Guide de dénombrement des colonies».

NOTE: Etant donné que seulement 1 ml des 18 ml de tampon contenant les organismes a été absorbé à travers le filtre du testeur, le nombre de microorganismes prélevé sur la surface sera le nombre observé sur le testeur, X 18. En principe, un écouvillonnage de 1 mètre linéaire avec une épaisseur de 2,5 mm correspond à 25 cm<sup>2</sup>, soit la surface échantillonnée à l'aide d'une boîte contact standard de 55 mm. Cependant, un certain nombre de publications indiquent que les 2 techniques ne sont pas équivalentes. Les résultats obtenus, si cette méthode est appliquée de manière reproductible, conviennent néanmoins pour de nombreux programmes de surveillance.





## Instructions pour tester les surfaces (zone)

Lors du test de la surface d'équipements, de planches à découper, etc., le kit testeur nomad fournit une image globale/moyenne de la contamination sur cette surface (en n'utilisant qu'un écouvillon et testeur).

L'échantillonnage d'un point isolé peut ne pas être représentatif de l'ensemble de la zone examinée, si la contamination n'est pas répartie de façon homogène sur toute la surface. Les écouvillons sont adaptés aux prélèvements dans des crevasses, des surfaces rugueuses et incurvées et d'autres zones difficiles à atteindre. Pour la surveillance de l'efficacité d'une décontamination, la combinaison écouvillon en son tampon de dilution et de neutralisation des décontaminants usuels combiné au testeur pour germes stressés (Rouge) constitue donc une méthode de choix pour l'échantillonnage de ces zones critiques.

1. Écrire sur la chambre de l'écouvillon avec un marqueur indélébile : la date, le type et le lieu de l'échantillonnage.
2. Dégager l'écouvillon de sa chambre, en effectuant un mouvement de bascule avant-arrière.
3. Faire rouler la pointe de l'écouvillon sur l'intérieur du boîtier, au dessus du niveau du tampon pour essorer le tampon en excès.
4. Sélectionner 5 zones de la surface à surveiller. En tenant fermement l'écouvillon à un angle de 45° ou un autre angle choisi mais connu (qui puisse être reproduit d'une fois sur l'autre), tracez 5 zig-zags «horizontaux» sur un carré de 2,5 cm (la taille de la poignée de l'écouvillon). Retournez le coton-tige à 180°. Tourner l'écouvillon de 90° et tracez 5 zig-zags «verticaux» sur la même surface carrée.
5. Répétez ce prélèvement pour les quatre zones restantes sélectionnées. Chaque carré échantillonné représente environ 6 cm<sup>2</sup>, ainsi 5 zones échantillonnées équivalent à environ 30 cm<sup>2</sup> de surface échantillonnée. La même méthode d'échantillonnage, par exemple le nombre de zig-zags, est à utiliser chaque fois que le test est exécuté afin d'assurer une comparabilité des résultats.
6. Après avoir écouvillonné les cinq zones sélectionnées, insérer fermement l'écouvillon dans sa chambre et agitez-le 30 fois pour suspendre dans le tampon les organismes prélevés.

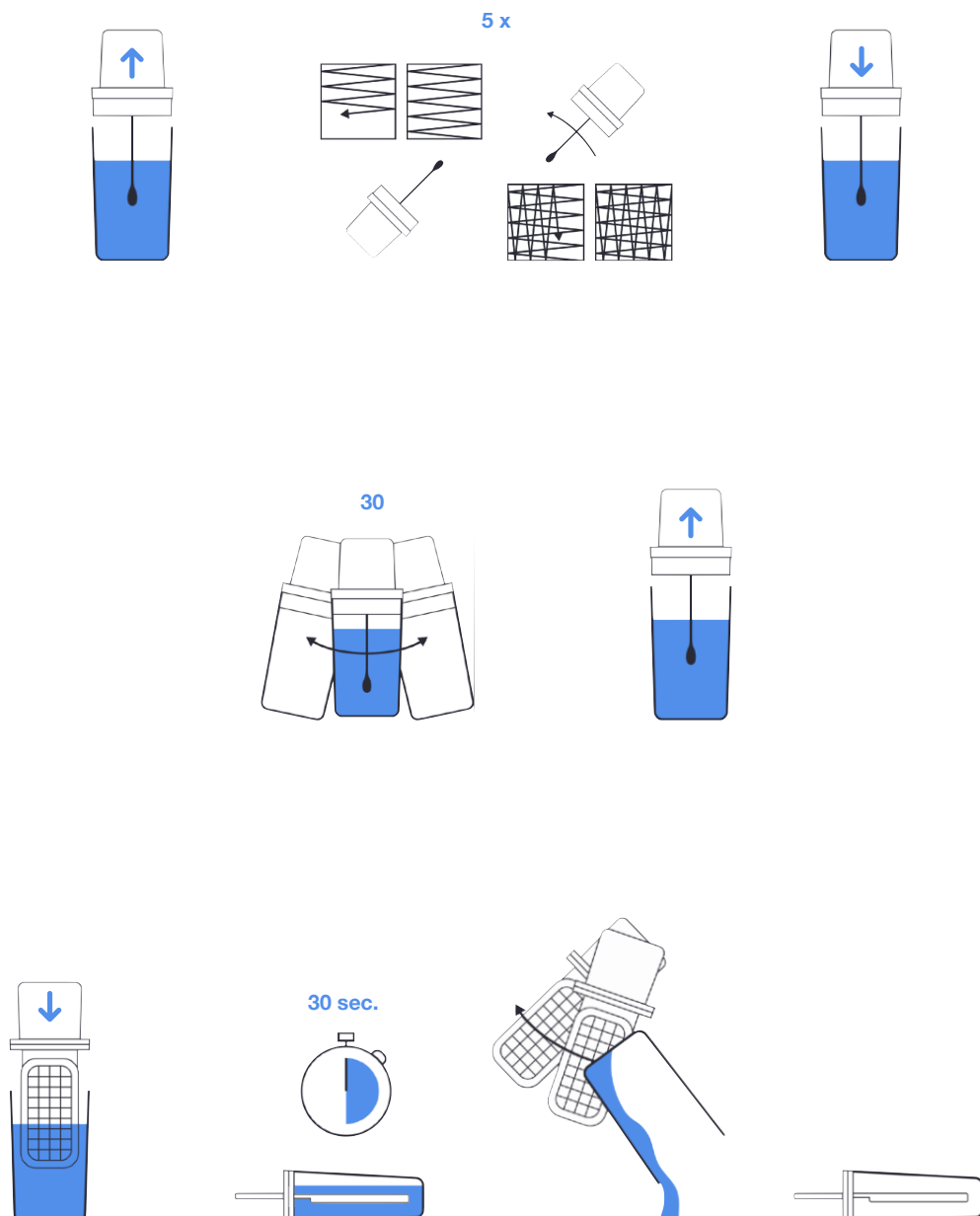
Peu de temps après le prélèvement, dans l'heure qui suit si l'échantillon est maintenu à la température ambiante, procédez à un test.

7. Ouvrir l'emballage du testeur, en extraire le dispositif.
8. Écrire sur la chambre du testeur avec un marqueur indélébile : la date, le type et le lieu de l'échantillonnage.
9. Retirer délicatement la languette de son boîtier. Pour faciliter le retrait de la languette, tenir la chambre du testeur avec la membrane face à vous et basculer la poignée vers vous. Si les deux mains sont nécessaires pour réaliser cette étape, attraper la poignée entre l'index et le majeur, avec la languette coté arrière de la main. La dégager de la chambre (facilité par un mouvement d'avant en arrière de la poignée). En procédant ainsi, la main tenant la languette est libre pour d'autres actions associées à la collecte d'échantillons. Éviter de toucher la surface du filtre quadrillée à tout moment.
10. Retirer et jeter l'écouvillon en gardant sa chambre.
11. Placer la languette au dessus de la chambre de l'écouvillon et la laisser tomber dans le tampon. Enfoncer la languette fermement dans la chambre et poser le dispositif horizontalement avec la membrane vers le bas sur une surface plane. S'assurer que la membrane est uniformément mouillée. Le dispositif ne doit pas être agité pendant cette étape. Attendre 20 secondes pour que

l'échantillon soit aspiré à travers le filtre et s'assurer que la bulle sortant de l'évent ait cessé de grossir avant de retirer la languette du tampon. Le filtre doit apparaître en gris uniforme.

12. Enlever la languette et, en tenant fermement la poignée, éliminer l'excès de liquide en secouant vigoureusement. Vider la chambre et réinsérer la languette. Pour éviter que la languette ne se dessèche pendant l'incubation, l'enfoncer fermement dans la chambre pour former un joint hermétique.
13. Incuber le testeur, filtre en bas, en se basant par défaut, sur la durée et la température indiquées dans le tableau du "Guide de culture-incubation".
14. Pour le dénombrement des colonies, se reporter à la section « Guide de dénombrement des colonies».

NOTE: Etant donné que seulement 1 ml des 18 ml de tampon contenant les organismes a été absorbé à travers le filtre du testeur, le nombre de microorganismes prélevé sur la surface sera le nombre observé sur le testeur, X 18. En principe, un écouvillonnage de 25 cm<sup>2</sup>, correspond à la surface échantillonnée à l'aide d'une boîte contact standard de 55 mm. Cependant, un certain nombre de publications indiquent que les 2 techniques ne sont pas équivalentes. Les résultats obtenus, si cette méthode est appliquée de manière reproductible, conviennent néanmoins pour de nombreux programmes de surveillance.



## Guide de culture-incubation

Lors de l'utilisation du testeur bleu, c'est-à-dire lors de l'analyse des coliformes, il faut respecter la durée et la température indiquées ci-dessous. Les autres testeurs peuvent être incubés à d'autres températures que celles indiquées ci-dessous, par exemple à température ambiante, à condition que cette température soit suivie de manière constante.

Les points médians de ces plages sont préférables.

Le temps d'incubation (sauf les coliformes) doit être d'au moins 48 heures.

Les périodes d'incubation excédant celles indiquées seront dictées par des contraintes pratiques.

La période d'incubation doit être reproductible d'une fois à l'autre pour un même test.

Incubation		
	Température (°C / °F)	Durée (Heures)
<b>Bleu (Coliformes)</b>	35 / 95	22-24
<b>Rouge (Flore Totale)</b>	25 / 77	72
ou	35 / 95	48
Microorganismes stressés par un traitement thermique, chimique ou manque de nutriments.	Température ambiante	3-7 jours
<b>Jaune (Levures et Moisissures)</b>	28 / 82	72
ou	32 / 90	48

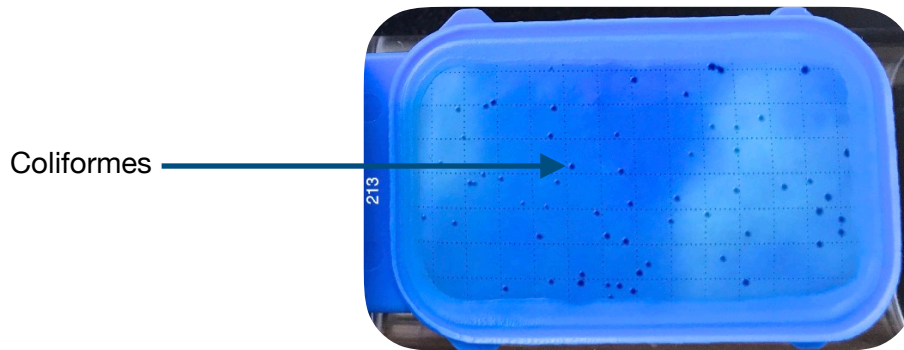
## Guide de dénombrement des colonies

- Une fois l'incubation terminée, retirer la languette de sa chambre et examiner la surface du filtre, de préférence à l'aide d'une loupe lumineuse (5X à 10 X).
- Un smartphone peut également être utilisé comme loupe, de l'une des deux manières suivantes:
- Utilisation de la fonction appareil photo avec zoom maximal
- Prendre une photo à une distance de 4 pouces ou de 10 cm, puis zoomer sur la photo. Cette approche permet également de réaliser le dénombrement plus tard ou par une autre personne. S'assurer que la date, le type d'échantillon et le lieu d'échantillonnage marqués sur la poignée ou la chambre sont visibles sur la photo.

L'apparence des colonies microbiennes variera en fonction du type de dispositif utilisé et des organismes récupérés.

Généralement ils apparaîtront comme suit:

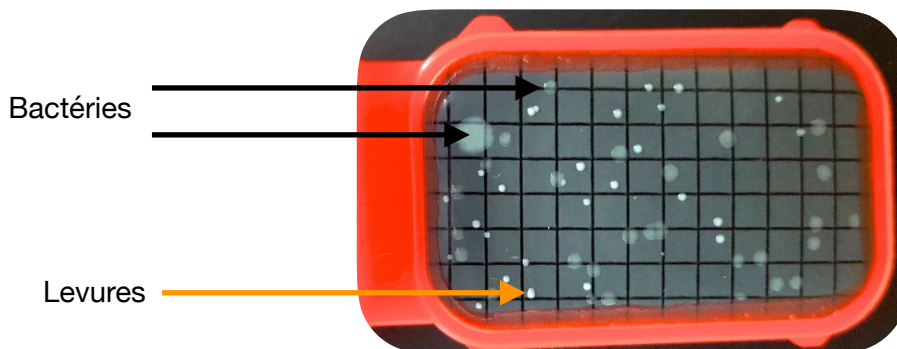
Testeurs nomad Bleus:



- Les colonies de coliformes sont bleues ou bleues / vertes.
- Les colonies non coliformes peuvent être vertes, grises ou crème.

Testeurs nomad Rouges:

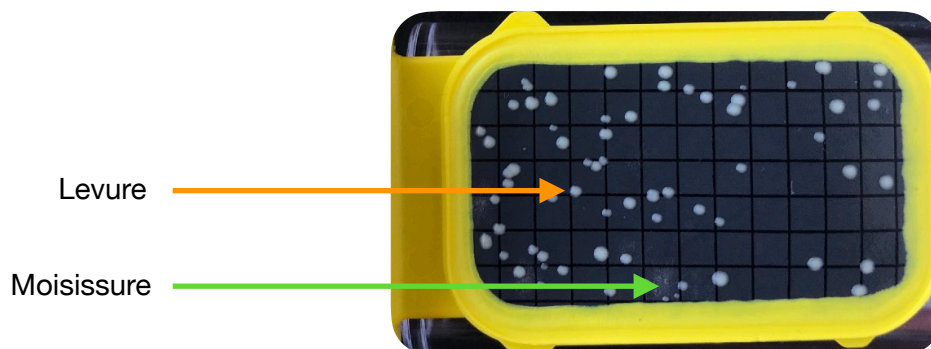
- Les colonies de bactéries apparaissent luisantes et translucides ou transparentes, de forme circulaire ou irrégulière, avec des couleurs variant de incolore à blanc, jaune crème ou parfois pigmentées.
- Les colonies de moisissures apparaissent souvent gris filamenteux blanchâtre, avec des bords flous. Ils se transforment généralement en une couleur différente, du centre vers l'extérieur
- Les colonies de levure apparaissent satinées, opaques, de couleur blanche ou peuvent devenir



vertes avec le temps.

Testeurs nomad Jaunes:

- Les colonies de moisissures apparaissent blanches, vertes ou brunes / noires et filamenteuses.
- Des colonies bactériennes peuvent apparaître mais sont généralement plus petites et plus brillantes et transparentes que les colonies de levure.



## Dénombrement des colonies

- Les colonies qui poussent à la surface du filtre sont comptées comme des organismes individuels.
- En enregistrant votre dénombrement avec le testeur bleu pour les coliformes, ne compter que les colonies bleues.

Les coliformes et les coliformes fécaux sont généralement rapportés sous forme d'un nombre par échantillon de 100 ml. Par conséquent, dans les échantillons non dilués, compter le nombre de colonies bleues obtenues et multiplier ce résultat par 100. Si l'échantillon est dilué, multiplier le nombre de 100 ml et par le facteur de dilution approprié.

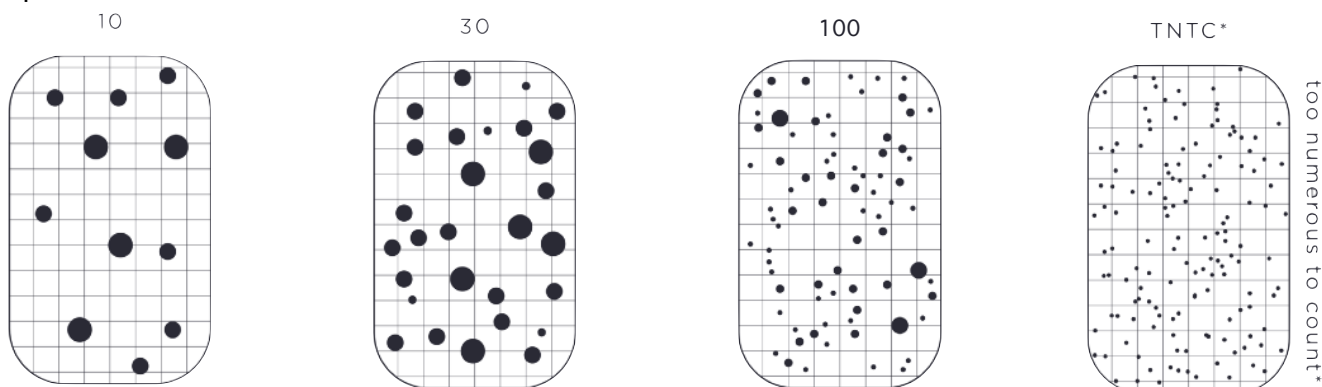
- Pour tous les autres échantillons, le nombre par ml est généralement accepté pour l'enregistrement des résultats. Par conséquent, pour les échantillons non dilués, le nombre de colonies observées sur le filtre sera le nombre enregistré sous la forme : nombre de c.f.u. / ml.

Pour les échantillons dilués, le nombre obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution.

Par exemple:

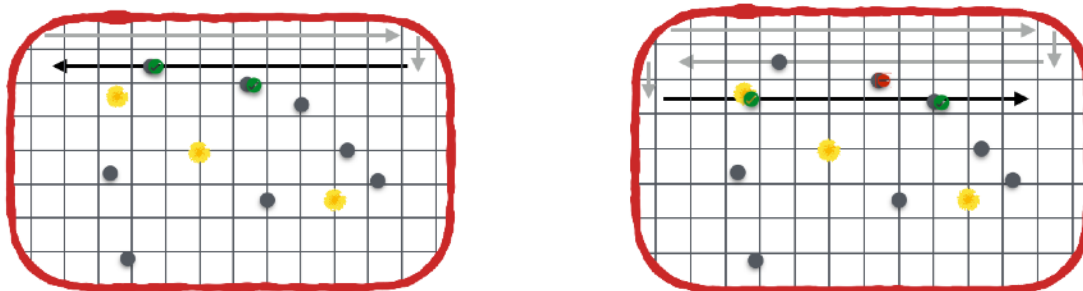
- Nombre de colonies sur le filtre = 60
- Dilution de l'échantillon = 1:10 (le facteur de dilution est 10)
- Nombre par mL d'échantillon =  $60 \times 10 = 600$  u.f.c. / ml (unités formant colonies)

Une estimation rapide du nombre d'u.f.c. peut être réalisée en comparant le filtre aux exemples présentés ci-dessous.



### Technique de comptage précise

En partant d'un coin du filtre quadrillé, suivre les quadrillages dans le sens de la longueur et compter les colonies rencontrées. Lorsqu'une colonie s'est développée sur une ligne, pour éviter les doubles comptages, ne compter la colonie que la première fois, c'est-à-dire lors du premier passage.



Sinon, en partant d'un coin du filtre quadrillé, suivre les quadrillages dans le sens de la longueur et, à l'aide d'un stylo multi-surface, marquer chaque position de colonie par un point sur la chambre. Une fois que toute la surface du filtre a été observée, compter les points.

### Lectures multiples

Certaines populations de micro-organismes croissent plus vite que d'autres.

Pour améliorer la qualité du résultat, il peut être souhaitable d'effectuer des lectures supplémentaires à des périodes d'incubation correspondant aux 2/3 et 4/3 de la durée d'incubation recommandée.

Ces lectures supplémentaires permettent:

- d'améliorer le dénombrement des populations à croissance lente dont les colonies sont difficiles à voir et à dénombrer après une période d'incubation normale
- de réduire les dénombrements équivoques du fait que certaines colonies à croissance rapide se chevauchent, se rejoignent ou se confondent avec d'autres.

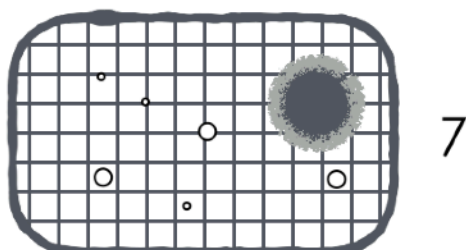
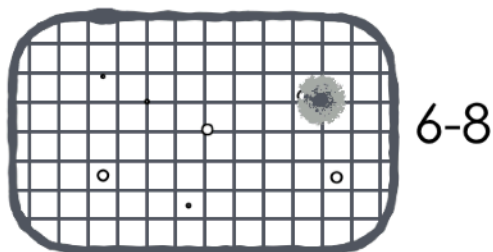
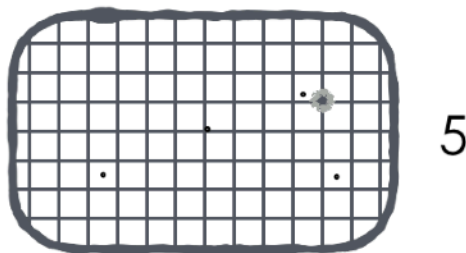
Dans cette illustration, les observations sont effectuées sur un testeur pour flore totale incubé à température ambiante.

Avant la période d'incubation recommandée, une moisissure s'est développée rapidement et a potentiellement envahi une colonie de bactéries à proximité.

En outre, une petite colonie est apparue tardivement, proche d'une ligne, et pourrait être négligée.

Le décompte final est de 8, alors que 8 colonies individuelles ne sont faciles à observer sur aucune des lectures individuelles.

Dans ce cas, l'utilisation d'un marqueur multi-surface pour marquer chaque colonie avec un point est recommandée.



## Guide d'achat

### Testeurs nomad pour liquides

Description	Couleur	Qté/Pk	Référence
Testeur Flore Totale	Rouge	25	NTRD TTC 25
Testeur Coliformes	Bleu	25	NTRD COL 25
Testeurs Levures et Moisissures	Jaune	25	NTRD YMO 25

### Kits écouvillon nomad pour surfaces

Description	Couleur	Qté/Pk	Référence
Kit Testeur Flore Totale et écouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Rouge	25	NTRK TTC 25
Kit Testeur Coliformes et écouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Bleu	25	NTRK COL 25
Kit Testeur levures et Moisissures et écouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Jaune	25	NTRK YMO 25
Ecouvillon dans tampon de neutralisation stérile	Translucide	25	NTRD SWB 25

**Remarque:** ce guide est censé être complet et précis au moment de sa publication. Il peut être sujet à changement sans préavis. Ce document ne constitue aucun engagement de quelque nature que ce soit de la part de Pinqkerton, qui ne saurait être tenu responsable des dommages accessoires ou indirects liés à l'utilisation de ce manuel.