

## PRELEVEMENT DES FLORES DE SURFACES DES TRAYONS

Objectifs de la méthode : Estimer la charge microbienne présente sur la partie des trayons en contact avec le manchon trayeur, grâce à la réalisation de frottis en surface de trayons.

### 1) PROTOCOLE POUR LE PRELEVEMENT A LA SURFACE DES TRAYONS DE BOVINS.

#### MATERIEL DE BASE.

- Lingettes non imprégnées (ni eau peptonée, ni neutralisant), préalablement découpées au laboratoire (taille idéale 15 x 15cm), emballées individuellement dans du papier aluminium et autoclavées à 121°C durant 15 min.
- Solution de sérum physiologique + tween 20 pour humidifier les lingettes
- Pulvérisateur stérile ou ayant été rigoureusement nettoyé et désinfecté à l'alcool à 70°
- Solution de sérum physiologique + tween 20 complétée à 5% de lait G (Laboratoires STANDA) pour rajouter dans les sacs contenant les lingettes avant malaxage au stomacher
- Sacs stomacher stériles refermables
- Pipettes stériles de 10 ou de 20 ml
- Lampe de poche (observation des trayons)
- 1 boîte de gants de prélèvements
- Glacière + plaques eutectiques (freeze pack)

#### PROCEDURE.

- Mettre des gants
- Préparer les lingettes : chaque lingette est déballée, humidifiée avec 5 ml de solution de sérum physiologique + tween, puis ré-emballée individuellement. Idéalement l'humidification des lingettes est réalisée la veille, au laboratoire, et chaque lingette humidifiée est mise dans un sachet plastique stérile. Lorsque ce n'est pas possible l'humidification peut être faite juste avant la traite dans une zone « propre » (laiterie, bureau, extérieur) afin de ne pas contaminer les lingettes. Elle est réalisée soit en pulvérisant la solution, soit en la répartissant sur la lingette à l'aide d'une pipette stérile (plus précis). La solution peut être prélevée et répartie avec la même pipette stérile pour toutes les lingettes à condition que la pipette n'entre pas en contact avec une surface ou tout autre élément non stérile.
- Prélever 25% des vaches du troupeau de façon à réaliser un échantillon moyen. Dans ce sens, il est important de faire avant la traite un examen visuel soigneux de l'état des trayons (propreté et intégrité) afin que l'échantillon moyen soit représentatif du troupeau.
- Prélever minimum 2 trayons par animal et par lingette en ayant soin de « croiser » pour les vaches (un trayon avant/arrière et droit/gauche de manière à prendre en compte l'hétérogénéité de salissure des 4 trayons d'un même animal).
- Frotter la partie du trayon en contact avec le manchon trayeur pendant 5 à 6 secondes en n'oubliant pas l'extrémité du sphincter.
- Mettre les lingettes au fur et à mesure dans un même sac stomacher (environ 10 lingettes tiennent dans un sac 10 x30 cm). Veiller à bien refermer les sacs en éliminant le plus possible d'air.



- Changer de gants entre chaque animal (au moins pour la main qui prélève).
- En fin de prélèvements, rajouter dans les sacs, contenant chacun au plus une dizaine de lingettes, 10 ml/ lingette de sérum physiologique + tween 20 complété à 5% de lait G (dans le but de ne pas trop stresser les flores et de neutraliser l'action éventuelle de tout produit de lavage utilisé pour préparer les trayons). Les sachets contenant les lingettes sont ensuite placés dans une glacière (+4°C). A l'arrivée au laboratoire les sachets sont malaxés au stomacher durant 2 à 4 minutes, puis les « jus » issus de chaque sachet et provenant d'un même élevage sont mélangés.
- Pour une étude à l'échelle de l'animal on ne mélangera pas les jus : les jus issus de chaque lingette sont répartis en tube pour analyses directes.
- Si les jus ne sont pas analysés dans la foulée, ils peuvent être congelés à une température inférieure à -20°C et si possible égale à -30°C (congélateur ménager) après ajout de 10% de glycérol.



## 2) PROTOCOLE POUR LE PRELEVEMENT A LA SURFACE DES TRAYONS DE CAPRINS (ET OVINS).

### MATERIEL DE BASE.

- Lingettes stériles, emballées individuellement, rectangulaires, de dimensions 32 x 18cm, imbibées de 10ml d'eau peptonée tamponnée à 10% de neutralisant de désinfection,
- Une boîte de gants de prélèvement stériles
- Alcool à 70°
- Glacière + plaques eutectiques (freeze pack),
- 1L de bouillon tryptone sel ou 1L de lait UHT,
- Pots plastiques stériles ou flacons en verre stérilisés.



### PROCEDURE.

- Prévoir de réaliser les prélèvements au minimum sur 10 chèvres multipares, réparties entre les différents passages de traite. Les chèvres sont prélevées juste avant d'être traitées et doivent avoir des mamelles saines et propres.
- Mettre des gants.
- Ouvrir le sachet contenant la lingette, la sortir et la disposer sur le plat de la main.
- Poser la lingette sur la partie du trayon en contact avec le manchon trayeur et réaliser 3 tours de trayons, puis 3 « tapotements » de l'extrémité du trayon. Garder cette même lingette et appliquer la même procédure pour le second trayon.
- Replacer la lingette dans son sachet et refermer en éliminant le plus possible d'air.
- Changer de lingette entre chaque animal.
- Changer les gants entre chaque animal ou les désinfecter à l'alcool.
- Au fur et à mesure mettre les sachets de lingettes dans la glacière.
- De retour au laboratoire mettre 90 ml de solution de tryptone sel dans chaque sachet et malaxer 2 à 3 minutes au stomacher. Le tryptone sel peut être remplacé par du lait UHT si l'on souhaite lancer une lactofermentation après le passage au stomacher.
- Prélever près du bac bunsen (ou sous hotte à flux laminaire) 20ml de solution du sachet et les mettre dans un flacon stérile.
- Répéter cette opération pour tous les sachets prélevés.
- Homogénéiser le mélange.

- A partir de ce mélange, remplir 3 flacons stériles (ou pots plastiques stériles) de 20 ml afin d'avoir 1 pot pour lancer les analyses microbiologiques et deux pots pour la congélation. Si la solution utilisée initialement est du tryptone sel, prévoir de rajouter du glycérol (à 10-15 % volume à volume) dans les échantillons qui seront congelés.
- Si du lait UHT a été utilisé, prélever 120ml du mélange afin de lancer des lactofermentations

### 3) PROTOCOLE POUR LE PRELEVEMENT PAR ECOUVILLONNAGE A LA SURFACE DES TRAYONS D'OVINS.

- Pincement de l'extrémité du trayon par la main gauche d'un des deux opérateurs qui le tire vers le bas.
- Le deuxième opérateur approche le tube contenant l'écouvillon. Avec sa main droite le premier opérateur saisit l'écouvillon et l'applique sur la peau du trayon.
- A l'aide d'un premier côté de l'écouvillon, un mouvement de va et vient est effectué sur la face caudale du trayon (10 allers-retours). A l'aide du deuxième côté de l'écouvillon, un mouvement de va et vient est ensuite réalisé sur la face crâniale du trayon (10 allers-retours). Une fois le prélèvement terminé, l'écouvillon est replacé dans son tube plastique.

#### Commentaires des auteurs.

1) Les méthodes par lingettes sont difficilement utilisables par des techniciens qui ne disposent pas du matériel. Par contre, il existe des écouvillons prêts à l'emploi fournis par les laboratoires d'analyses (gros écouvillons conditionnés dans des tubes stériles, à frotter sur les trayons. La zone à prélever est délimitée par un masque en plastique <sup>1</sup>).

2) L'utilisation de la pipette pour humidifier les lingettes est plus précise (elle permet de connaître le facteur de dilution) et ne nécessite pas d'étape de nettoyage/stérilisation comme pour le pulvérisateur.

3) Il est difficile de doser la « force » avec laquelle sont réalisés les frottis. Il est donc impératif de standardiser le temps pendant lequel on frotte. Le prélèvement effectué à l'aide de lingettes est beaucoup moins long qu'un prélèvement réalisé avec des écouvillons.

4) L'utilisation d'un autre lait en poudre que le lait G serait envisageable, mais cette option n'a pas été testée ici. L'ajout de lait G a pour objectif de « neutraliser » les effets des produits utilisés pour le nettoyage des mamelles.

5) Dans le commerce, les lingettes sont vendues pré-imprégnées ou non de liquide isotonique et avec ou sans neutralisant. L'utilisation de neutralisant peut se discuter dans le cas des bovins s'il y a eu une étape de pré-trempage mais ne se justifie pas a priori dans le cas des ovins et des caprins puisqu'il n'y a pas d'étape de désinfection avant la traite.

D'autre part, des interrogations persistent sur l'inhibition de la croissance des bactéries par les neutralisants, et la présence de ces derniers pourrait interférer avec les enzymes utilisées pour lyser les cellules dans les méthodes de biologie moléculaire. Toutefois, aucune étude comparative n'a été faite jusqu'à présent.

6) Les lingettes sont emballées individuellement, avec un emballage facile à déchirer et chez certains fournisseurs des gants stériles sont même vendus avec.

7) Les lingettes existent en plusieurs matières (de lisses à rugueuses) ce qui n'aura très probablement pas le même impact sur les microorganismes prélevés.

.../...

8) La congélation des jus de chiffonnettes est mise en œuvre pour des questions pratiques/logistiques, mais son effet sur les niveaux de microorganismes n'a pas été évalué.

Toutefois des travaux (Brouillaud-Delattre et al., 1997)<sup>2</sup> ont montré que le mode de conservation du lait modifiant le moins la flore microbienne présente est une congélation à - 30°C suivie d'une décongélation lente à 4°C.

9) Les lingettes prêtes à l'emploi s'assèchent au fil du temps. Leur conservation d'une année sur l'autre est difficile (respecter la date limite d'utilisation indiquée sur le sachet).

10) La technique décrite pour les caprins est également applicable aux ovins<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> PEP Caprin Rhône-Alpes, fiche « la flore des trayons des chèvres », D08-103, lien :

[http://www.pep.chambagri.fr/caprins/html/contenu/pdf/mail%20du%202dec08/F%20D-flore-trayons\\_A3-RV.pdf](http://www.pep.chambagri.fr/caprins/html/contenu/pdf/mail%20du%202dec08/F%20D-flore-trayons_A3-RV.pdf)

<sup>2</sup> Brouillaud-Delattre et al., 1997, J. AOAC Int. 80(4), p. 913-919)

<sup>3</sup> Barral J. et Goncalves A. 2008. Acquisition de connaissances sur les rôles de certaines bactéries isolées d'environnements laitiers et de fromages aux laits crus de chèvre et de brebis. Rapport technique. ACTILAIT. 41 pages

### PROGRAMMES DE RECHERCHE AYANT MIS EN ŒUVRE CETTE METHODE.

- Programme GIS Alpes du Nord « Pratiques des producteurs et Flore microbienne des laits »
- Programme CASDAR « Contribuer à la performance technico-économique des exploitations fromagères fermières en améliorant la maîtrise technologique et la qualité des fromages » 2008-2010 - Institut de l'Elevage
- Programme Genèse de la flore des laits – 2008-2010 UMT TREFL AURILLAC

<b>Contacts :</b> Valérie Michel et Julie Barral - Actilait Cécile Laithier et Sabrina Raynaud - Institut de l'Elevage Françoise Monsallier - Chambre d'Agriculture du Cantal	<b>Crée le :</b> 3 janvier 2011	<b>Modifiée le :</b>
--	------------------------------------	----------------------

## RMT filières fromagères valorisant leur terroir

Appelé "Réseau fromages de terroirs", il a pour vocation de répondre aux sollicitations de filières organisées valorisant les ressources de leurs terroirs (AOP, IGP, fermiers...). Ce RMT regroupe une dizaine de partenaires professionnels, techniques, de la recherche et de la formation.

Ses actions concernent les caractéristiques des fromages en lien avec leurs conditions de production, la gestion des écosystèmes microbiens, l'évaluation de la richesse et de la diversité sensorielle et la durabilité des filières.

Des ouvrages et fiches de synthèse, des outils ou encore des journées de formation/information seront proposés aux filières valorisant leurs terroirs.

Le RMT est co animé par le CNAOL et le Suaci Alpes du Nord.



**Contacts :**  
[nballot@cniel.com](mailto:nballot@cniel.com)  
[ahauwuy@suacigis.com](mailto:ahauwuy@suacigis.com)