



# LES PRELEVEMENTS : CHOIX ET METHODES

*Cette fiche donne des indications sur le choix des prélèvements à réaliser selon les germes en cause et propose une « boîte à outils » de méthodes de prélèvement utilisables en élevage et en atelier de transformation. La lecture conjointe de la fiche « ANALYSES DE LABORATOIRE » est conseillée.*

## I. QUELS PRELEVEMENTS ? POUR QUOI FAIRE ?

### 1. Objectifs des prélèvements

Dans une exploitation confrontée à un problème de germes pathogènes, les prélèvements à réaliser pour un germe donné ont trois grands objectifs :

- identifier les sources de contaminations (1) classiques ou (2) plus inattendues,
- (3) être pédagogique pour l'éleveur afin d'étayer les conseils techniques et de faciliter la mise en place de mesures de maîtrise.

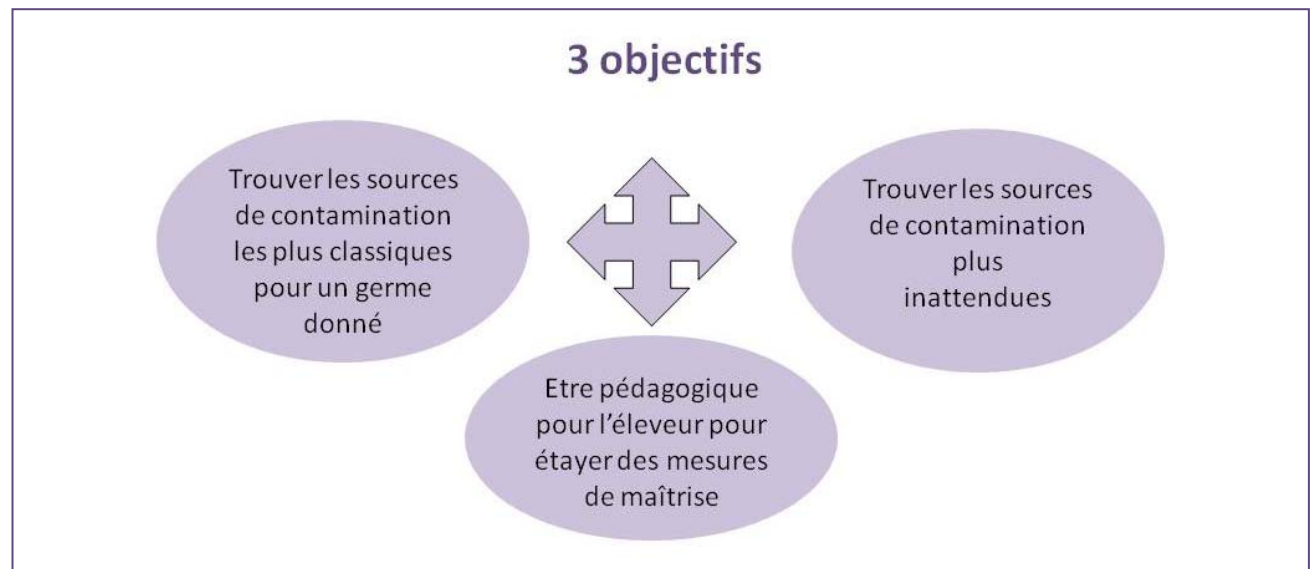


Figure 1 : Les trois objectifs poursuivis par les prélèvements réalisés lors d'une intervention sanitaire



Le tableau 1 propose une hiérarchisation des prélèvements nécessaires en fonction de la problématique rencontrée pour concilier au mieux efficacité et coûts.

**Tableau 1 : hiérarchisation des types de prélèvements à réaliser dans l'exploitation selon le type de germe rencontré**

Type de prélèvement	<i>Staphylocoques à coagulase positive*</i>	<i>Salmonelles</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELEVAGE</b>				
Lait individuel sortie mamelle	1	1	1	2
Filtre à lait		1	1	1
Lait du tank	1	1	1	1
Biofilm de la machine à traire	2	2	2	2
Joint et autres éléments de la machine à traire	1 si mauvais état, sinon 2	2	2	2
Eau des lavettes	2	2	2	2
Chiffonnette trayon	2	2	2	2
<b>ALIMENTS, EAU ET FECES</b>				
Eau de nettoyage des installations de traite et eau de fromagerie (autant d'analyses que d'origines différentes)		1 si l'eau employée n'est pas celle du réseau public Sinon 2		
Fèces-effluents-échantillon fécal composite		1 en bovins 2 pour les petits ruminants	2	2
Ensilage et/ou autre aliment		2	2	2
<b>FROMAGERIE</b>				
Fromage : analyse séparée de la pâte et de la croûte (20% croûte et 80% pâte)			1	
Matériel de fromagerie (moule, planche affinage...)		2	2 ou 1 si suspicion	2
Saumure	2	2	2 ou 1 si suspicion	2

1 : type de prélèvement fortement conseillé en première intention pour poser un diagnostic et mettre en place un plan d'action

2 : type de prélèvement conseillé, soit pour rechercher en deuxième intention des sources ou des vecteurs de contamination, soit dans un but pédagogique pour démontrer un circuit de contamination et l'intérêt d'une mesure de maîtrise

\* dont *Staphylococcus aureus*

**A noter : les prélèvements de lait de tank et de filtres à lait sont à renouveler plusieurs jours de suite car la contamination peut être intermittente.**

La définition du schéma de prélèvements (type, nombre et fréquence) doit prendre en compte à la fois :

- la complexité du problème rencontré : multiplicité des sources de contamination, intermittence de l'excrétion des animaux lorsque ceux-ci sont infectés, hétérogénéité de la distribution des bactéries dans l'environnement au sens large (bâtiments, matériel, surface, effluent...) ou dans les produits,
- les contraintes de l'exploitation (nombre d'accompagnants techniques, contraintes de laboratoire, nombre de personnes travaillant dans l'exploitation, nature des prélèvements possibles, types d'analyses possibles, existence d'une caisse coup dur ou autres dispositifs d'aide financière, nombre d'analyses et coût...).

Ce schéma doit être décidé en concertation avec le producteur en tenant compte de la situation sanitaire à résoudre (nature, niveau d'urgence et de gravité), des objectifs du producteur en matière de commercialisation de ses produits, des moyens financiers et humains disponibles pour la réalisation des prélèvements et des analyses.

Le rôle du technicien est de mettre en adéquation ces différents éléments.

Dans le cadre d'une intervention d'urgence, l'existence de faux positifs (c'est à dire de cas où l'échantillon est considéré à tort comme contaminé) ne constitue pas un problème majeur, la priorité étant de sécuriser rapidement les produits, ou le lait entrant en fabrication.

L'objectif est de réaliser des prélèvements propres, de manière aseptique, sachant que l'asepsie est parfois difficile à obtenir en élevage.

Une fiche récapitulative des échantillons prélevés un jour donné, pouvant être remise au laboratoire (copie à conserver par le technicien) est proposée à la fin de ce document.

## II. PREPARATION DE L'INTERVENTION

### 1. Equipement du technicien

Disposer d'une cote ou d'une blouse propre, de vêtements et de bottes nettoyées et désinfectées

distincts pour l'élevage et la fromagerie.

Prévoir d'avoir avec soi le nécessaire pour désinfecter ses bottes entre deux élevages, ou utiliser des surbottes.

Eventuellement, demander à l'éleveur de préparer à l'avance un seau avec une solution désinfectante ou de d'eau de Javel pour désinfecter ses bottes après les avoir nettoyées en entrant et en sortant de l'élevage.

Nettoyer et désinfecter la ou les caisses contenant les prélèvements (eau javellisée) après chaque utilisation.

Prévoir des sacs poubelle pour récupérer les déchets (gants à usage unique, papier essuie-mains...) à l'issue des prélèvements. Les gants seront changés chaque fois qu'on réalisera un prélèvement en vue d'une analyse différente.



## 2. Prendre contact avec le laboratoire

Mieux vaut contacter son laboratoire au préalable afin qu'il précise le volume ou le poids des échantillons nécessaires aux analyses en fonction du type de microorganismes recherchés et des méthodes mises en œuvre. De plus, le laboratoire pourra dans certains cas fournir du matériel de prélèvement si nécessaire (pots plastiques et sachets stériles, flacons avec inhibiteur de désinfectant pour le prélèvement d'eau...).

**Prévenir le laboratoire qu'il va recevoir des échantillons pour lesquels les analyses sont urgentes.** Parfois avec un surcoût pour l'urgence.

Vérifier que les analyses seront réalisées sur les échantillons frais (attention si le week-end approche...) et s'organiser pour amener les échantillons dans la journée où ils ont été prélevés (prévoir glacière, plaques réfrigérantes gelées à l'avance).

Mentionner le type d'analyses souhaitées et prendre en compte les délais de réponse du laboratoire dans leur choix ou dans la décision d'en conduire plusieurs simultanément.

Prévoir avec le laboratoire les modalités de récupération des résultats afin d'en disposer le plus rapidement possible et de pouvoir en fonction des réponses obtenues, relancer les fabrications ou déclencher la réalisation de nouveaux prélèvements en vue d'analyses complémentaires.

Pour plus d'informations sur les analyses se reporter à la fiche « **ANALYSES DE LABORATOIRE** ».

## 3. Liste du matériel pouvant être nécessaire pour les prélèvements d'échantillons



Figure 2 : Exemple de matériel préparé pour des prélèvements en exploitation, ou la « mallette du technicien »

### - Préparer et prévoir avant :

- marqueur indélébile et/ou étiquettes imperméables résistantes à une forte humidité,
- papier et crayons pour identifier tous les prélèvements et effectuer le relevé des échantillons,
- gants à usage unique (plusieurs paires),
- flacons et pots stériles préalablement identifiés, (par exemple : numérotation de 1 à X pour le nombre d'animaux et reprise de la liste des animaux du contrôle laitier ensuite pour faire la correspondance entre ce code et le numéro de travail, numéro de boucle); à défaut, attribution d'un numéro à chaque prénom d'animal,
- produit et matériel nécessaires au nettoyage et à la désinfection des bottes (solution désinfectante, brosse, seau...), ou mieux surbottes (figure 3), plus simples à utiliser,
- cote ou blouse propre, ou blouse à usage unique (vêtements différents pour l'élevage et la fromagerie),
- solution hydro-alcoolique pour le nettoyage-désinfection des mains (qui doivent être propres avant l'utilisation de la solution) ou lingettes désinfectantes,
- thermomètre pour mesurer la température du lait dans le tank et celle de l'eau de lavage de l'installation de traite (thermomètre à vérifier régulièrement),
- alcool à 70° pour la désinfection des trayons avant le prélèvement,
- papier à usage unique ou coton pour l'essuyage des trayons,
- louche inox sans soudure ou pots stériles à queue ou pipettes pour les prélèvements de lait dans le tank,

- sacs poubelle,
- papier essuie-mains à usage unique,
- savon liquide pour se laver les mains avant de les désinfecter,
- glacières ou caisses de polystyrène + plaques réfrigérantes préalablement placées au moins 24h au congélateur (voire toute autre caisse isotherme – attention les flacons de 5 litres d'eau prennent beaucoup de place – adapter le nombre de plaques à la température extérieure). Selon le temps de transport et si les échantillons doivent être refroidis, de la glace pilée dans une glacière s'avèrera plus efficace.

#### - Selon le type de prélèvements envisagés :

- lait UHT écrémé, si l'on prévoit d'en faire circuler dans la machine à traire, en privilégiant un conditionnement en brique avec bouchon pour les installations caprines et ovines, ou en bouteilles à bouchon à vis pour les installations bovines,
- briquet ou allumettes ou allume-gaz à flamme,
- chalumeau si prélèvement d'eau au robinet,
- chiffonnettes,
- couteau, sonde à fromage, économe, fil à couper le beurre pour les prélèvements de produits laitiers, gants, alcool, briquet, couteau de boucher (sans dent),
- cuillères ou fourchettes stériles emballées individuellement pour des prélèvements de fèces.

Avant tout prélèvement il est indispensable de se nettoyer correctement les mains et de les désinfecter, ou de porter des gants stériles ou à usage unique, après un nettoyage des mains.



<http://www.epi-net.fr>



Figure 3 : Photos présentant des exemples de sur-bottes

### III. METHODES DE PRELEVEMENT EN ELEVAGE

#### 1. Lait de tank

- penser à bien identifier les flacons avant ou juste après le prélèvement,
- profiter de ce prélèvement pour relever la température du tank et vérifier l'exactitude de l'affichage digital.

#### - Comment réaliser les prélèvements ?

- homogénéiser le lait en mettant en marche l'agitateur du tank durant 5 minutes,
- ouvrir le sachet et sortir la canne de prélèvement (figure 4) ou la pipette en veillant à ne pas toucher le flacon,
- OU à défaut, désinfecter la louche (préalablement nettoyée) avec des lingettes désinfectantes agréées pour les surfaces en contact avec des aliments, ou la flamber à l'alcool (louche inox),
- prélever dans le tank directement par le « trou d'homme »,
- plonger l'ensemble canne + flacon (ou la pipette ou la louche) dans le tank sans toucher les parois du tank,
- manipuler le flacon stérile en prenant soin de ne pas contaminer l'intérieur du flacon et du bouchon ainsi que le filetage,
- verser le contenu de la canne de prélèvement dans le flacon stérile. Répéter l'opération jusqu'à obtenir le volume souhaité dans le flacon et fermer rapidement le flacon,

- identifier le flacon du producteur (étiquette ou marqueur) si cela n'avait pas été fait avant.
- pendant l'agitation, identifier le flacon...



Figure 4 : Pot de prélèvement stérile muni d'une canne

#### - Cas particulier des prélèvements de lait en bidon, en pot ou dans la boule à lait :

- homogénéisation à la louche en faisant des va-et-vient dans le sens de la hauteur au moins 10 fois (figure 5),
- si moins de 10 bidons, prélever un échantillon dans chaque bidon puis faire reconstituer un échantillon moyen par le laboratoire,
- si plus de 10 bidons, prélever un échantillon dans 1 bidon sur 4 puis faire reconstituer un échantillon moyen par le laboratoire.

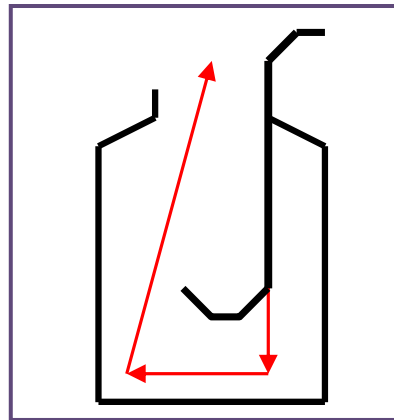


Figure 5 : Schéma d'homogénéisation du lait à la louche pour un prélèvement en bidon.

#### - Cas particulier : laitensemencé avant ou pendant la traite ou prématuration :

Attention à ne pas prélever du laitensemencé, notamment si le lait de la traite du soir est mis en prématuration ; dans ce cas, ne prélever que le lait de la traite du soir avantensemencement, sauf si l'éleveur accepte de modifier ses pratiques. Attention aussi à ceux quiensemencent avant la traite → faire décaler l'ensemencement, ce qui aura des conséquences sur la fabrication (décalage de l'heure d'emprésurage...).

## 2. Filtre de la machine à traire

Il s'agit d'un prélèvement simple à réaliser si la machine est équipée d'un filtre jetable. Dans le cas contraire, il faut trouver un moyen d'installer avant la traite un dispositif de filtration du lait. Attention : la cellulose des filtres à lait peut induire des résultats faux positifs lors d'analyses par des méthodes VIDAS (Salmonelles et STEC (E. coli) notamment).

- penser à bien identifier les flacons ou sachets stériles refermables dans lesquels les filtres seront placés, avant ou juste après le prélèvement,

#### - En cas de filtre jetable :

- procéder après la traite,
- mettre des gants,
- récupérer le filtre, le mettre dans un pot ou sac stérile et le garder au frais.

#### - En l'absence de filtre jetable :

- avant la traite, installer un dispositif stérile (filtre jetable passé à l'autoclave, gazes stériles en pharmacie...) qui jouera le même rôle que le filtre jetable, éventuellement même sur la canne d'arrivée au tank,
- après la traite, mettre des gants, récupérer le dispositif, le mettre dans un pot ou sac stérile et le garder au frais.

### 3. Lait individuel de quartier ou de demi-mamelle

Ce prélèvement est essentiel pour savoir si la bactérie est présente dans la mamelle d'un animal.

Si on va faire des prélèvements individuels pendant la traite, prévenir que celle-ci sera plus longue (dans certains cas, on peut faire ces prélèvements en dehors de la traite). Dans ce contexte, si l'on souhaite également faire un suivi de la traite, il faudra prévoir de revenir, la prise d'échantillons étant lourde et incompatible avec une visite de traite. Vérifier préalablement la quantité de lait à prélever auprès du laboratoire.

- penser à bien identifier les flacons avant ou juste après le prélèvement (N° de l'animal et repère du quartier (AVD = avant droit, ARD = arrière droit, AVG = avant gauche, ARG = arrière gauche) ou de la demi-mamelle (G=gauche et D=droite)),
- prévoir un flacon par quartier ou demi-mamelle et prélever les deux ou les quatre trayons<sup>(1)</sup>,
- intervenir après préparation de la mamelle par l'éleveur, et réalisation des premiers jets,
- si l'on a choisi de faire des prélèvements aseptiques, désinfecter l'extrémité des trayons à l'alcool à 70° : utiliser un coton imprégné d'alcool par trayon, en insistant sur l'extrémité du trayon ; commencer par les trayons les plus éloignés du manipulateur pour éviter les recontaminations (figure 7),

- ouvrir le flacon stérile au plus près du trayon (désinfecté) en tenant le bouchon dans la même main avec l'auriculaire et l'annulaire ou le flacon avec l'annulaire et l'auriculaire et la paume de la main et le bouchon avec pouce et index (attention à ne pas toucher l'intérieur du flacon) (figure 6),
- commencer par le quartier le plus proche de soi et terminer par le plus éloigné pour éviter les recontaminations (figure 7),
- récupérer aussi rapidement que possible et avec un minimum de mouvements quelques jets de lait dans le flacon stérile tenu en position inclinée (quantité à déterminer selon l'analyse). Refermer immédiatement le flacon.



Figures 6 : Photos présentant une méthode pour réaliser des prélèvements de lait individuels

<sup>1</sup> Certains préfèrent prélever le lait de plusieurs quartiers ou demi-mamelles, voire de plusieurs animaux dans le même flacon. Cela demande cependant une certaine expérience et augmente les risques de contamination par l'environnement. En cas de très gros troupeaux, c'est une solution à envisager en vue d'un premier tri des animaux.

Pour les **gros troupeaux**, il peut être nécessaire de s'adapter sachant que les prélèvements seront difficiles à réaliser de manière aseptique :

- pour un roto, il est envisageable de faire un premier tri en prélevant des lots d'animaux au tru-test avec l'aide du contrôle laitier (cela permet de limiter le nombre de prélèvements individuels) → faire des prélèvements avec le tru-test sur chaque femelle laitière et noter celles qui sont passées sur le même préleveur automatique (attention : survenue inéluctable de contaminations croisées),
- la situation est délicate en cas de robot de traite, surtout si le troupeau est de taille importante et si l'exploitation ne dispose pas d'installations de contention efficaces (les animaux ont moins l'habitude d'être manipulés) : faire des « sous-lots » de lait toutes les heures pour prélèvement et enregistrer l'ordre et l'heure de traite de chaque animal. Ou utiliser le prélèvement automatique de type « contrôle laitier » (attention : survenue possible de contaminations croisées). Puis refaire des prélèvements individuels si nécessaires sur les animaux dont les résultats ont été trouvés non satisfaisants.

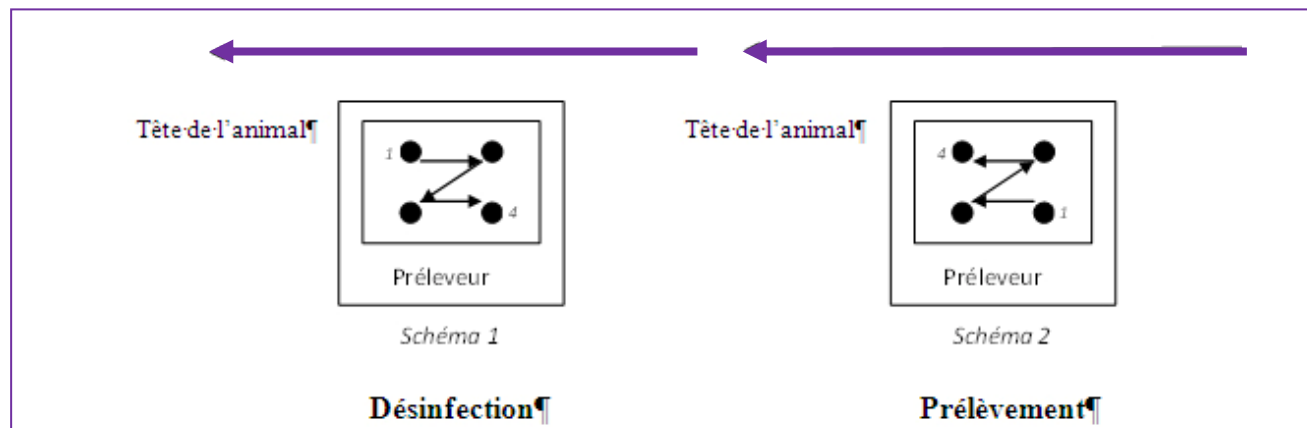


Figure 7 : Schéma d'ordre de désinfection et d'ordre de prélèvement des trayons pour les vaches

#### 4. L'eau

Habituellement les analyses d'eau (critères de potabilité) se font sur 100 ml exception faite des germes comme *Listeria* pour lesquels il sera nécessaire de prélever au minimum 1 litre (volume plus représentatif). Certains laboratoires demandent même des prélèvements allant de 2 à 5 litres, pour *Salmonelle* par exemple.

Attention, les germes *Salmonelle*, *Listeria* et *staphylocoques* à coagulase positive (ces derniers pouvant être recherchés dans l'eau des lavettes) ne font pas partie des critères de potabilité de l'eau et ne sont donc pas analysés en routine par les laboratoires d'analyse d'eaux. Si la recherche des *Salmonelles* dans l'eau ne pose pas de soucis, celle des *Listeria* peut s'avérer plus délicate à mettre en œuvre. Cela nécessite donc de se renseigner au

préalable sur les laboratoires de proximité et leurs compétences. Dans tous les cas, voir directement avec le laboratoire les volumes nécessaires à prélever en fonction du (des) germe(s) recherché(s). Le laboratoire met en général à disposition des flacons stériles pour les prélèvements. Dans le cas d'échantillons ayant subi un traitement de désinfection (au chlore, au brome ou à l'ozone ou au peroxyde d'hydrogène) le flacon servant au prélèvement doit contenir quelques gouttes de solution « stabilisante » apportant 17,5mg de thiosulfate de sodium par litre d'échantillon. Des flacons stériles contenant déjà cette solution sont généralement fournis par les laboratoires.



### - Prélèvement de l'eau à l'origine (voir annexe 1) :

*Lorsqu'un prélèvement d'eau est nécessaire, il faut en principe réaliser la prise d'échantillon sur le robinet le plus proche de la source d'eau (puits, forage, source). Pour des raisons de praticité il est souvent effectué au robinet situé dans la salle de traite ou la laiterie. Si l'eau provient du réseau public il s'agira plutôt d'un prélèvement de 2<sup>ème</sup> intention. Si l'eau d'un puits est utilisée sur l'exploitation ou en fromagerie, il faut faire un pompage pendant 5 à 10 minutes pour obtenir la qualité d'eau habituelle, avant de faire le prélèvement.*

- penser à bien identifier les flacons avant ou juste après le prélèvement, en ayant vérifié si le laboratoire souhaite avoir sur le flaconnage des informations précises,
- retirer s'il y a lieu, les filtres ou brise-jets du robinet,
- laisser couler l'eau froide pendant au moins 2 minutes pour purger la canalisation,
- flamber l'orifice du robinet au chalumeau pendant 30 secondes, ou réaliser un flambage à l'alcool à 70°,
- refroidir (en cas de flambage) le robinet en faisant couler l'eau froide à débit normal pendant au moins 30 secondes,
- ouvrir le flacon stérile au dernier moment, puis procéder au prélèvement en veillant à ne pas toucher avec les doigts le col et l'intérieur du bouchon et en ne remplissant pas le flacon jusqu'à ras bord,
- disposer le ou les flacons dans une glacière préalablement remplie de plaques réfrigérantes et acheminer vers le laboratoire le plus rapidement possible. Idéalement, les prélèvements doivent être amenés et soumis

aux analyses dans les 8 à 12 heures suivant le prélèvement et au plus tard dans les 24 h, l'eau n'étant pas un milieu de culture idéal pour ces microorganismes ! Les flacons doivent être conservés dans l'intervalle entre +1 et +4°C.

### - Prélèvement de l'eau dans les abreuvoirs collectifs (bacs) :

Prélever, utiliser des flacons stériles, porter des gants et les changer pour chaque abreuvoir (on peut enfoncer le flacon dans l'abreuvoir ou récupérer l'eau à la vidange de l'abreuvoir).

### - Prélèvements de l'eau dans les abreuvoirs individuels :

- mettre des gants et les changer pour chaque abreuvoir,
- faire couler de l'eau pour remplir l'abreuvoir, prélever (on peut tremper le flacon dans l'abreuvoir), avec un flacon ou un pot stérile.

### - Eventuellement, prélèvement de l'eau dans les mares, flaques ou les ruisseaux accessibles aux animaux :

- bien agiter l'eau pour mettre en suspension la matière organique qui peut s'y trouver,
- prélever (on peut tremper le flacon dans l'eau), utiliser des flacons stériles, mettre des gants et les changer à chaque prélèvement.

### - Prélèvement de l'eau des lavettes :

*Prélever l'eau des lavettes soit en début de traite pour voir si elles sont bien entretenues entre deux traites, soit en fin de traite, ceci afin d'avoir une image globale de la contamination des mamelles du troupeau. Ces analyses peuvent avoir un intérêt pédagogique.*

- bien agiter l'eau pour mettre en suspension la matière organique qui peut s'y trouver,
- prélever (on peut tremper le flacon dans l'eau), en utilisant des flacons stériles et en portant des gants qui seront changés entre chaque prélèvement.

## 5. La machine à traire

*Ces éléments sont extraits d'une fiche de procédure réalisée dans le cadre du RMT « Fromages de terroir » (voir annexe 2). Quatre techniques de prélèvement sont présentées ici. Elles n'ont jamais été comparées de façon expérimentale. La méthode à l'eau stérile est la méthode « officielle » normalisée, mais la technique recourant à du lait UHT est plus adaptée aux petites installations et aux petits diamètres de canalisation.*

- penser à bien identifier les flacons avant ou juste après le prélèvement,

### - L'eau résiduelle du lavage de la machine à traire :

Avant la traite du matin, si l'éleveur a pour pratique régulière de ne pas purger l'installation après la traite du soir :

- désinfecter l'orifice du robinet de purge en le frottant avec un coton imbibé d'alcool, laisser couler un peu d'eau résiduelle, prélever,
- utiliser un flacon stérile et le remplir (quantité à adapter à l'analyse prévue).

### - Lait UHT collecté après circulation dans la machine à traire :

Le principe est le suivant : avant la traite, du lait UHT écrémé est passé dans le circuit habituel du lait et échantillonné. Le fait d'utiliser du lait écrémé permet de limiter les dépôts éventuels dans la machine à traire, puisque seul un rinçage est réalisé entre cette manipulation et la traite.

Le travail est réalisé avec des gants stériles (ou lavage et désinfection des mains).

Il s'agit de faire aspirer par l'installation de traite 8 à 10 litres de lait UHT écrémé en unités de 1l en brique avec bouchon à vis, à raison de 1 litre par manchon (la pompe doit se déclencher automatiquement). Selon les installations, et notamment la longueur du lactoduc et la taille de la chambre de réception, la quantité de lait UHT pourra être plus importante.

Deux modes d'organisation sont envisageables (utiliser toujours la même méthode) :

- soit on se place au niveau des manchons situés au bout du circuit de la machine à traire (2 manchons dans le cas où le lactoduc est linéaire, 4 manchons dans le cas où le lactoduc forme un Y),
- soit on fait le choix de répartir le lait entre les manchons de chaque côté : par exemple si on est en 2 fois 5 postes, on peut choisir 2 postes d'un côté et 2 postes de l'autre : poste 1 manchon gauche, manchon droit puis poste 2....

L'aspiration du lait se fait après désinfection de la partie extérieure des manchons avec de l'alcool à 70° (figure 8). Le lait est récupéré au niveau de la canule de réception (la quantité récupérable de

lait ayant circulé dans la machine est d'environ 2 litres, le reste étant évacué par gravité) dans un seau « stérile » (frotté à l'alcool à 70°). Il est ensuite homogénéisé avec une louche désinfectée, puis la quantité nécessaire aux analyses est stockée dans des flacons stériles.



Figure 8 : Introduction du lait UHT dans un manchon (machine à traire pour les caprins)

### - Eau stérile passée dans la machine à traire :

La procédure utilisée se réfère à la norme AFNOR U36-015. Le bac de nettoyage de la machine à traire est d'abord nettoyé avec un produit détergent désinfectant de machine à traire classique et rincé à l'eau claire du robinet. Après vidange de l'eau, les parois du bac sont soigneusement frottées avec un coton hydrophile imbibé d'alcool à 70°. La bonde et la partie du tuyau d'où part la solution de nettoyage en contact avec l'eau stérile sont désinfectées de la même façon. Le bac est ensuite rempli avec la quantité d'eau habituellement utilisée pour

l'opération de pré-lavage. Cette eau est alors stérilisée par adjonction d'une solution d'hypochlorite de sodium à 9,6 % de chlore actif (36° chlorométriques) qu'on laisse agir pendant 10 minutes (3,5 ml pour 20 litres de solution), puis elle est neutralisée avec 100 ml d'une solution tampon à pH 7,2 contenant 0,85 g de phosphate monopotassique et 5 g de thiosulfate de sodium, préalablement stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 min. On réalise d'abord un premier rinçage de la machine à traire en faisant circuler l'eau stérilisée pendant 5 minutes (la norme indique 30 L mais ce volume devra être redéfini selon la machine à traire) dans les mêmes conditions que le nettoyage habituel de la machine, puis l'eau est évacuée. Cette première étape sert à humidifier les parois de la machine à traire. On prépare ensuite à nouveau le même volume d'eau stérile dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Les échantillons pour analyse sont uniquement prélevés à partir de l'eau du second rinçage. Avant de procéder au second rinçage, on prélève aseptiquement un échantillon de 50 ml de l'eau désinfectée dans un flacon stérile de 100 ml contenant 2 ml d'une solution stérile à 25 grammes par litre de peptone. Le second rinçage de la machine à traire est réalisé de la même manière que le premier. Dès la fin du rinçage et lorsqu'au moins 90% de l'eau ont été recueillis dans le bac de lavage, on prélève aseptiquement un échantillon d'eau de même capacité et dans des conditions identiques à celles du premier prélèvement réalisé avant le rinçage. Les échantillons doivent ensuite être conservés au froid entre 0°C et 4°C, durant leur transport et pendant leur temps de stockage au laboratoire.

### - Eau passée dans la machine à traire :

C'est une adaptation de la méthode de référence (voir § eau stérile page 10).

Remplir avant la traite le bac de lavage du système de traite d'eau froide. Homogénéiser l'eau du bac plein et en prélever 1L dans un flacon stérile avant son aspiration par le système de lavage. Faire circuler dans le système de traite maintenu en position fermée pendant 5 minutes (cycle de lavage sans produit- attention de ne pas mettre de produit de lavage, notamment s'il existe une pompe doseuse automatique). Récupérer 1 L d'eau à l'évacuation dans un flacon stérile en ayant pris soin de vérifier la propreté du conduit d'éjection et de le nettoyer si besoin. Ne pas prélever les premiers litres évacués.

Cette méthode peut aussi être pratiquée avec de l'eau chaude (eau à 45°C au départ pour qu'elle soit à 37°C dans la machine à traire) et en créant des turbulences en bouchant alternativement les manchons pour mieux décoller les biofilms.

## 6. La peau des mamelles des animaux : prélèvements par chiffonnage

*Toujours penser à la sécurité du préleveur : ainsi en cas de problèmes de sécurité, ne pas prélever en étable entravée.*

*Au cours de la traite, prélever au minimum 5 animaux en production pour l'ensemble de la mamelle et 5 animaux pour les trayons. Les méthodes présentées ici (nombre d'animaux à prélever...), sont des recommandations à dire d'expert, et n'ont pas fait l'objet d'évaluations scientifiques. Les animaux sont pris au hasard. Les chiffonnages peuvent ensuite être regroupés au laboratoire pour faire l'objet d'une seule analyse.*

Une fiche a également été réalisée dans le cadre du RMT « fromages de terroir » (voir annexe 3).

➤ Penser à bien identifier les flacons ou les sacs où sont déposées les chiffonnages avant ou juste après le prélèvement,

### - Prélèvements sur la peau de la mamelle entière :

*Prélever un nombre d'animaux correspondant à 10% du nombre total de femelles laitières, avec un minimum de 5 animaux, avant hygiène de traite éventuelle.*

- en salle de traite prélever environ 1 à 2 femelles par bande en alternant les quais si la salle de traite comporte 2 quais,
- sortir 1 lingette et l'imbiber d'eau stérile avec la pipette (10 à 15 ml) ou utiliser des lingettes pré-imbibées de liquide isotonique stérile emballées individuellement et de taille au moins égale à 15\*15 cm,

- frotter la chiffonnette bien dépliée sur l'ensemble de la mamelle durant 10 secondes ; la force du prélèvement étant difficile à standardiser, il est important de respecter cette durée,
- mettre la chiffonnette dans un pot ou un sachet stérile et la garder au frais jusqu'au laboratoire.

### - Prélèvement sur la peau des trayons :

*Prélever un nombre d'animaux correspondant à 10% du nombre total de trayons avec un minimum de 5 prélèvements. A réaliser après l'application des mesures d'hygiène de traite (si elles sont réalisées), sur les trayons prêts à être branchés.*

- en salle de traite réaliser le chiffonnage des trayons d'une femelle par bande en alternant les quais si la salle de traite comporte 2 quais,
- sortir 1 lingette et l'imbiber d'eau stérile avec la pipette (10 à 15 ml) ou utiliser des lingettes pré-imbibées de liquide isotonique stérile emballées individuellement et de taille au moins égale à 15\*15 cm,
- frotter la chiffonnette bien dépliée sur les trayons, veiller à bien frotter le sphincter,
- prélever les 2 ou 4 trayons avec la même chiffonnette,
- mettre la chiffonnette dans un pot ou un sac stérile et la garder au frais jusqu'au laboratoire.

## 7. Les fèces et effluents

*Ces prélèvements ont, dans la plupart des cas, un objectif pédagogique. Il peut donc être contre-productif de ne rien trouver. Par conséquent, il faudrait s'intéresser, selon les objectifs :*

- *aux substrats qui « gardent la mémoire » des contaminations fécales. Il s'agit par exemple, de zones d'accumulation comme celles qu'on trouve dans des recoins d'étables, des rebords de logettes, des pâles de racleurs ou la chaîne à fumier, à partir desquelles on réalisera des échantillons composites,*
- *aux substrats qui témoignent de la contamination instantanée des intestins de tel ou tel animal (contamination fluctuante),*
- *aux fèces ou effluents d'autres animaux que ceux du troupeau lorsque l'élevage semble présenter un profil de risque particulier lié aux contacts entre ces animaux et les femelles laitières.*

*Les méthodes présentées ici (nombre d'animaux à prélever...), sont des recommandations à dire d'expert, et n'ont pas fait l'objet d'évaluations scientifiques.*

**Rappelons qu'une absence d'isolement du germe sur ces prélèvements ne signifie pas que la bactérie n'a pas été présente, ou n'était pas présente à proximité, ou ne sera pas présente ensuite.**

**Ne pas faire de prélèvements d'effluents avec la louche qui sert pour le lait même si elle est désinfectée.**

### - Echantillon composite fécal :

- prélever de petites quantités au moins en 5 points dans des zones d'accumulation comme celles qu'on trouve dans des recoins d'étables, des rebords de logettes, des pâles de racleurs ou la chaîne à fumier, dans un pot stérile, directement à la main avec des gants, ou à l'aide d'une cuillère ou une fourchette stérile,
- remuer pour l'homogénéiser le mélange ainsi obtenu, à la main (gants) ou si possible avec une cuillère ou une fourchette stérile,
- le pot doit être rempli au moins à moitié mais pas complètement.

### - Les fèces des animaux :

Effectuer les prélèvements en respectant les grands principes suivants :

- utiliser des pots stériles et porter des gants stériles ou à usage unique à changer pour chaque prélèvement,
- utiliser le cas échéant une cuillère ou une fourchette stérile sous emballage individuel pour le prélèvement,
- réaliser un nombre de prélèvements égal à 10% de l'effectif du troupeau, avec un minimum de 5 animaux pris au hasard (1 bouse ou des crottes du même animal par pot),
- collecter des effluents frais (si possible sur le sol lorsque l'animal vient de déféquer ou même à la sortie de l'anus en cours de défécation),
- privilégier des prélèvements contenant peu de paille,
- remplir les pots au moins à moitié mais pas complètement (risque d'éclatement).

- Au laboratoire, les fèces des différents pots peuvent être poolés en vue d'une analyse en mélange. Il n'est généralement pas nécessaire de refaire des analyses de fèces individuelles par la suite dans la mesure où les mesures de maîtrise ne sont pas individualisées et que l'excrétion se caractérise par son intermittence.

Attention : les prélèvements rectaux à l'intérieur du rectum sont un acte vétérinaire.

### - Les effluents :

#### \* Cas d'une fosse à lisier :

- soit : réaliser un prélèvement au(x) point(s) de déversement du lisier dans la fosse, à 10-20 cm de profondeur,
- soit : utiliser un pot stérile à queue sous emballage individuel attaché à une ficelle :
  - lancer le pot dans la fosse, si nécessaire en attachant la canne avec une ficelle (pot et ficelle à changer entre chaque élevage),
  - remplir les pots au moins à moitié mais pas complètement (risque d'éclatement).

#### \* Fumière, fientes de volailles...

- prélever du **fumier frais, ainsi que du jus d'écoulement du tas,**
- choisir au moins 5 points de prélèvements en vue de réaliser un échantillon composite,
- ne pas prélever au centre du tas : faire des prélèvements en zone superficielle et moyenne,
- utiliser les pots stériles (les remplir au moins à moitié mais pas complètement).

## 8. L'environnement

Les méthodes présentées ici (nombre d'animaux à prélever...), sont des recommandations à dire d'expert, et n'ont pas fait l'objet d'évaluations scientifiques.

### - Prélèvements d'aliments :

Prélever des échantillons des aliments semblant présenter des facteurs de risque (défaut de conservation, risque de contamination par les fèces...). Des prélèvements réalisés sur les tables d'alimentation peuvent avoir une visée pédagogique. La quantité à prélever sera fonction du type d'analyse souhaité et des recommandations du laboratoire.

- prélever en 5 points de l'aliment, pour cela :
  - prélever dans un sac stérile de grande taille 5 échantillons d'aliment, à la main (gants ou main nettoyée/désinfectée), ou à l'aide d'un instrument stérile,
  - mélanger pour obtenir un échantillon homogène, soit en malaxant le sac après l'avoir refermé, soit en lui faisant subir 7 retournements tête-bêche en laissant bien l'aliment s'écouler (par exemple pour des granulés ou des céréales,
  - prélever ensuite dans ce sac la quantité nécessaire pour l'analyse,
  - mettre cet échantillon composite dans un sac ou un pot stérile.

### - Prélèvements d'environnement par chiffonnage :

Prélever en 5 endroits, avec une chiffonnette différente à chaque fois (on peut éventuellement les regrouper ensuite pour l'analyse) : sur la partie basse des murs, les barres de cornadis, ou tout autre endroit susceptible d'être souillé par les fèces et léché par les animaux.

- porter des gants,
- frotter la chiffonnette sur une surface de 10\*10 cm, 10 fois horizontalement et 10 fois verticalement, (possibilité de faire réaliser un gabarit ou cadre métallique à flamber à l'alcool avant prélèvement (figure 9), ou d'utiliser un « pochoir » en plastique confectionné en découpant un cadre dans une feuille de plastique rigide, qui sera soigneusement désinfecté avant prélèvement (figure 12),
- mettre la chiffonnette dans un sac ou un pot stérile et la garder au frais jusqu'au laboratoire.



Figure 9 : Matériel nécessaire pour un prélèvement par chiffonnette à l'aide d'un cadre

## IV. METHODES DE PRELEVEMENT EN FROMAGERIE

### 1. Les produits laitiers

Quel que soit le type de prélèvement, sa qualité est essentielle pour le diagnostic de situation. Il est inutile de donner des raisons à l'analyse d'être mauvaise ! Pensez à bien nettoyer et désinfecter votre ustensile de prélèvement. Cela évitera par ailleurs, en cas d'analyse non satisfaisante, d'être induit en erreur en partant sur une mauvaise piste.

### - Les produits laitiers frais :

Quelques règles à appliquer pour que les échantillons qui partent au laboratoire soient le plus utiles possibles :

- quantités minimales requises : d'après la norme FIL 50B (1985) les quantités minimales de lait, produits laitiers liquides à prélever sont de **200ml** (ou 200g),
- représentativité de l'échantillon: pour pouvoir interpréter un résultat, il faut être sûr de ce sur quoi il porte :
  - lait : évitez de prendre l'échantillon sur un seul coup de pompe de la machine à traire, ou encore juste à la sortie de l'écumeuse. Essayez de prélever dans un volume plus grand (bac tampon, seau...),
  - produit : prélever en fin de processus de fabrication, pour que l'échantillon tienne compte de toutes les étapes de fabrication. Préférez donc un échantillon de beurre moulé, plutôt que pris dans la baratte.

### - Le lactosérum :

- homogénéiser à la louche préalablement nettoyée et désinfectée (flambée à l'alcool à 70°C (louche inox) ou frottée avec une lingette désinfectante agréée pour contact alimentaire) en faisant des va-et-vient dans le sens de la hauteur au moins 10 fois.
- prélever un échantillon de 200g dans un pot stérile.

### - Produits laitiers fermentés fermes (yaourts) :

(norme FIL 50B :1985)

Pour ces produits, l'échantillonnage devra être effectué à partir de lots composés de petits récipients destinés à la vente au détail. Le poids minimal à prélever est de 200g. Donc prévoir 2 pots de yaourts pour l'analyse si le conditionnement est en 125g. Durant les temps de stockage et d'acheminement vers le laboratoire, la température de ces produits doit être maintenue entre 0 et + 4°C.

### - Les fromages :

#### \* Modalités d'échantillonnage :

Le résultat microbiologique de l'analyse d'un fromage dépendra de l'endroit où le prélèvement a été réalisé. En effet, le fromage est un produit hétérogène en termes de répartition des microorganismes.

On peut avoir 2 cas de figures :

- **analyse sur le produit total** : prélèvement de la croûte et de la pâte, Ce prélèvement total est fréquent lors des contrôles officiels, dans le cas où le consommateur est censé consommer l'ensemble du produit,
- **analyse séparée de la croûte et de la pâte** : ces prélèvements sont délicats car il faut éviter la contamination de la pâte par la croûte. Le mieux est de prélever l'ensemble et de demander au laboratoire de séparer les deux.

En règle générale, les pratiques des laboratoires sont les suivantes :

- *Listeria* : recherche dans 25 g pâte + croûte (80-20%),
- Salmonelle : recherche dans 25g avec ou sans croûte, mais d'autres exigences peuvent être fixées par le client ou la DDPP,
- pour les dénombrements d'autres germes (staphylocoques à coagulase positive, *E.coli*) prévoir 10g minimum d'échantillon.

**Pour les quantités prélevées prévoir au moins 2 fois la quantité nécessaire à l'analyse, soit 20 à 50g selon le germe, afin que le laboratoire dispose d'un échantillon de « secours ». Dans tous les cas, le déterminer au préalable avec son laboratoire.**

#### \* Techniques de prélèvement en fonction des formats :

Les outils utilisés pour le prélèvement doivent être stériles. Après avoir été soigneusement nettoyés, soit ils ont été stérilisés grâce à un autoclave ou bouillis durant 10 minutes, soit ils peuvent être stérilisés au dernier moment par aspersion d'alcool à 70° et passage à la flamme. Attention

aussi aux surfaces sur lesquelles sont effectués les prélèvements : elles doivent aussi être nettoyées et désinfectées au départ et entre chaque prélèvement.

- prendre un sachet stérile et l'identifier,
- veiller à avoir les mains propres et désinfectées,
- désinfecter le couteau,
- ouvrir le sachet,
- découper un échantillon de 1 à n fromage(s) du lot et les introduire dans le ou les sachet(s). Le volume de chaque échantillon est fonction du poids de produit nécessaire pour l'analyse (se reporter aux spécifications du laboratoire). La forme de l'échantillon est fonction de la forme du fromage (figure 10),
- refermer le sachet,
- les échantillons prélevés sont immédiatement stockés au froid (dans une glacière contenant les plaques réfrigérantes par exemple).

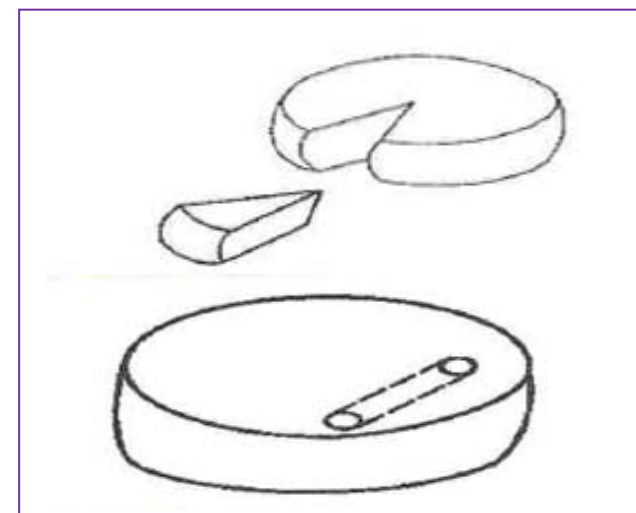


Figure 10 : Exemples de choix de la méthode d'échantillonnage selon la forme du fromage (d'après norme FIL 50C, 1995).

### **Utilisation d'une sonde à fromage**

De forme et dimensions appropriées selon le fromage à échantillonner (figure 11). Ces sondes sont adaptées pour des fromages de type pâte molle, bleu et pâte pressée. La poignée, la lame et la tige doivent être de préférence en acier inox

poli. Les arêtes et l'extrémité de la lame doivent être suffisamment tranchantes pour l'échantillonnage d'un fromage dur.



Figure 11 : Photo de sonde à fromage  
(source : [www.meilleurduchef.com](http://www.meilleurduchef.com))

Des dimensions sont données à titre indicatif dans le tableau 2 :

Tableau 2 : type de sonde à fromage à utiliser selon la taille du fromage à prélever

	Type A – long (Comté, Beaufort, Emmental...)	Type B- moyen (tome, raclette, bleu...)	Type C- court Type pâtes pressées non cuites (tome, raclette, bleu...)
Longueur de lame	540 mm	150 mm	125 mm
Largeur de la lame à 15mm de son extrémité	17 mm	14 mm	11 mm

A chaque sonde, peser l'échantillon et prélever autant de sondes que nécessaire afin d'avoir un échantillon final pesant de 100 à 200 g.

### **Utilisation d'un couteau**

Le couteau doit avoir une pointe acérée et une surface polie, et être placé de préférence dans un étui. La taille du couteau doit être adaptée au format du fromage (figure 12).



Figure 12 : Utilisation d'un couteau pour un prélèvement de fromage

### **Utilisation d'un fil à couper le beurre**

De dimension et résistance suffisantes. Adapté aux fromages de gros formats type pâte pressée cuite. Attention au nettoyage/désinfection de cet instrument.

### **Utilisation d'un tranchoir à Cheddar**

Si le fromage est de gros format, possibilité d'utiliser un tranchoir à cheddar nettoyé et désinfecté.

## 2. Les prélèvements dans l'environnement de l'atelier de transformation

### - Le matériel de fromagerie :

Les méthodes décrites ci-dessous requièrent des consommables (et parfois du matériel) assez spécifiques dont ne disposent pas forcément les techniciens. Il faut donc prévoir de se rapprocher de son laboratoire ou d'en trouver un habitué à travailler avec des échantillons issus de prélèvements de surface car ils auront probablement à disposition du matériel (écouvillons, lingettes, matériel stérilisé...) et surtout les solutions nécessaires (eau peptonnée...).

### \* Les moules, bacs de caillage en plastique :

Les techniques les plus couramment utilisées vont être les méthodes d'écouvillonnage grâce notamment à des chiffonnettes ou des écouvillons stériles, imbibés ou non de neutralisants de produits de nettoyage. D'autres techniques existent mais nécessitent un appareillage spécifique, comme l'utilisation des ultrasons par exemple.

Une fiche technique décrivant ces 2 types de procédures a été réalisée dans le cadre du RMT « fromages de terroir » (voir annexe 4).

### \* Les récipients en bois (type gerle) et planches d'affinage :

Généralement, les prélèvements sur des surfaces en bois se font à l'aide d'un pochoir qui va servir à délimiter la zone à prélever. Des écouvillonnages sont ensuite réalisés dans cette zone en procédant à un brossage (à l'aide d'une brosse à dent par exemple) puis à un frottage à l'aide d'une gaze imprégnée de solution (eau peptonnée...) (figure 13). Voir fiche gerle du RMT (voir annexe 5).



Figure 13 : Écouvillonnage sur la surface du fond d'une gerle (source : INRA)

### - Les surfaces de travail :

Beaucoup de techniques existent afin d'évaluer l'état de propreté de certaines surfaces (tables d'égouttage, murs...).

Parmi celles accessibles et assez simples à mettre en œuvre on peut citer :

- **les boîtes contact** : une mini boîte de pétri est disposée dans un applicateur, puis l'opérateur vient poser la gélose contenue dans la boîte contre la surface à échantillonner. La plupart des fournisseurs proposent des boîtes contact pour les flores totales, levures/moisissures, entérobactéries, coliformes et streptocoques fécaux, voire *Listeria spp...*
- **les lames gélosées** : le principe est le même que les boîtes contact. Une lame contenant un milieu de culture gélosé est déposée sur la surface à échantillonner. Leur avantage provient du fait qu'elles sont double-faces ce qui permet la culture conjointe de 2 types de microorganismes. Toutefois, elles n'existent que pour la flore totale, les coliformes, les levures/moisissures et les entérobactéries.
- **les écouvillons recouverts d'une surface gélosée** : il existe des écouvillons recouverts de milieu gélosé pour la détection des *Listeria spp* (réponse en 48 heures) et *Samonella* (réponse en 24 heures) à la surface des environnements des ateliers agro-alimentaires



- **les pétrifilms** : ils sont composés d'un disque contenant un milieu gélosé déshydraté qui va se réhydrater au contact de l'échantillon. L'utilisation de ces derniers nécessite donc que l'échantillon soit de nature liquide ce qui sous-entend un passage préalable de l'écouvillon ou des chiffonnettes dans une solution de récupération des microorganismes. C'est cette

solution (ou ses dilutions) qui sera ensuite disposée sur le milieu gélosé. Les pétrifilms existent pour les *Listeria spp.*, *E.coli* et les staphylocoques à coagulase positive. Les pétrifilms peuvent aussi être réhydratés avec de l'eau stérile et utilisés comme des boîtes contact, mais la gélose est plus fragile et reste parfois sur le support à prélever.

**Attention ces méthodes ne sont pas aussi fiables que les méthodes par chiffonnettes par exemple : les surfaces de prélèvement sont souvent limitées et l'échantillonnage aléatoire. Elles sont peu répétables mais restent intéressantes pour une appréciation globale de l'efficacité du nettoyage en atelier de transformation.**

Ce dossier a été piloté par l'Institut de l'Élevage et réalisé avec le soutien financier de FranceAgriMer et de la région Rhône-Alpes

**Ce guide a été rédigé par** : Sabrina Raynaud (Institut de l'Élevage), Julie Barral (Actilait Centre de Carmejane), Sylvie Morge (PEP caprins Rhône-Alpes), à partir de la capitalisation de l'expérience de techniciens de terrain : Jean-Marie Ducret (Centre Technique des Fromages Comtois), Marie-Annick Dye (Chambre d'Agriculture de l'Isère), Jean-François Guittard (Syndicat du Saint Nectaire), Emilie Gillet (Association des Vendeurs Directs de Produits Laitiers de Haute-Normandie), Maxime Marois (Groupement de Défense Sanitaire des Alpes de Haute-Provence), Bruno Mathieu (Syndicat Interprofessionnel du Reblochon), Jacky Mège (Association des Éleveurs Transhumants des Trois Vallées), Pascal Picant (Groupement de Défense Sanitaire du Calvados), Jean-Charles Ray (Etablissement Régional de l'Élevage d'Ile-de-France), Violaine Salaün (Interprofession lait de brebis des Pyrénées Atlantiques), Laurent Thomas (Groupement de Défense Sanitaire du Rhône)

**Relecture** : Guillemette Allut (Languedoc Roussillon Elevage / Centre Fromager de Bourgogne), Aline Bazin (Centre Technique des Fromages Comtois), Emilien Fatet (Actilait Centre de Carmejane), Yves Lefrileux (Institut de l'Élevage), Laëtitia Rossignol (Centre Fromager de Bourgogne), Marie Vandewalle (Association Régionale des Vendeurs Directs Nord Pas de Calais)

**Référents techniques** : Renée de Crémoux et Philippe Roussel (Institut de l'Élevage), Jean-François Combes (ENILV Aurillac), Valérie Michel (Actilait), Jean-Luc Simon (Groupements de Défense Sanitaire de Rhône-Alpes)

**Responsables professionnels** : Marc Lesty et Frédéric Blanchard (FNEC)

**Mise en page** : Stéphanie Couspeyre – **Réf.** : 00 11 38 014

**Crédit photos** : Institut de l'Élevage, Violaine Salaün, Bruno Mathieu, Actilait, Jean-Luc Simon, Laurent Thomas, PEP Caprins Rhône-Alpes, Jacky Mège, Marie Vandewalle, Charlotte Geyl



AVEC LE SOUTIEN  
FINANCIER DE :





## Protocole d'analyse d'eau



### 1 - Préparation

- Utiliser un flacon stérile disponible auprès du laboratoire chargé des analyses
- Pour des recherches particulières, se renseigner auprès de ce dernier
- Utiliser un matériel adapté
  - flacon stérile
  - lampe à souder
  - glacière

### 2- Préparation (suite)

- Prélever le plus près possible du point d'utilisation après avoir laissé couler l'eau à débit moyen pendant 5 minutes
- Se laver les mains et nettoyer le robinet



### 3- Prélèvement

- Ouvrir le flacon seulement au moment du remplissage
- Tenir le bouchon à la main, ouverture vers le bas sans le poser
- Remplir le flacon en gardant le chalumeau allumé à proximité du robinet
- Passer le "goulot" du flacon sur la flamme avant fermeture



### 4-Fin du prélèvement

- Il est important de maintenir la température des échantillons en dessous de 10°C
- Il est recommandé de commencer toute analyse bactériologique d'eau moins de huit heures après le prélèvement, 24 heures maximum

## PRELEVEMENT DES FLORES MOBILISABLES DANS LA MACHINE A TRAIRE

### OBJECTIFS DE LA METHODE :

Récupération des flores microbiennes développées entre 2 traites dans le système de traite (lactoduc + chambre de réception + griffes à lait)

### 1) PROTOCOLE TECHNIQUE LAIT UHT (PROGRAMME BIOFILMS ET CASDAR ACIDIFICATION) :

Le principe est le suivant : avant la traite, du lait UHT écrémé est passé dans le circuit habituel du lait et échantillonné. Le fait d'utiliser du lait écrémé permet de limiter les dépôts éventuels dans la machine à traire, puisque seul un rinçage est réalisé entre cette manipulation et la traite. Faire aspirer 8 à 10 litres (la pompe doit se déclencher automatiquement) de lait UHT demi-écrémé (en unités de 11 avec bouchon à vis), à raison de 1 litre par manchon, en ayant la possibilité de s'organiser de 2 manières différentes (mais utiliser bien sûr toujours la même méthode) : soit on se place dans les manchons situés au bout du circuit de la machine à traire (2 manchons dans le cas où le lactoduc est linéaire, 4 manchons dans le cas où le lactoduc forme un Y) ; soit on fait le choix de répartir le lait entre les manchons de chaque côté : par exemple si on est en 2 fois 5 postes, on peut choisir 2 postes d'un côté + 2 postes de l'autre.: poste 1 manchon gauche, manchon droit puis poste 2.... Cette aspiration se fait après désinfection de la partie extérieure des manchons avec de l'alcool à 70°C. Le lait est récupéré au niveau de la canule de réception (la quantité récupérable de lait ayant circulé dans la machine est d'environ 2 litres, le reste étant évacué par gravité) dans un seau stérile (frotté à l'alcool à 70°C). Il est alors homogénéisé avec une louche désinfectée puis stocké dans des flacons stériles, tout en travaillant avec des gants stériles (ou lavage et désinfection des mains).

### 2) PRINCIPES DE LA METHODE NORMEE EAU STERILE :

C'est la méthode de référence utilisée pour juger de l'efficacité de procédures de nettoyage/désinfection au niveau des installations de traite. La procédure utilisée se fait selon la norme AFNOR U36-015. Juste avant la traite, le rinçage de l'installation de traite se réalise avec les pulsateurs en fonctionnement, en circuit fermé, l'eau passant aussi par le circuit de lavage. On fait circuler pendant 5 mn 30 litres d'eau préparée spécialement à cet effet. L'eau est tout d'abord stérilisée à l'aide d'une solution d'eau de javel à 36° chlorométrique (7 ml pour 30 litres d'eau) puis neutralisée à l'aide de 100 ml d'une solution tampon à pH 7,2 contenant 0,85g de phosphate monopotassique et 5 g de thiosulfate de sodium (cela permet d'inactiver le chlore résiduel). Après une première circulation de cette préparation pendant 5 mn, l'installation est complètement vidangée et l'opération est renouvelée une deuxième fois. Les prélèvements sont effectués directement dans le bac de lavage de manière aseptique dans un flacon stérile contenant 2 ml d'une solution stérile à 25 g/l de peptone.

### 3) PROTOCOLE TECHNIQUE BASE SUR L'EAU EMPLOYEE SUR L'EXPLOITATION (PROGRAMME GIS ALPES DU NORD) :

C'est une adaptation de la méthode de référence. Remplir avant la traite le bac de lavage du système de traite d'eau froide. Homogénéiser l'eau du bac plein et en prélever 1L dans un flacon stérile avant son aspiration par le système de lavage. Faire circuler dans le système de traite maintenu en position fermé pendant 5 minutes. Récupérer 1 L d'eau à l'évacuation dans un flacon stérile en ayant pris soin de vérifier la propreté du conduit d'éjection et de le nettoyer si besoin. Ne pas prélever les premiers litres évacués.

#### 4) COMMENTAIRES DES AUTEURS :

##### CIRCULATION LAIT UHT :

Avantages	Inconvénients
Simplicité de la préparation et de la manipulation	Adapter la quantité de lait suivant les installations (être expérimenté pour en juger)
Méthode utilisée en appui technique (même si la technique peut paraître coûteuse). Utilise le circuit de traite.	Méthode publiée mais non évaluée et vraiment comparée à la méthode de référence. Elle n'utilise pas le même circuit.
Les laits peuvent être mis à incuber et on peut connaître l'aptitude acidifiante des flores en plus de leur dénombrement.	Pour l'instant, on ne dispose pas de valeurs repères permettant d'interpréter les résultats en valeur absolue. Des études en cours devront nous permettre de mieux les définir.

##### CIRCULATION EAU STERILE :

Avantages	Inconvénients
Méthode reconnue, de référence Protocole standardisé	Assez lourd à mettre en place mais faisable (avoir sous la main un labo interprofessionnel). Adapter aussi la quantité d'eau selon la machine (donc être expérimenté pour en juger). Attention à ce que l'eau de départ ne soit pas trop contaminée même si processus de décontamination.
D'après la norme, « le pouvoir contaminant maximal d'une installation de traite est établi à partir de dénombrements microbiens réalisés sur un échantillon d'eau du second rinçage ». Il existe des seuils « acceptables » de bactéries d'altération (déterminé à dire d'experts) : interprétation possible des résultats en valeur absolue. A noter un problème pour Pseudomonas, la norme se basant sur méthode de dénombrement assez ancienne. Il a alors été décidé d'augmenter le seuil.	Pour évaluer le pouvoir acidifiant des flores, il faut rajouter du lait en poudre, ce qui augmente les risques de re-contamination

##### PROTOCOLE TECHNIQUE BASE SUR L'EAU EMPLOYEE SUR L'EXPLOITATION :

Avantages	Inconvénients
Protocole faisable Méthode basée sur la méthode de référence	Attention à ce que l'eau de départ ne soit pas trop contaminée même si on fait ensuite le différentiel (NB : l'info « eau initiale contaminée » notamment en « Pseudomonas » est intéressante sur les élevages étudiés)
La flore mobilisable au niveau du système de traite en bovin s'estime en réalisant le différentiel entre charge microbienne de l'eau du bac (qui représente la charge de l'eau et la propreté du bac de lavage) et charge microbienne de l'eau évacuée après rinçage.	Pour évaluer le pouvoir acidifiant des flores, il faut rajouter du lait en poudre, ce qui augmente les risques de re-contamination

##### Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre cette méthode :

Programme ACTA/ACTIA « Biofilms » et CASDAR « Acidification » (pilotes par l'Institut de l'Élevage) réalisé en élevages caprins  
Programme GIS Alpes du Nord « Pratiques des producteurs et Flore microbienne des laits » réalisé en élevages bovins

<b>Auteurs :</b>  <b>MICHEL Valérie</b> – GIS Alpes Jura <b>LAITHIER Cécile</b> – Institut de l'élevage	<b>Crée le :</b> Décembre 2009	<b>Modifiée le :</b>
--	-----------------------------------	----------------------

Pour en savoir plus :

Cécile Laithier : (Institut de l'Élevage) : [cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr](mailto:cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr)

Valérie Michel (Gis Alpes Jura) : [vmichel@suacigis.com](mailto:vmichel@suacigis.com)

## RMT filières fromagères valorisant leur terroir



Contacts :

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

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, technique, de la recherche et de la formation.

Ces actions concernent les caractéristiques des fromages, la durabilité des filières, la diversité sensorielle et le marché.

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

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

## 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 complétementée 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)

## PRELEVEMENTS MICROBIOLOGIQUES SUR LA SURFACE DU MATERIEL, EN PARTICULIER DE FROMAGERIE (DES MOULES) : PRESENTATION ET COMPARAISON DE 2 METHODES

### 1) OBJECTIF DES 2 METHODES PROPOSEES :

Pouvoir décrocher les microorganismes présents sur la surface des moules de fromagerie pour ensuite les dénombrer. Cette fiche présente et compare les deux méthodes sur la base d'études réalisées.

### 2) LE PRINCIPE DU BAC A ULTRASONS

En rayonnant dans le liquide contenu dans la cuve, les ultrasons (ondes sonores) émis par le transducteur engendrent une alternance de hautes et basses pressions. Pendant la phase de basse pression, des millions de bulles microscopiques se forment et grossissent. Ce processus est appelé cavitation. Pendant la phase de haute pression, les bulles s'effondrent, ou « implosent », en libérant une quantité d'énergie considérable. Ces implosions se comportent comme une armée de minuscules brosses. Elles agissent dans toutes les directions, attaquant toute la surface, et pénétrant dans tous les recoins et orifices.

### 3) COMMENT REALISER LES PRELEVEMENTS ?

#### UTILISATION DES CHIFFONNETTES

Pour tous les supports, on réalise des frottis successifs sur les surfaces.

Les chiffonnettes utilisées sont de dimensions 32 x 17,5 cm, et imbibées de 13 mL d'eau peptonée tamponnée à 10 % de neutralisant (qui neutralise les traces de désinfectants). Ces chiffonnettes sont fournies dans un emballage unitaire stérile.

#### - POUR LES MOULES :

Lors du prélèvement chez les producteurs, le préleveur met des gants stériles, à usage unique, puis sort la chiffonnette de son emballage et la déplie. On commence par faire cinq tours sur le fond du moule. La chiffonnette est ensuite repliée pour obtenir un côté non contaminé, et cinq tours sont faits sur la paroi du moule. La chiffonnette est ensuite remise dans son sachet et transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire.

Dans chaque sachet 150 mL de Tryptone Sel (TS) sont ajoutés. Le Tryptone Sel est un bouillon diluant utilisé pour la préparation de divers produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est composé de chlorure de sodium, qui permet d'obtenir une solution isotonique, et de tryptone qui assure la revivification des microorganismes.

Après passage du sachet pendant trois minutes au Stomacher le liquide obtenu est utilisé pour ensemercer les différents milieux de culture.

#### - POUR D'AUTRES SUPPORTS (TANK A LAIT, BAC DE CAILLAGE, ...ETC) :

-Parois facilement accessibles (parois du tank, bac de caillage) : prévoir un gabarit. 10 cm\*10 cm pour délimiter la surface à prélever (20 frottis, 10 horizontaux et 10 verticaux).

-Manchons : Lingette enroulée autour d'une tige préalablement désinfectée et introduite à l'intérieur du manchon. Dix rotations successives au niveau de la paroi et de la collerette permettent de récupérer les biofilms.

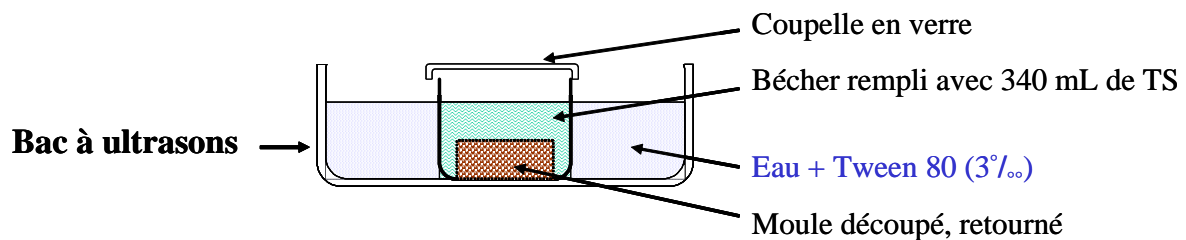
### UTILISATION DES ULTRASONS

Le moule à analyser est récupéré en fromagerie et placé dans un sachet stérile. A l'arrivée au laboratoire, le moule est découpé (la hauteur à découper sera déterminée en fonction de celle du moule et des dimensions du bac à ultrason, de telle sorte que le moule soit totalement immergé dans la solution de TS) grâce à des ciseaux préalablement désinfectés à l'alcool. En effet, lorsque le haut du moule est découpé, le fond est plus proche des transducteurs générateurs d'ultrasons, ce qui facilite le décrochage des flores. Le moule ainsi découpé est placé dans un bécher d'un litre en verre (matériau qui laisse passer les ultrasons), préalablement stérilisé à l'autoclave, couvert de papier aluminium, et contenant 340 ml de TS.

A l'intérieur du bécher, le moule est posé à l'envers afin de permettre le décrochage des flores sur le fond du moule du côté intérieur, qui est a priori la partie la plus contaminée. Afin d'assurer une bonne immersion du moule, il est lesté à l'aide d'une coupelle en verre stérile.

Le bac à ultrasons (Branson 8510, Fischer Scientific) est rempli d'une solution aqueuse contenant 3‰ de tween 80 (tensio-actif). Le bécher est ensuite installé dans le bac à ultrasons qui fonctionne durant quinze minutes à 44 kHz.

Le liquide contenu dans le bécher peut ensuite être analysé. Le résultat final de dénombrement doit être ramené à un nombre de germes/cm<sup>2</sup> de surface. Pour le calcul de ce dernier il faut donc tenir compte du facteur de dilution (volume de TS dans lequel le moule a été immergé) ainsi que de la surface interne du moule.



#### Comparaison des deux méthodes

Dans le cadre du programme « Travail », ces deux méthodes ont été mises en œuvre sur des moules (type « St Marcellin », ¾ de litres, servant à la fabrication de fromages à pâte lactique) dans le but de les comparer. Les résultats microbiologiques obtenus ont été assez similaires pour les deux méthodes en terme de niveaux et de proportions des différentes flores recherchées, sachant qu'un seul préleveur a réalisé les prélèvements par chiffonnettes.

Il n'y a donc pas de méthode « sélective » ou privilégiant certaines flores par rapport à d'autres.

D'un point de vue pratique, nous pouvons conseiller la méthode des chiffonnettes pour sa facilité de mise en œuvre (prélèvement directement réalisables chez les producteurs, temps de mise en œuvre pour l'analyse très court). Cette méthode nécessite toutefois que la surface à échantillonnée ait été bien définie, et idéalement il faudrait que les prélèvements soient réalisés par la même personne. En effet, les études réalisées sur les biofilms et en particulier le programme ACTA « Biofilms » montrent que l'effort préleveur peut être très important malgré le respect strict de la procédure de prélèvement (force différente du préleveur notamment) et que cet effet n'est pas forcément stable dans le temps (pouvant être lié à une non reproductibilité de la façon de faire et/ou incidence différente selon l'âge des biofilms prélevés : on peut imaginer que la force appliquée aura plus d'impact sur des biofilms jeunes que sur des biofilms « vieux » où on aura plus de mal à détacher les biofilms).

Le passage aux ultrasons nécessite d'être équipé ou de pouvoir s'équiper d'un bac. De plus, cette technique peut être destructive puisqu'elle implique, selon leur format, de couper les moules.

Il existe toutefois des méthodes aux ultra-sons qui ne sont pas destructives comme celle(s) utilisée(s) pour les supports en bois (cf. fiches « Procédure de prélèvement sur les surfaces en bois »).

⇒ 2 méthodes donnant des résultats comparables en terme de quantité et de composition des biofilms analysés, à privilégier selon les conditions pratiques de l'étude envisagée :

	Avantages	Inconvénients	Quand l'utiliser ?
Chiffonnettes	Utilisable quelque soit la taille et forme du matériel à nettoyer	• Effet « préleveur » important	• Quand le matériel ne permet pas l'utilisation des ultra sons • Quand un seul préleveur est concerné
Ultra sons	• Pas d'effet « préleveur »	• Destructif pour moules de grande taille • Pas applicable à tous les matériels • Nécessite d'avoir un bac à ultra sons	• Quand matériel de petite taille ou si la destruction est sans conséquence.

### Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre ces méthodes :

Programme « Biofilms » - 2002/2004- Piloté par l'Institut de l'Elevage : utilisation de la méthode par chiffonnettes sur différents supports (manchons machine à traire, moules, bacs de caillage...)  
Programme « Travail » - piloté par Actilait Centre de Carmejane : comparaison des méthodes par chiffonnettes et par passage des moules aux ultrasons (Claveyrolat E. – 2005 – « le nettoyage du matériel en fromagerie fermière » - Rapport de stage de 4ème année ISARA)

<b>Auteurs</b> BARRAL Julie, Actilait LAITHIER Cécile, Institut de l'Elevage  <b>Ont participé à cette fiche :</b> - Tiphaine Convert, GIS Alpes-Jura - Sabrina Raynaud, Institut de l'Elevage - Agnès Delacroix-Buchet, INRA Jouy en Josas	<b>Date de mise à jour :</b> Décembre 2009	
--	---	--

Pour en savoir plus :

Julie Barral (Actilait) : [j.barral@actilait.com](mailto:j.barral@actilait.com)

Cécile Laithier : (Institut de l'Elevage) : [cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr](mailto:cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr)

## RMT filières fromagères valorisant leur terroir



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

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, technique, de la recherche et de la formation.

Ces actions concernent les caractéristiques des fromages, la durabilité des filières, la diversité sensorielle et le marché. Des ouvrages et fiches de synthèse, des outils ou encore des journées de formation/information seront proposées aux filières valorisant leurs terroirs.

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

## PROCEDURE DE PRELEVEMENT MICROBIOLOGIQUE DES PAROIS DE GERLES EN BOIS EN AOP SALERS.

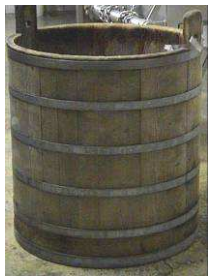
### OBJECTIFS DE LA METHODE :

Evaluer l'efficacité des méthodes d'entretien et de nettoyage des gerles en bois utilisées en AOP Salers en réalisant des prélèvements sur la surface des gerles en bois permettant de récupérer un maximum de flores. Cette méthode est non destructive et peut être utilisée en routine par les techniciens.

### 1) MATERIEL NECESSAIRE :

- Pot (ou flacon) stérile, contenant 100 ml de solution de récupération composée : de peptone (1g/l), de sel (8,5g/l) et de tween 80 (5ml/l).
- Flacon + gaze stérile
- Brosse à dent (marque Signal®, dureté médium) stérile, contenue dans un sachet stérile.
- Gants, alcool, pince, pochoir en plastique\*, double décimètre en plastique, scotch.

\*Pochoir : cadre en plastique semi-rigide de 1 cm de largeur dont la surface évidée centrale correspond aux dimensions des surfaces à prélever.



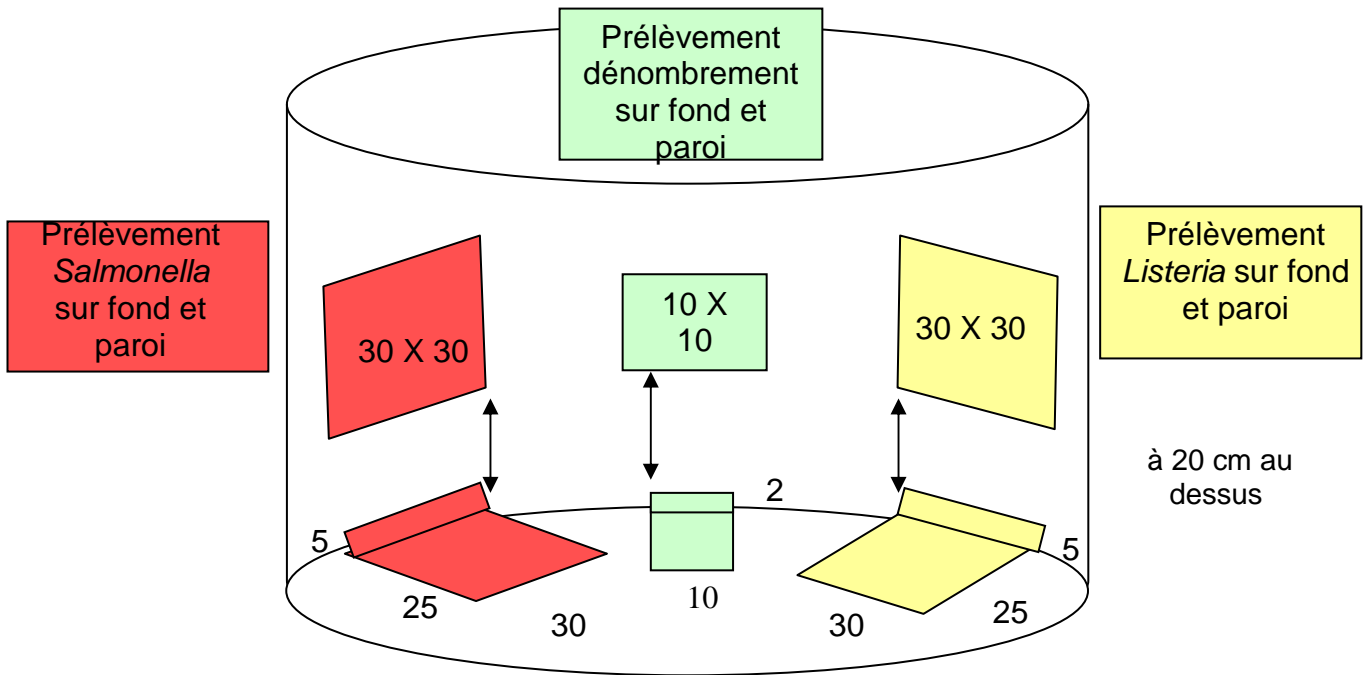
### 2) MISE EN ŒUVRE :

Cette méthode consiste dans un premier temps à un brossage de la zone de prélèvement, puis à un écouvillonnage sur la zone ainsi brossée, afin de récupérer un maximum de germes. Les prélèvements se réalisent sur la paroi et le fond de la gerle. Il est conseillé d'éviter d'inclure dans la zone prélevée un nœud du bois car sa densité et sa composition spécifique constitue une zone non représentative de la surface de la gerle.

1. Mettre des gants stériles
2. Désinfecter le pochoir à l'alcool, puis délimiter les différentes zones de prélèvement par l'apposition du pochoir sur le bois et en le maintenant si nécessaire par du scotch.  
(Remarque : le double décimètre permet de placer le pochoir plus aisément à partir de repères d'un prélèvement à l'autre pour une même gerle.) **cf. photos ci-dessous.**
3. Au niveau du fond inclure un angle dans le prélèvement. Pour cela, délimiter 5 cm au niveau de la paroi et 25 cm sur le fond pour les recherches de *Listeria* et *Salmonella* (prélèvement sur une surface de 900 cm<sup>2</sup>) et 2 cm sur la paroi et 8 cm sur le fond pour les dénombrements de flores (prélèvement sur une surface de 100 cm<sup>2</sup>). **cf. figure page suivante.**



La surface à prélever est délimitée par l'apposition du pochoir



4. Ouvrir le flacon de prélèvement contenant la solution.
5. Sortir la gaze et la poser dans le couvercle du flacon (avec la brosse à dent ou la pince stérilisée par flambage).
6. Tremper la brosse à dent dans la solution. Si la gerle est déjà humide, il n'est pas nécessaire de l'humidifier davantage. Si par contre elle est sèche, il faut humidifier la brosse et le bois plusieurs fois si nécessaire en la trempant dans la solution de récupération.
7. Gratter, à l'aide de la brosse à dent, trois aller-retour dans le sens des fibres du bois puis et trois aller-retour dans le sens opposé des fibres (à la perpendiculaire des fibres), sur l'ensemble de la zone à contrôler.
8. Rincer la brosse à dent dans la solution du flacon pendant quelques secondes en agitant la brosse. Les micro-organismes n'adhèrent pas aux brosses à dents plastiques dans les conditions de rinçage testées.
9. Sortir la gaze avec la brosse à dent ou la pince stérilisée par flambage.
10. Frotter à l'aide de la gaze la surface précédemment grattée avec la brosse. Tenir la gaze avec une pince stérilisée à l'alcool et/ou avec la main munie d'un gant stérilisé à l'alcool.
11. Récupérer la gaze dans le flacon contenant la solution dans laquelle a été rincée la brosse à dents.
12. Etiqueter le flacon en apposant le numéro d'identification sur le bouchon.



### 3) PROTOCOLE DE NETTOYAGE ET DE DESINFECTION DES BROSSES A DENT :

Les brosses a dents peuvent être ré-utilisées, à condition de respecter un protocole de nettoyage-désinfection rigoureux :

- ✓ Rincer une première fois les brosses à dent sous l'eau.
- ✓ Les faire tremper dans une solution de nettoyage-désinfection (Bactérianos, Surfanios) pendant 2 à 4 heures minimum.
- ✓ Bien rincer les brosses à dent sous l'eau claire plusieurs fois.
- ✓ Faire sécher les brosses à dent dans une étuve (1 nuit).
- ✓ Les placer dans un container de stérilisation (par exemple, containers cylindriques en polypropylène de 3,5cm de diamètre et 21 cm de longueur, équipé d'un couvercle). Mettre 1 à 2 brosses par container et stériliser à l'autoclave à 105°C pendant 30 minutes.

Les brosses à dents ne doivent pas être stérilisées à plus de 105°C car cela peut modifier la souplesse des poils.

Normalement, les brosses peuvent être stérilisées au moins 5 fois sans que l'on constate d'altération de couleur ou de forme. Dans tous les cas elles seront à changer dès qu'elles présenteront un aspect différent de celui des brosses neuves (léger brunissement de la couleur des poils).

- ✓ Ou bien les déposer sur un plateau stérile, sous UV dans une hotte de sécurité microbiologique pendant au minimum une heure. Les placer par 2, dans un sachet stérile de prélèvement (sachet SPR) et fermer hermétiquement. Conserver les sachets en chambre froide à 2°C +/- 2°C jusqu'à utilisation.

Des tests de stérilité des brosses à dent ont été réalisés : tous les résultats en flore totale, coliformes à 30°C et *Pseudomonas* ont donné des résultats < 1 UFC/ml de suspension analysée.

#### 4) COMMENTAIRES DES AUTEURS :

Cette technique de prélèvement a été évaluée dans nos travaux par rapport à la méthode « Rankine Pilone » (méthode destructrice de référence au Centre Technique du Bois et de l'Ameublement, basé sur l'application d'ultra-sons et de cycles de vide). Le CTBA a conclu à l'équivalence des 2 méthodes en termes de quantités récupérées de flores. La comparaison entre les 2 méthodes a porté sur les microorganismes suivants : *Lb. plantarum*, *Ln. mesenteroides* et *K. lactis* pour les flores utiles ; *P. fluorescens* pour les Gram - ; *S. aureus* et *L. monocytogenes* pour les pathogènes.

Les prélèvements ont été analysés le jour même ou le lendemain pour les prélèvements effectués le soir.

#### Autres commentaires sur la méthode décrite dans cette fiche :

- Respecter le protocole de nettoyage et désinfection des brosses à dent.
- Conserver les flacons avant et après prélèvements au froid (0°C à 4°C). Après prélèvement les flacons peuvent se garder entre 24 et 72 heures au froid, si des analyses complémentaires sont nécessaires.
- Bien agiter les flacons et leur gaze juste avant de réaliser les analyses.

#### Programme(s) de recherche ayant mis en œuvre cette méthode :

Mise au point de méthodes d'entretien et de décontamination des gerles en bois pour la fabrication de fromages AOP Salers. Ces travaux ont été menés dans le cadre du Pôle Fromager AOC Massif Central.

<b>Auteurs :</b> <b>DEFARGUES Catherine</b> , LIAL MC, 38 rue de salers Aurillac, <b>DIDIENNE Robert</b> , INRA, 20 côte de Reyne, Aurillac. Méthode mise en œuvre sous la responsabilité du LIAL MC à Aurillac	<b>Créé le :</b> Sept 2010.	<b>Modifiée le :</b>
--	--------------------------------	----------------------

Pour en savoir plus :

Catherine DEFARGUES (LIAL-MC)  
 Robert DIDIENNE (INRA).

#### 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, technique, de la recherche et de la formation.

Ces actions concernent les caractéristiques des fromages, la durabilité des filières, la diversité sensorielle et le marché. Des ouvrages et fiches de synthèse, des outils ou encore des journées de formation/information seront proposées aux filières valorisant leurs terroirs.

Le RMT est co animé par le CNAOL et le Suaci Alpes Page 16

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

