

524364

BA-TH  
1207

**Université Montpellier II  
Sciences et Techniques du Languedoc  
Place Eugène Bataillon  
34095 MONTPELLIER Cedex 5**

**CIRAD-EMVT  
Campus International de Baillarguet  
TA 30 / B  
34398 MONTPELLIER Cedex 5**

---

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES  
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

**Année 2003-2004**

---

**RAPPORT DE STAGE**

**ETUDE DE LA PREVALENCE DE  
*Salmonella sp.* SUR LES CARCASSES DE POULET  
DE CHAIR VENDUES A ANTANANARIVO**

*Par*

*Jorgen GOMEZ*

*le 14 octobre 2004*

**Laboratoire d'accueil : Maison du Petit Elevage, Madagascar**

**Responsable de stage : Hélène VIDON**

**CIRAD-Dist  
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
Baillarguet**

**CIRAD**



**\*000063918\***

## Résumé

La présence de *Salmonella sp.* sur les carcasses de poulet de chair proposés à la vente à Antananarivo a été étudiée. La méthodologie utilisée a été l'échantillonnage stratifié. En 9 semaines, 467 échantillons ont été analysés par rapport aux protocoles bactériologiques décrits dans les normes ISO et AFNOR. L'étude épidémiologique a donné comme résultat une prévalence de *Salmonella sp.* de 20 % +/- 3,8 ( $\alpha=0,05$ ). La bactérie a été isolée dans tous les groupes étudiés. Sur 39 souches sérotypes, les sérotypes mises en évidence ont été : *Salmonella enteritidis* (73 %), *Salmonella give* (21 %), *Salmonella arizonae* (3 %) et *Salmonella glostrup* (3 %) des souches sérotypes. En même temps, une enquête de type qualitative a montré l'hétérogénéité des vendeurs et des modalités de commercialisation à Antananarivo.

## Mots-clés

BACTERIOLOGIE, ENTEROBACTERIE, AVICULTURE, HYGIENE ALIMENTAIRE,  
SANTÉ PUBLIQUE, MADAGASCAR, POULET DE CHAIR, SALMONELLA,  
DEMARCHE QUALITE, DEVELOPPEMENT, PAYS DU SUD

## Liste des abréviations

<b>AFD</b>	Agence Française de Développement
<b>AFNOR</b>	Agence Française de Normalisation
<b>BGA</b>	Brillant Green Agar
<b>CIRAD</b>	Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement
<b>CIRD</b>	Centre International de Développement et Recherche
<b>CIREL</b>	Circonscription Régionale de l'Elevage
<b>DPEL</b>	Direction Provinciale de l'Elevage
<b>DSAPS</b>	Direction de la Santé Animale et du Phytosanitaire
<b>GN</b>	Gélose Nutritive
<b>IPM</b>	Institut Pasteur de Madagascar
<b>MKTn</b>	Bouillon Muller Kauffmann Tétrathionate avec noboviocine
<b>MPE</b>	Maison du Petit Elevage
<b>OMC</b>	Organisation Mondiale du Commerce
<b>OIE</b>	Organisation Internationale des Epizooties
<b>ONG</b>	Organisation non gouvernementale
<b>PAECC</b>	Projet d'appui à l'Elevage des espèces à cycle court
<b>SC</b>	Bouillon Sélénite Cystine
<b>SNSE</b>	Système national de surveillance épidémiologique
<b>SS</b>	Agar Gelose Salmonella - Shigella
<b>ISO</b>	International Standard Organisation
<b>XLD</b>	Xylose Lysine Décarboxylase
<b>M.C.</b>	Milieu de culture
<b>LDC</b>	Lysine Décarboxylase
<b>ODC</b>	Bouillon Ornithine Décarboxylase
<b>ADH</b>	Bouillon Arginine Dihydroxylase
<b>VP</b>	Voges –Proskauer
<b>HcK</b>	Agar Gélose Hecktoen
<b>RVS</b>	Bouillon de Rappaport-Vasilliadis

## Liste des tableaux

		Pages
Tableau 1.	Recensement administratif des volailles dans les 6 provinces de Madagascar .....	13
Tableau 2.	Recensement des volailles modernes dans les 6 provinces de Madagascar.....	13
Tableau 3.	Place des différentes espèces d'élevage .....	14
Tableau 4	Typologie des aviculteurs .....	14
Tableau 5	Effectifs de volailles selon le type d'élevage.....	14
Tableau 6	Prix au consommateur des différentes viandes sur le marché à Antananarivo.....	14
Tableau 7	Synthèse des caractéristiques biochimiques du genre <i>Salmonella</i> .....	16
Tableau 8	Caractéristiques biochimiques des sous-espèces de <i>Salmonella</i> .....	18
Tableau 9	Synthèse de la législation sanitaire pour les produits à base de volaille à Madagascar.....	21
Tableau 10	Tableau récapitulatif des effectifs totaux d'échantillons par type de point de vente après 9 semaines d'enquête.....	27
Tableau 11	Plan chronologique d'échantillonnage pour la recherche de <i>Salmonella</i> .....	28
Tableau 12	Réactifs utilisés pour les analyses bactériologiques.....	31
Tableau 13	Bilan des ressources destinées à la réalisation de l' Etude sur la prévalence de <i>Salmonella</i> sur les carcasses de poulets de chair à Antananarivo.....	31
Tableau 14	Lecture des colonies sur milieu XLD gélose.....	33
Tableau 15	Lecture des caractéristiques biochimiques sur milieu Kliger – Hajna .....	35
Tableau 16	Interprétation des caractéristiques culturales du milieu Vosker Proskaver .....	36
Tableau 17	Résultat des recherches de <i>Salmonella</i> du 19/07/2004 à 19/08/04 avec la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F).....	41
Tableau 18	Résultat des isollements dans la recherche de <i>Salmonella</i> sur les deux milieux de culture pour l'isolement dans la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F) .....	41
Tableau 19	Résultat des tests de confirmation biochimique de la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F) .....	41

Tableau 20	Résultat des tests de confirmation biochimique pour la recherche des souches présumées de <i>Salmonella</i> .....	41
Tableau 21	Cahier d'enregistrement de préparation des milieux de culture.	43
Tableau 22	Résultat des analyses de recherche de <i>Salmonella</i> faites avec la technique définitive .....	43
Tableau 23	Résultat des analyses pour la recherche de <i>Salmonella</i> sur les carcasses de poulet de chair effectuées avec la technique définitive.....	43
Tableau 24	Résultat du sérotypage des <i>Salmonellas</i> faits à l'Institut Pasteur de Madagascar .....	46
Tableau 25	Sérotypes trouvés sur les souches de <i>Salmonella</i> .....	46

## Liste des figures

		<b>Pages</b>
Figure 1	Schéma de commercialisation du poulet de chair à Madagascar.....	15
Figure 2	Répartition des membres cotisants de la MPE par filières au 2003.....	22
Figure 3.	Schéma hiérarchique et organisationnel de la MPE.....	22
Figure 4.	Incidence absolue de <i>Salmonella</i> pendant l'étude.....	44
Figure 5.	Taux d'incidence de <i>Salmonella</i> pendant l'étude.....	44
Figure 6.	Taux d'incidence de <i>Salmonella</i> par type de point de vente ...	44
Figure 7.	Prévalence de <i>Salmonella</i> par type de point de vente.....	45
Figure 8.	Procédure de pondération des résultats des analyses.....	45
Figure 9.	Calcul de l'intervalle de confiance du résultat.....	45
Figure 10.	Sérotypes de <i>Salmonella</i> isolées.....	46

## Remerciements

Je veux remercier d'abord Dieu qui m'a donné le courage depuis que je suis parti du Venezuela et pour continuer pendant les moments difficiles.

Je veux remercier M. François BERTIN pour son appui logistique et son encadrement scientifique pour avoir rendu possible la mise en route de cette étude.

Je veux remercier l'équipe responsable du DESS-PARC pour sa collaboration à la réalisation de cette étude.

A tous les employés de la Maison du Petit Elevage, Hélène, Fleurette, Hugues, Doris, Benja, Rolland, Richard, Christian, Charlotte, ....

A M. Jean-Louis SOARES et M. Manutea GAY de l'Institut Pasteur de Madagascar.

A M. Renaud LANCELOT de la Direction de Santé Vétérinaire.

A toute l'équipe du CIRAD à Madagascar sur la direction de M. Michel PARTIOT pour sa collaboration.

A M. Jean-Christophe AUGUSTIN du département H.I.D.A.O.A. de l'Ecole Vétérinaire Maisons Alfort pour sa collaboration à la finalisation de ce document.

Au Service de Coopération Française à Madagascar pour m'avoir permis de mettre en place cette étude

A tous les personnes françaises et malgaches qui ont participé à la réalisation de cette recherche.

## Sommaire

Résumé.....	1
Mots-clés .....	1
Liste des abréviations .....	2
Liste des tableaux.....	3
Liste des figures .....	5
Remerciements.....	6
Sommaire .....	7
Préambule .....	9
Introduction.....	10
<b>Chapitre I . Généralités et objectifs de l'enquête.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 - Justifications de l'enquête et des paramètres .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 - Justification générale .....	11
1.1.2 - Justifications particulières pour Madagascar.....	11
1.1.3 - Justification des techniques et méthodologies utilisés dans l'étude .....	12
<b>1.2 - Objectifs de l'enquête .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 – Le contexte.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 - Présentation de la filière avicole à Madagascar .....	13
1.3.1.1 - Importance de l'élevage avicole .....	13
1.3.1.2 - Typologie des élevages .....	14
1.3.1.3 - Les productions intensives de poulets de chair et d'œufs de consommation.....	14
1.3.1.4 - Importance de la commercialisation des produits issus des volailles dans l'alimentation humaine.....	14
1.3.1.5 - Différents types de commercialisation (voir figure 1).....	14
1.3.2 - Les contraintes liées à <i>Salmonella</i> et à son diagnostic .....	14
1.3.2.1 - Classification et principaux caractères microbiologiques des <i>Salmonella</i> .....	14
1.3.2.2 - La maladie humaine et le diagnostic .....	19
1.3.2.3 - La maladie animale.....	19
1.3.2.4 - Epidémiologie et transmission.....	19
1.3.2.5 - Prévention et contrôle .....	20
1.3.3 - Les mesures mises en place à Madagascar .....	21
1.3.4 - Les organismes intervenants dans l'étude .....	21
1.3.4.1 - Maison du Petit Elevage .....	21
1.3.4.2 - Institut Pasteur de Madagascar.....	22
1.3.4.3 - Direction de la Santé Animale et du Phytosanitaire.....	23
<b>Chapitre II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 - L'enquête.....</b>	<b>24</b>
2.1.1 - Définition de la méthode d'échantillonnage.....	24
2.1.2 - Principes.....	24
2.1.3 - Méthodologie d'enquête.....	26
2.1.4 - Zones visitées.....	27
2.1.5 - Budget matériel.....	31
<b>2.2 – Les prélèvements .....</b>	<b>32</b>
2.2.1 – Protocole technique des prélèvements .....	32
2.2.1.1 - Le pré-enrichissement : <i>Eau peptonée tamponnée</i> .....	32
2.2.1.2.a - L'enrichissement : <i>milieu de Muller - Kauffmann tétrathionate (bouillon de base au tétrathionate avec novobiocine)</i> .....	32
2.2.1.2.b - L'enrichissement : <i>milieu RVS (bouillon Rappaport – Vassiliadis)</i> .....	32
2.2.1.3.a - L'isolement : <i>milieu XLD gélose</i> .....	33
2.2.1.3.b – L'isolement : <i>Salmonella - Shigella (Gélose)</i> .....	33
2.2.1.4 – Le repiquage des souches : <i>Gélose nutritive</i> .....	34
2.2.1.5 - La confirmation biochimique :.....	34
2.2.2 - L'échantillonnage des prélèvements.....	37
2.2.3 - Conditionnement, conservation et acheminement.....	37



<b>2.3 – Les analyses bactériologiques</b> .....	<b>37</b>
2.3.1 - Préparations / dilutions .....	37
2.3.1.1 – L'isolement.....	37
2.3.1.2 - Identification et confirmation biochimique.....	38
2.3.1.3. - Choix et isolement des colonies pour la confirmation.....	38
2.3.1.4 - Confirmation biochimique sur galerie classique.....	38
2.3.2 - Confirmation sérologique et serotypage.....	39
2.3.2.1 - Principe.....	39
2.3.2.2 - Elimination de souches auto – agglutinantes .....	40
2.3.2.3 - Mise en évidence des antigènes « O » .....	40
2.3.2.4 - Mise en évidence des antigènes « Vi » .....	40
2.3.2.5 - Mise en évidence des antigènes « H ».....	40
2.3.3 - Traçabilité dans le laboratoire d'isolement et confirmation biochimique .....	40
2.3.4 - Le stockage et traitement des données .....	40
 <b>Chapitre III. Résultats et discussion</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 – Résultats</b> .....	<b>41</b>
3.1.1 - Résultats provisoires de recherche de <i>Salmonella</i> avec la technique <i>ISO/FDIS</i> 6579 :2001(F) .....	41
3.1.2- Espèces et sérotypes trouvées .....	41
3.1.3 - Limitations du protocole initial .....	41
3.1.4- Adaptation du protocole aux conditions d'expérimentation.....	42
3.1.5- Démarche qualité incorporée au laboratoire .....	42
3.1.6 - Résultats définitifs.....	43
<b>3.2 - Discussion</b> .....	<b>47</b>
<b>3.3 - Recommandations</b> .....	<b>47</b>
3.3.1 - Mesures proposes pour maîtriser le risque .....	47
3.3.2 - Limites des mesures proposées .....	48
3.3.3 - Conséquences de l'étude .....	48
 <b>Conclusion</b> .....	<b>49</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>50</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>55</b>

## Préambule

Pendant quatre mois de fin avril à fin août 2004, je suis allé à Madagascar avec la mission de faire mon stage de DESS sur un projet de développement. Une étude orientée vers la démarche qualité et l'hygiène alimentaire a été mise en place avec la collaboration des institutions françaises et malgaches intervenant sur place. Le présent travail est une preuve de la possibilité qu'ont les pays du Nord de contribuer significativement au développement des pays du Sud ainsi et du fait que les principaux acteurs du développement sont toujours les personnes locales, qui possèdent souvent les compétences et la volonté, mais sont handicapées par la manque de moyens et de motivation, ce qui les fait ralentir plusieurs fois.

En dépit de nombreuses contraintes qui sont apparues au fil de la réalisation de l'étude, les personnes impliquées dans sa réalisation ont fait montre d'une volonté constante de trouver des solutions pour fournir un travail de qualité. De même l'équipe de laboratoire a donné la preuve de sa compétence.

C'est également la preuve que le travail en équipe peut faire de grandes choses, notamment dans le développement des pays du Sud, principal objectif au CIRAD et pour les personnes qui ont collaboré à cette étude.

## Introduction

La production avicole a connu une importante croissance dans les pays du Sud ces dernières années. En Afrique et dans le contexte de Madagascar, cette croissance s'est orientée principalement sur les schémas de production périurbaine - semi-intensive, en vue d'apporter une source de protéines rapidement disponible pour nourrir les villes, qui ont une croissance démographique importante à gérer.

Dans le contexte toutefois complexe de la libéralisation, marqué par les difficultés politico-économiques, l'augmentation des inégalités sociales et le manque d'efficacité des services publics, les principaux acteurs de la filière avicole malgache ont souhaité disposer d'informations sur la qualité de leurs produits, conscients du fait que dans le monde actuel il est exigé de produire en quantité et qualité tout en visant à être compétitif et à s'adapter au contexte d'explosion démographique et de mondialisation. Cette situation demande la mise en place d'une démarche qualité en identifiant les risques et la mise en place de mesures pour maîtriser ces risques. Par rapport aux risques sanitaires cette maîtrise, associée à la présence de *Salmonella* sur les produits à base de volaille qui sont mis à la disposition des consommateurs, représente un élément important à gérer.

C'est dans ce contexte qu'est née l'idée de cette recherche, en vue de justifier auprès des autorités sanitaires la mise en place des mesures visant à maîtriser ce risque dans un pays officiellement indemne de *Salmonella*.

Le présent document est une étude épidémiologique visant à prouver la présence et estimer la prévalence de *Salmonella sp.* sur les poulets de chair mis à la disposition des consommateurs à Madagascar, laquelle a été menée en rencontrant les nombreuses contraintes toujours présentes dans les pays du Sud, mais qui donne une appréciation scientifiquement valable de la situation actuelle en matière d'hygiène alimentaire.

## Chapitre I . Généralités et objectifs de l'enquête

### 1.1 - Justifications de l'enquête et des paramètres

#### 1.1.1 - Justification générale

Depuis la conclusion en 1992 de l'Uruguay Round, qui a permis d'intégrer les produits agricoles dans le cadre des accords qui gouvernent les échanges entre pays, la gestion des différends concernant la sécurité des aliments tombe sous la juridiction de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC). Les pays producteurs devront fournir à cet organisme des certifications sur l'état sanitaire de leurs produits pour pouvoir effectivement vendre localement et aussi sur les marchés internationaux. Cette condition concerne aussi les pays en développement et il importe donc de mettre en place les normes essentielles notamment sur les produits alimentaires d'origine animale pour assurer des garanties sanitaires au consommateur.

Les produits avicoles sont les aliments les plus incriminés dans les toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* (Humphrey *et al.*, 1988). Les salmonelloses se traduisent cliniquement chez l'homme par des douleurs abdominales, de la nausée, des vomissements et de la diarrhée (Wierup, 1996). La forme de la maladie est en relation avec la virulence spécifique de la souche bactérienne infectante, la taille de l'inoculum et des facteurs spécifiques de l'hôte (âge, acidité gastrique, système immunitaire).

Les salmonelles sont essentiellement des parasites intestinaux des Vertébrés. Les salmonelles constituent maintenant une seule espèce et 6 sous-espèces. La sous-espèce *enterica* est adaptée aux animaux à sang chaud et à l'homme ; les autres sous-espèces sont principalement associées aux animaux à sang froid ou retrouvées dans l'environnement. Parmi les sérotypes de la sous-espèce *enterica*, la plupart sont ubiquitaires et certains montrent une spécificité d'hôte soit humaine (*S. typhi* ou *S. paratyphi* A) soit animale. Les sérotypes ubiquistes représentent la très grande majorité des sérotypes de *Salmonella* (*typhimurium*, *enteritidis*, *St. Paul*, *Virchow*...) et sont responsables des toxi-infections alimentaires collectives (Humbert et Salvat, 1997). Les salmonelles qui devront être étudiées appartiennent donc à la sous-espèce *enterica* car ce sont les germes qui peuvent contaminer l'homme via la consommation de viande de volaille et d'œufs.

#### 1.1.2 - Justifications particulières pour Madagascar

Actuellement à Madagascar, les contrôles officiels sur la qualité sanitaire des produits sont effectués principalement sur les aliments destinés à l'exportation afin de répondre à la réglementation lourde sur les marchés internationaux. Les produits destinés au marché national subissent peu de contrôles et leur état sanitaire est souvent méconnu. Or, il est important de mettre en place une gestion de la qualité pour assurer la pérennité de la filière et donner confiance aux consommateurs. De plus, l'initiation de cette démarche qualité doit se mettre en place dans le cas où les produits avicoles malgaches pourraient être exportés notamment dans les pays de la sous-région.

Dans le cadre de cette étude, la détermination de l'état sanitaire des points de vente permettra de mettre en évidence de façon réelle et objective la qualité des poulets vendus. Cette étude va répondre aux interrogations des acteurs de la filière en matière de qualité sanitaire et en même temps va permettre d'avoir une étude épidémiologique d'approche diagnostique comme outil capable de justifier une analyse de risque sur l'ensemble de la filière et la mise en place de protocoles de vaccination et autres mesures de contrôle pour maîtriser le risque.

En matière de santé publique actuellement est évident dans les statistiques l'incidence de diarrhées d'origine alimentaire dont la prophylaxie est négligée à tous niveaux, les *Salmonella* ont été déjà identifiées à partir des individus malades (Béraud *et al.*, 1990). Cette situation a des coûts économiques pour l'Etat, du fait des coûts de soins de santé et de médicaments d'urgence, de la congestion des hôpitaux et des pertes causées par l'absence sur les lieux de travail et à l'école entre autres effets.

En matière de production avicole, Madagascar est officiellement considérée comme territoire indemne de *Salmonella* qui soient capables d'affecter la santé animale et humaine comme zoonoses. L'étude permettra d'identifier le pathogène sur l'aliment prêt à consommer et d'avoir une idée de la magnitude de la problématique en comparant les résultats obtenus avec le circuit et les volumes de commercialisation des produits.

### 1.1.3 - Justification des techniques et méthodologies utilisés dans l'étude

Actuellement à Madagascar la production de volailles se fait selon différents schémas. On a ainsi un schéma de production traditionnel, pratiqué surtout dans la campagne et qui ne présente pas de niveau de croissance significatif, et un schéma de production intensif semi-industriel, appuyé par des entreprises privées qui fonctionnent sur un modèle d'intégration, centré en zone périurbaine, qui est en constante croissance (32 %) dans les dernières années dans le but de satisfaire la demande croissante de la ville.

C'est dans ce contexte qu'on a choisi de placer notre étude sur le circuit commercial, spécifiquement sur les points de vente d'Antananarivo, en prenant en considération le fait que :

- ❖ 80 % de la production et de la consommation nationales de poulets de chair se fait à Antananarivo ;
- ❖ les produits vendus en ville proviennent essentiellement des élevages intensifs, lesquels peuvent être acteurs potentiels du contrôle de risque dans l'avenir ;
- ❖ les conditions de ventes : c'est dans ces endroits que se trouvent les conditions les plus favorables pour le développement et la dissémination de la bactérie et en même temps c'est l'étape finale avant la consommation ;
- ❖ actuellement il n'existe pas à Madagascar de système de contrôle efficient permettant d'évaluer la qualité des produits mis à disposition du consommateur, même s'il existe les compétences professionnelles et les moyens matériels, le problème économique empêche la mise en place d'une démarche de contrôle de la qualité des aliments efficiente.

Pour se forger une idée sur la prévalence de *Salmonella* sur les produits avicoles, il est possible d'envisager d'abord un screening de la présence de *Salmonella* (peau du cou) sur les carcasses de volailles vendues dans les points de vente. Afin de mettre en évidence l'existence des *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, le diagnostic de certitude doit faire appel à la technique de référence d'identification de cette bactérie (*Recherche et identification des SALMONELLAE spp. sur peau de cou de poulet selon la norme ISO/FDIS 6579:2001(F)*). En fonction des résultats, il sera alors possible de proposer des études plus fines de mise en évidence ou d'un analyse de risque de contamination pour *Salmonella sp.* sur toute la filière.

## 1.2 - Objectifs de l'enquête

De façon générale, les objectifs de cette étude sont d'abord d'identifier les dangers liés à la consommation de produits avicoles. Spécifiquement il s'agit de déterminer la présence des *Salmonella* pathogènes pour l'homme dans les poulets de chair prêts à la consommation afin de pouvoir justifier la mise en place de mesures prophylactiques au niveau des points de vente si nécessaire. Enfin, il s'agit d'initier une démarche qualité qui puisse approfondir sur les risques de contamination tout au long de la filière et permettre ainsi de mieux maîtriser ce danger.

**L'objectif spécifique** est d'estimer la prévalence de la contamination par les salmonelles aviaires (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* notamment) dans les carcasses de **poulet de chair** proposés à la vente à Antananarivo, selon quatre modalités de vente différentes :

- ❖ petits étals de boucherie/charcuterie (PE),
- ❖ grandes surfaces (GS),
- ❖ marchés de la ville (MA),
- ❖ points de vente spécialisés (PS).

## 1.3 – Le contexte

### 1.3.1 - Présentation de la filière avicole à Madagascar

#### 1.3.1.1 - Importance de l'élevage avicole

Depuis plusieurs années, les politiques de développement de l'élevage en Afrique ont misé sur l'organisation et la modernisation de l'élevage traditionnel bovin extensif. Cette orientation des actions de développement et de recherche vers le principal type d'élevage a fait face à plusieurs contraintes dans les dernières années (impact sur l'environnement, pesanteurs socioculturelles, difficultés de commercialisation, ...) avec un impact faible et parfois négatif sur la filière.

Depuis quinze ans, les expériences dans plusieurs pays sur les filières à cycle court ont modifié très sensiblement les perspectives de développement durable, car elles présentent de nombreux avantages :

- ❖ Absence d'impact négatif sur l'environnement, du fait que la densité actuelle de concentration des élevages dans les pays africains ne représente un facteur de risque à considérer ;
- ❖ Participation des femmes dans les activités de production animale ;
- ❖ Création d'emplois directe et indirecte ;
- ❖ Professionnalisation plus importante ;
- ❖ Disposition des éleveurs pour mettre en place de nouvelles techniques ;
- ❖ Financement initial souvent modeste compatible avec les systèmes de crédit mutualistes ;
- ❖ Elevages souvent périurbains prenant en compte les besoins croissants des villes africaines en facilitant la commercialisation.

La filière avicole est en pleine croissance actuellement à Madagascar, mais avec de grosses insuffisances techniques (santé animale, alimentation, conduite de l'élevage, commercialisation) et organisationnelles. Ce développement est accompagné en zone périurbaine sur les élevages modernes par le conseil privé (entreprises intégratrices, firmes-services et opérateurs indépendants).

Les principales densités démographiques sont situées en région du Grand Tana (Antananarivo, Arivonimamo, Ambohitramo). Les chiffres suivants sont la résultante d'une estimation plus que d'une étude exhaustive et précise.

Tableau 1. Recensement administratif des volailles dans les 6 provinces de Madagascar

Régions	Effectifs de volailles	%
Antsiranana	2 929 000	11,2
Mahajanga	3 194 000	12,25
Toamasina	5 858 000	22,5
Antananarivo	5 089 000	19,5
Fianarantsoa	5 354 000	20,5
Toliara	3 636 000	13,9

Source :rapport de L'Action, 2004

Tableau 2. Recensement des volailles modernes dans les 6 provinces de Madagascar

Région	Poulets de chair	%	Pondeuses	%
Antseranana	79750	2	30400	4
Mahajanga	160000	4	22800	3
Toamasina	275100	8	30400	4
Antananarivo	2840250	80	623200	82
Fianarantsoa	88500	3	38000	5
Toliara	106400	3	15200	2

Source :rapport de Gama Consult, 2004 (Etude filières avicoles)

Tableau 3. Place des différentes espèces d'élevage

Espèces	Têtes
Volailles	26 060 000
Bovins	7 877 073
Porcins	530 892
Ovins	645 525
Caprins	1 220 469

Source: (Source : rapport d'activité sanitaire, Direction de l'Elevage 2002, cité dans la rapport de L'Action 2004)

### 1.3.1.2 - Typologie des élevages

Tableau 4. Typologies des éleveurs de poulets de chair à Madagascar

Type	Range	%
Petits éleveurs	< 200 têtes	22
Moyens éleveurs	200 - 1000	45
Gros éleveurs	> 1000 têtes	33

Source : rapport de Gama Consult, 2004 (Etude filières avicoles)

### 1.3.1.3 - Les productions intensives de poulets de chair et d'œufs de consommation

Tableau 5. Effectifs des volailles suivant type d'élevage

Type d'élevage	Nbre. de têtes	%
Poulet traditionnel	16000000	78,8
Poulet de chair	3550000	17,5
Pondeuses	760000	3,8
Total	20310000	100

Source : rapport de Gama Consult, 2004 (Etude filières avicoles)

### 1.3.1.4 - Importance de la commercialisation des produits issus des volailles dans l'alimentation humaine

A Madagascar, depuis quelques années, la viande de volaille a pris une importance considérable dans l'alimentation humaine, puisqu'elle est vendue à des prix qui restent attractifs dans un contexte économique difficile. Cependant depuis quelques mois, la dépréciation du franc malagasy, qui a entraîné un renchérissement des coûts de production inverse cette tendance

Tableau 6. Prix aux consommateurs des viandes à Antananarivo

	Poulet traditionnel	Poulet de chair	Porc	Zébu
Prix en Fmg / kg	18000	18000	17000	14000

Source : Source : Mercuriales de la MPE sur les marchés d'Antananarivo, 3<sup>ème</sup> semaine de septembre 2004.

### 1.3.1.5 - Différents types de commercialisation (voir figure 1)

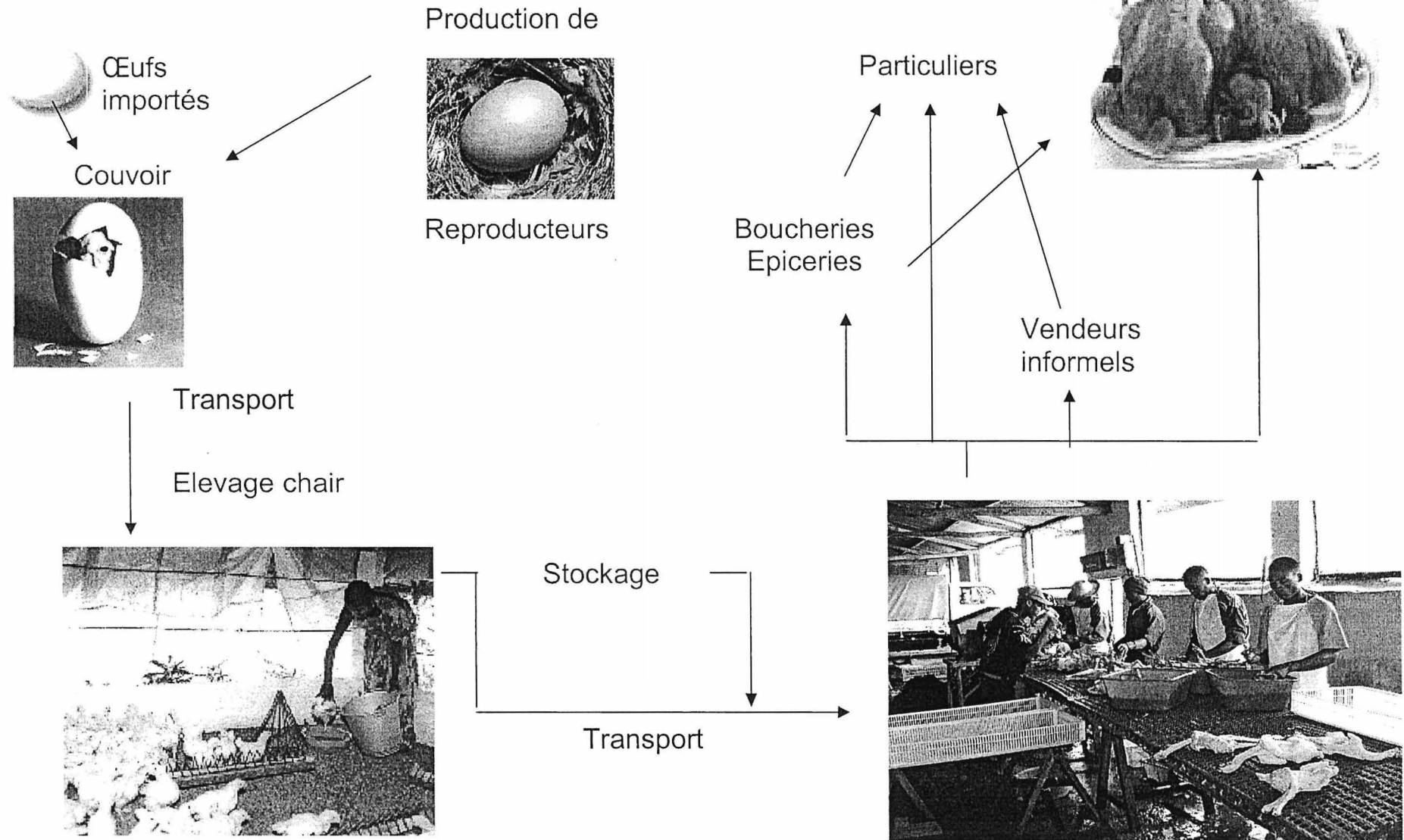
### 1.3.2 - Les contraintes liées à *Salmonella* et à son diagnostic

Les salmonelloses sont des infections causées par des bactéries de type bacille Gram négatif. L'infection par les *Salmonella* entraîne une maladie au niveau du tractus digestif et qui peut entraîner un processus septicémique par voie sanguine et se propager aux différents parts du corps. Les sources d'infection sont des aliments contaminés, l'eau et le contact avec d'autres individus porteurs de l'infection. Il y a plusieurs espèces et sérotypes différents de *Salmonella*, c'est une maladie endémique dans tous les pays du monde.

#### 1.3.2.1 - Classification et principaux caractères microbiologiques des *Salmonella*

Le genre *Salmonella* se distingue par les caractéristiques suivantes. Les *Salmonella* sont des bacilles Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, et appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, bacilles de 0,3 – 1,0 µm sur 1,0 – 6,0 µm, mobiles grâce à des flagelles péritriches ou immobiles, ne formant pas d'endospore.

# Figure 1. Schéma de la filière





Chimiotrophes, ces bactéries possèdent un métabolisme d'oxydation et fermentation. Elles produisent de l'acide et souvent des gaz au cours de la fermentation du D. glucose ou d'autres hydrates de carbone. Elles sont catalase positive (sauf rares exceptions) et oxydase négative. La famille des *Enterobacteriaceae*, est divisée en genres (actuellement vingt genres, une centaine d'espèces). Ces bacilles sont habituellement mobiles, mais des mutants immobiles peuvent être observés et le sérovar *pullorum-gallinarum* est toujours immobile. Les *Salmonella* se multiplient bien sur les milieux ordinaires. Les colonies ont habituellement, en 18 – 24 heures, 2 à 3 mm de diamètre, sauf pour certains sérovats donnant toujours des colonies naines (*abortusovis*, *abortusequi*, *thiphisuis*).

Tableau 7. Synthèse des caractéristiques biochimiques du genre *Salmonella*

Réduisent les nitrates en nitrites	+
Dégradent les glucides par métabolisme fermentatif	+
Utilisent le citrate comme unique source de carbone	+
Se multiplient sur milieux usuels sans facteurs de croissance	+
Fermentation du glucose avec gaz <sup>(1)</sup>	+
Production d'H <sub>2</sub> S <sup>(1)</sup>	+
Utilisation du lactose <sup>(2)</sup>	–
Utilisation du saccharose <sup>(2)</sup>	–
Possession de certaines enzymes :	
Bêta-galactosidase <sup>(2)</sup>	–
Uréase	–
Décarboxylases : lysine (LDC)	–
ornithine (ODC)	D
Dihydrolase:    arginine (ADH)	– (+)
Désaminases    phénylalanine	–
tryptophane	–
Tétrathionate-réductase	+
Culture en présence d'inhibiteur (KCN) (sauf exceptions)	–
Fermentation du mannitol	+
Indole	–
Acétylméthylcarbinol (VP)	–
Oxydase	–
Catalase	+

Source : Bourgerois *et al*, 1988

- (1) La plupart des souches sont gazogènes et produisent du H<sub>2</sub>S, mais certains sérovats ne produisent jamais de gaz, tels *thyphi* et *pullorum-gallinarum*. Des variants agazogènes des sérovats normalement gazogènes, peuvent être rencontrés (*Dublin*). Il en va de même pour ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>S (*paratyphi A* par exemple).
- (2) Sauf cas particuliers (*Arizonae*) et souches atypiques.

### Structure antigénique

Le genre *Salmonella* (ou encore l'espèce *Salmonella sp.*) peut être distingué en sérovats en fonction de la structure antigénique des souches. On distingue :

Les antigènes somatiques (ou antigènes O = « ohne hauch »)

Ce sont les antigènes de la paroi bactérienne, de nature lypopolysaccharidique (L.P.S. = endotoxine). Ils sont thermostables et alcool stable.

Trois composants peuvent être mis en évidence : le lipide A, responsable des effets toxiques, le « core » ou partie basale et le polysaccharide qui est le support de la spécificité, qui repose sur les sucres constitutifs et sur leurs liaisons (pour les formes S = Smooth).

Il existe de très nombreux antigènes O, mais ce sont les facteurs O majeurs qui servent à caractériser les différents groupes antigéniques (exemples : 04 = groupe B ; 09 = groupe D). A côté d'eux, existent des facteurs O accessoires, liés à un facteur majeur ou dont l'extériorisation est liée à la présence d'un bactériophage (conversion lysogénique).

Dans ce dernier cas, il s'agit d'une information parasite qui ne doit pas intervenir dans le classement des souches dans les groupes (cas du phage  $\phi$  15, des phages  $\phi$  15 +  $\phi$  34 pour les

anciens groupes E2 et E3.

L'agglutination par les sérums anti-O est lente, granulaire et difficile à dissocier. Certaines bactéries peuvent perdre leur spécificité antigénique par suite de mutations et deviennent des bactéries en forme R (Rough). Ces bactéries sont alors auto-agglutinables (en eau salée à 20 p. 1000).

### **Les antigènes d'enveloppe ou antigènes capsulaires = antigènes K**

Le seul reconnu chez les *Salmonella* est l'antigène Vi (de Virulence), qui peut exister chez *thypi*, *paratyphi C* et *Dublin*. La présence de cet antigène rend impossible l'agglutination par les sérums anti-O. L'expression de ce facteur est sous la dépendance d'au moins deux gènes (Vi A + Vi B) qui doivent coexister dans la bactérie pour que celle-ci ait lieu.

A côté de l'antigène d'enveloppe, peuvent être mis en évidence des antigènes protéiques de surface, les pili qui sont des filaments (plus ou moins nombreux) entourant le corps bactérien. Parmi ceux-ci, il faut différencier les pilis communs provoquant une hémagglutination (inhibée par le mannose) et les pilis sexuels codés par des plasmides et qui interviennent dans les phénomènes de conjugaison (échange de matériel génétique entre bactéries).

### **Les antigènes flagellaires (ou antigènes H = Hauch)**

Ils sont constitués d'une protéine, la flagelline, dont la composition en acides aminés est constante pour un type antigénique déterminé. Elle est sous la dépendance de 2 gènes de structure qui correspondent à la phase 1 et la phase 2.

La majorité des souches de *Salmonella* sont aptes à exprimer les deux spécificités de leur antigène H (diphases), cependant certaines ne peuvent en exprimer qu'une seule, soit 1 soit 2 (monophasique). La phase 1 est désignée par des lettres, la phase 2 par des chiffres (Exemple : *typhimurium* : 1,4, [5], 12 : i : 1,2). (Bourgeois *et al.*, 1988)

Le Minor *et coll.*, (1986) ont formulé des propositions concernant la nomenclature et la classification, des *Salmonella*, sur la base d'études intéressant les caractères phénotypiques et génomiques (notamment l'hybridation ADN/ADN) qui revêtent une particulière importance.

Le schéma établi par Kauffman, distinguant 4 sous-genres en fonction de quelques caractères biochimiques, avait été largement accepté.

Sous-genre I : majorité des *Salmonella* présentant les caractères classiques.

Sous-genre II : quelques souches, gélatine +, dulcitol +, malonate +.

Sous-genre III : *S. arizonae* (ou Arizona), qui se caractérise par :

$\beta$  galactosidase +, fermentation plus ou moins rapide du lactose, dulcitol -, et malonate + (caractère important).

Sous genre IV : quelques souches, dulcitol -, cultivant sur milieu au KCN.

Les travaux de LE MINOR *et al.*, (1986) ont montré en fait que les *Salmonella* constituaient une seule espèce et qu'elles pouvaient se répartir en 6 taxons ou sous-espèces, selon le schème suivant (voir tableau 8), auquel une 7<sup>e</sup> sous-espèce a été ajoutée en 1986. Par souci de commodité, une correspondance avec le schéma de Kauffman a été conservée.

La sous-espèce I qui regroupe la majorité des souches (>99,5 %) est surtout rencontrée chez les animaux à sang chaud alors que les autres le sont essentiellement chez les animaux à sang froid et dans l'environnement.

L'espèce unique porte le nom de *S. choleraesuis* et pour chaque taxon existe une sous espèce type. Les auteurs ont proposé de retenir le nom de *S. enterica* en lieu et place de *S. choleraesuis* pour désigner l'espèce type.

Compte tenu de ces considérations, les sérovars ne constituent plus que des sous espèces, leur nom peut s'écrire non précédé du *S.* (Le Minor *et al.*, 1985).

Tableau 8. Caractéristiques biochimiques des sous-espèces de *Salmonella*

Caractères	Sous-espèces						
	I	II	III a	III b	IV	V	VI
Test ONPG	-	-	+	+	-	+	d <sup>(1)</sup>
Gélatinase	-	+	+	+	+	-	+
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
Culture sur milieu KCN	-	-	-	-	+	+	-
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Dulcitol	+	+	-	-	-	+	D
Mucate	+	+	+	d	-	+	+
L (+) tartrate (d-tartrate)	+	-	-	-	-	-	-
Γ-glutamyltransférase	+ <sup>(2)</sup>	+	-	+	+	+	+
B-glucoronidase	d	d	-	+	-	-	D
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Lyse par le phage 01	+	+	-	+	-	+	+

(1) Caractère variable (d) selon les sérovars.

(2) Exceptions : serovar *typhimurium* = d ; *Dublin* = - ; (*enteritidis* = +) ; +, - = caractère de plus de 90% de souches ; d = positif pour 10 à 90% des souches.

Source : Bourgeois *et al*, 1988

### Physiologie : température

La température optimale de croissance est de 35 - 37 °C, cependant les *Salmonella* peuvent se multiplier de 5 °C à 47 °C avec une croissance nettement retardée pour les températures inférieures à 10 °C.

Les *Salmonella* comme la plupart des bactéries à Gram négatif, présentent une sensibilité certaine à la chaleur, la pasteurisation à 72 °C/15 sec. assure leur destruction dans le lait. Selon la nature des aliments, des variations peuvent s'observer. Il peut en aller même pour des souches, ainsi la souche *Senftenberg 775W* s'est révélée particulièrement résistante.

La réfrigération permet la survie des *Salmonella* et si la congélation provoque un abaissement sensible du nombre des *Salmonella*, ce procédé physique n'est pas de nature à provoquer leur disparition complète.

### pH

Elles supportent une gamme de pH allant de 4,5 à 9,0 avec un optimum de 6,5 à 7,5. En fonction des acides utilisés, des sensibilités variables peuvent s'observer, ainsi l'utilisation d'acide citrique autorise la croissance à pH 4,05 (en bouillon). La persistance de *Salmonella* dans les mayonnaises fortement acides à pH 3,2 a été signalée.

### Aw (activité de l'eau)

Les *Salmonella* se développent bien pour des valeurs d'Aw de 0,945 à 0,999. Pour des valeurs très faibles correspondant aux produits déshydratés (de l'ordre de 0,20), leur survie est de longue durée. Dans les aliments, les *Salmonella* peuvent se multiplier jusqu'à des valeurs d'Az égales) à 0,93.

### Caractéristiques spéciales, toxines et résistance aux antibiotiques

Les *Salmonella* sont assez sensibles au NaCl, mais néanmoins leur présence a été reconnue dans des saumures à 3,2 %. La concentration maximale tolérée serait de 5,8 %. Il convient de retenir l'influence conjuguée d'autres facteurs tels que le pH et la température.

Elles sont peu sensibles aux nitrites (résistantes au Perigo facteur) et peuvent survivre fort longtemps dans les salaisons.

Les variations du potentiel d'oxydoréduction ne les affectent pas.

Les *Salmonella* ne sont pas de bons compétiteurs et en particulier elles sont fortement inhibées par la flore lactique. Toutefois, on sait et cela joue un rôle déterminant dans l'épidémiologie

des salmonelloses, qu'elles résistent bien et longtemps dans le milieu extérieur (terre, matières fécales, matériaux, locaux).

Les rayonnements ionisants (rayons gamma ou électrons accélérés) tuent les *Salmonella* qui ne présentent pas de radiorésistance particulière (Bourgeois *et al.*, 1988).

Les *Salmonella* ne font pas partie des bactéries toxico-manes mais des bactéries entéro – envahissantes. Des septicémies existent aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

La libération de l'endotoxine (L.P.S.) intervient lors de la lyse des corps bactériens. (Bourgeois *et al.*, 1988). La possibilité des *Salmonella* de produire des entérotoxines a été évoquée par certains auteurs (Sarrudin *et col.*, 1983)

La grande fréquence avec laquelle les *Salmonella* hébergent des plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques doit être soulignée. Les souches d'origine animale, qui sont dans ce cas, peuvent être transmises à l'homme soit directement, soit par les aliments et créer des difficultés thérapeutiques. Les souches isolées des aliments sont cependant moins souvent multirésistantes que celles isolées chez les animaux. (Bourgeois *et al.*, 1988)

### 1.3.2.2 - La maladie humaine et le diagnostic

Les symptômes peuvent être différents d'une personne à l'autre, mais habituellement commencent entre 12 et 72 heures après l'ingestion de l'aliment ou de l'eau contaminée, et dans quelques cas la manifestation des symptômes peut attendre jusqu'à 4 –7 jours.

Les symptômes les plus caractéristiques sont des maux de crânes, des abdominaux, des diarrhées, des nausées et vomissements, une augmentation de la température. Il y a des individus qui portent l'infection de façon asymptomatique et qui gardent la bactérie dans l'intestine en agissant comme porteurs sains et en représentant un haut risque pour les autres individus. Les individus malades et immunodéprimés sont beaucoup plus susceptibles et peuvent développer la maladie sous la forme plus sévère voire mourir suite à des processus septicémiques.

Le diagnostic de l'infection à *Salmonella* chez les humains se fait par isolement bactériologique à partir des fèces des individus malades suspectés.

Les tests de diagnostic de *Salmonella* ne sont souvent pas performants, les laboratoires doivent être équipés pour identifier des types spécifiques de *Salmonella*. Chaque test doit déterminer le type spécifique présent dans l'infection et déterminer au moyen d'un antibiogramme l'antibiotique à utiliser.

Certains sérovars, dont *typhimurium* et *enteritidis*, sont plus communément que d'autres responsables de toxi-infections alimentaires, cependant il convient de considérer tous les sérovars (du sous genre I en particulier) comme capables de provoquer ce type d'infections. Des variations notables de virulence existent entre les souches, en relation peut-être avec la présence ou l'absence de plasmides qui seraient d'ailleurs caractéristiques de certains sérovars (Nicolas *et al.*, 1986 ; Helmuth *et al.*, 1985 ; Popoff *et al.*, 1984)

### 1.3.2.3 - La maladie animale

Les *Salmonella* peuvent être trouvées chez tous les mammifères domestiques ou sauvages, les oiseaux, les insectes, les batraciens, les reptiles (Gledel, 1985). Ceci est déterminant au plan épidémiologique, mais pour l'hygiéniste ce qui est intéressant, c'est d'abord l'existence d'un réservoir chez les animaux destinés à l'alimentation humaine ou très proches à l'homme. On peut considérer que les salmonelloses revêtent chez les animaux domestiques deux formes différentes :

- ❖ Infections se traduisant par des signes cliniques, c'est le cas chez les bovins (adultes et jeunes), les chevaux, les moutons (avortements, entérites, pathologie respiratoire).
- ❖ Portage intestinal, sans signes cliniques, c'est le cas chez les volailles, les porcs, les chiens (Gledel, 1985). Ceci n'exclut nullement la possibilité du portage chez les bovins ou l'existence d'épisodes pathologiques chez les volailles.

Cela signifie que le problème est surtout d'ordre économique du fait des pertes dues à la maladie. C'est aussi un problème de santé publique du fait des TIAC.

### 1.3.2.4 - Epidémiologie et transmission

Les *Salmonella* habitent dans le tractus intestinal des humains et animaux dont les oiseaux, et sont transmises pour voie orale – fécale. Les volailles d'élevage contaminent les œufs avec leurs fèces. Les aliments contaminés ont usuellement une apparence normale. Les

*Salmonella* figurent parmi les principales bactéries responsables de toxi-infections alimentaires. Il est généralement admis que seulement 1 à 10 % des TIAC sont connues chez les Services Officiels (Mossel , 1982).

Les aliments les plus souvent incriminés sont les viandes et les produits carnées, certains produits de charcuterie, les volailles et les œufs et tous leurs produits dérivés, le lait liquide ou en poudre. Il y a des souches qui sont exclusives des plusieurs espèces animales, souches spécifiques pour la viande de bœuf, viande de volailles, lait, œufs et tous les aliments en incluant les légumes peuvent être contaminés.

La contamination des aliments est en général paucimicrobienne et crée un risque potentiel. Les erreurs commises sur la chaîne alimentaire et le plus souvent au moment de la préparation des repas transforment ce risque potentiel en risque réel du fait de la multiplication bactérienne (Genigeorgis, 1986). L'homme ne représente qu'un maillon de la chaîne contaminante. Les animaux domestiques ou sauvages constituent un immense réservoir à partir duquel les *Salmonella* peuvent se diffuser dans l'environnement. L'existence d'une circulation des *Salmonella* avec des cycles contaminants a été démontrée. Le mode d'élevage intensif actuel avec de fortes concentrations animales favorise cette circulation. Dans de nombreux cas, l'évolution d'un sérotype chez les animaux est suivie de l'apparition de ce sérovar en pathologie humaine (Kapelmacher, 1983). Les enfants, les personnes malades du SIDA, les personnes âgées et les personnes sous traitements médicaux prolongés sont toujours plus susceptibles de développer la maladie même en ses formes plus sévères.

#### 1.3.2.5 - Prévention et contrôle

La cuisson adéquate des aliments est le premier moyen à prendre pour prévenir la Salmonellose, surtout pour les aliments préparés avec viandes et œufs. La pasteurisation du lait et le traitement des eaux des villes est recommandé. Il est important aussi d'avoir de bonnes pratiques d'hygiène avec les outils de préparation des aliments. Pour éviter la contamination croisée des aliments il faut toujours séparer les viandes crues dans les magasins et dans le réfrigérateur à la maison, ne jamais placer les aliments cuits sur les plates utilisés pour préparer la viande crue et utiliser des couteaux différents pour préparer des produits différents. Il faut interdire l'utilisation d'outils de cuisine en bois qui sont plus difficiles à nettoyer. Quand la cuisson a été faite avec des micro-ondes, il faut être sûr que l'intérieur des aliments a été cuit et qu'il ne reste pas de zones froides dans l'aliment où la bactérie peut survivre. Les personnes les plus susceptibles ne doivent pas faire la préparation des aliments.

Il est important de la part des organismes de santé publique d'exiger la formation sur l'hygiène du personnel dans l'industrie alimentaire et l'inspection des points de vente des aliments pour éviter la contamination croisée due à des erreurs de manipulation. Ils doivent également avoir connaissance des cas de salmonelloses, y compris les isolements faits dans les laboratoires cliniques, pour établir des cartes épidémiologiques permettant d'identifier de possibles foyers de contamination quand la casuistique est augmentée, situation qui demande la mise en place de mesures correctives d'urgence.

Dans l'élevage des animaux, les conditions de logement et d'hygiène ainsi que dans les cultures l'emballage des fruits et légumes doivent être faits avec précaution, pour maîtriser les risques de contamination des aliments par les *Salmonella*.

Une hygiène personnelle adéquate est toujours recommandée ainsi que bien techniques se laver les mains avant de préparer des aliments et après être allé aux toilettes. Les enfants doivent être plus surveillés car ils sont toujours plus susceptibles. Des traces de *Salmonella* persistent usuellement dans les intestins des patients jusqu'à 5 semaines et dans plusieurs cas pendant quelques mois après avoir développé la maladie.

### 1.3.3 - Les mesures mises en place à Madagascar

Tableau 9. Synthèses des législations sanitaires pour les produits à base de volaille à Madagascar

Texte	Thème
Arrête N° 7699/97 du 29/08/97	Fixant les conditions sanitaires auxquelles doivent satisfaire les établissements d'abattage de volailles à l'exportation
Arrête N° 7708/97 du 29/08/97	Fixant les conditions sanitaires auxquelles doivent satisfaire les ateliers de découpe de viandes de volaille
Arrête N° 7700/97 du 29/08/97	Déterminant les conditions d'inspection sanitaire post-mortem de volailles
Arrête N° 7701/97 du 29/08/97	Etablissant les normes de commercialisation pour les volailles
Arrête N° 7698/97 du 29/08/97	Relatif à l'estampillage des carcasses et abats de volailles
Arrête N° 7706/97 du 29/08/97	Fixant la liste des produits chimiques autorisés à être utilisés dans les établissements agroalimentaires à Madagascar

Source : DSV Antananarivo

A Madagascar, de façon générale, il existe dans la filière de commercialisation des denrées alimentaires un cadre de réglementations correspondant à la vente d'aliments en respectant des exigences minimales d'hygiène, mais la réglementation existante est inappliquée en pratique. Le manque de moyens des services vétérinaires et des agents chargés de l'inspection de viandes (qui se déplacent le plus souvent par leurs propres moyens), ainsi que la multiplicité des points de vente plus ou moins officiels rendent difficile le contrôle et l'application de ces textes. De plus, les organisations de consommateurs ne disposent pas d'une vraie représentativité et donc d'un poids suffisant pour exiger la mise en place d'une démarche qualité dans un sens favorable à la préservation de la santé publique.

Si certains opérateurs conscients des risques sanitaires, mettent en œuvre des moyens satisfaisants (chaîne du froid, étals faciles à désinfecter, hygiène des vendeurs) afin de s'attirer la préférence d'une clientèle aisée disposant d'un pouvoir d'achat plus élevé que la moyenne, la plupart des bouchers, notamment au niveau des marchés et des vendeurs de rue, n'ont qu'une notion très imparfaite des normes à respecter et ne sont pas toujours disposés à faire des efforts pour améliorer la qualité de leurs produits. Il faut regretter que certains opérateurs utilisent l'argument du faible pouvoir d'achat pour justifier l'absence d'amélioration des conditions de salubrité des étals et l'inopérance du système de santé publique. La mise en œuvre des mesures visant à limiter les risques sanitaires dépend donc essentiellement du niveau de formation et de compréhension des enjeux, ainsi que de la bonne volonté de chaque acteur.

### 1.3.4 - Les organismes intervenants dans l'étude

#### 1.3.4.1 - Maison du Petit Elevage

La Maison du Petit Elevage est une association interprofessionnelle des filières d'élevage à cycle court, régie par la loi 60 133. Elle intervient autour d'Antananarivo (dans un rayon de 100 km environ), dans le Bongolava (Tsiroanomandidy, Sakay, lac Itasy), autour du lac Alaotra et dans la région de Mahajanga et Marovoay.

Ses membres sont, de façon non limitative : des producteurs individuels, des entreprises d'élevage, des opérateurs en amont et des opérateurs en aval.

Les actions se concentrent autour de filières d'élevage "moderne" par opposition à l'élevage villageois traditionnel. Cinq filières d'élevage à cycle court sont rassemblées au sein de la MPE :

- Porcs, poules pondeuses, poulets de chair, palmipèdes (palmipèdes gras et production chair), aquaculture continentale (depuis 2001, carpe et tilapia).

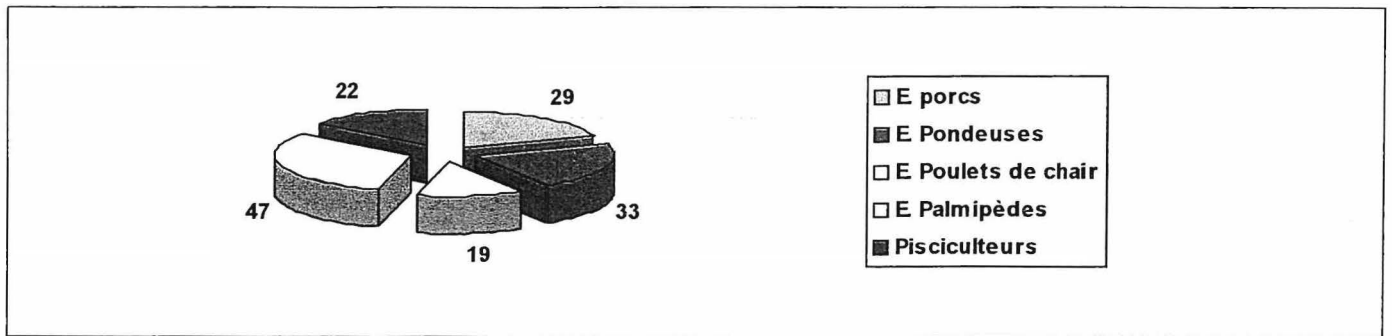


Figure 2. Répartition des membres cotisants de la MPE par filières en 2003

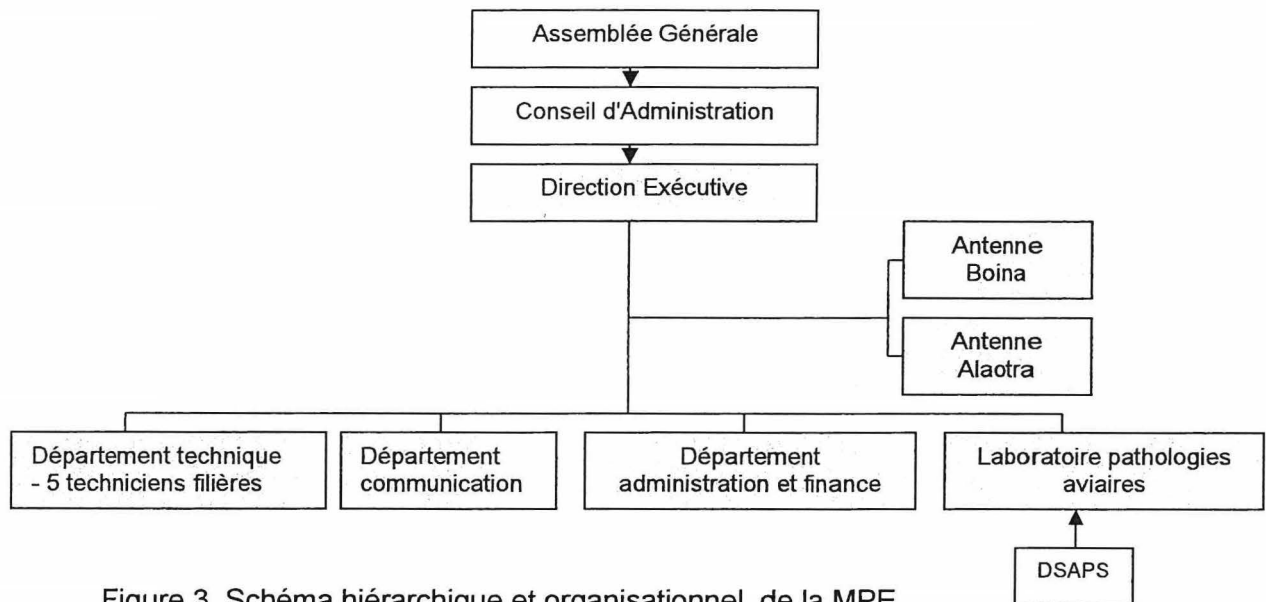


Figure 3. Schéma hiérarchique et organisationnel de la MPE

Au total, la Maison du Petit Elevage (hors laboratoire) dispose de 17 salariés permanents pour assurer ses services aux membres, toutes catégories confondues (du gardien au cadre). Le laboratoire dispose de quatre agents, dont trois détachés de la Direction des Services Vétérinaires (DSV) et un embauché sur fonds de projet.

Ses objectifs sont :

- ❖ Appuyer la création et l'organisation des producteurs
- ❖ Participer aux activités touchant la santé animale, l'alimentation animale, l'amélioration génétique, la production animale et l'approvisionnement en Intrants.
- ❖ Assurer le suivi et l'encadrement technique des membres
- ❖ Promouvoir la vulgarisation, la formation et la recherche et développement,
- ❖ Organiser des rencontres et concertations en vue de faciliter l'interaction et les synergies entre l'Etat, les producteurs et les opérateurs
- ❖ Mettre à la disposition des membres et du public, les bases de données relatives aux filières
- ❖ Assurer la représentation et la défense des intérêts de ses membres

Rechercher tout financement public, institutionnel et privé pouvant concourir à l'exécution de sa mission.

#### 1.3.4.2 - Institut Pasteur de Madagascar

L'institut Pasteur de Madagascar (IPM) est un établissement de l'Institut Pasteur placé sous le haut patronage du Gouvernement de la République Malgache, reconnu par elle d'utilité publique, avec personnalité civile et autonomie financière.

Il est partenaire du Service de Coopération et d'Action Culturelle du Ministère français des Affaires Etrangères et historiquement pôle d'excellence technique francophone, il constitue à Madagascar un centre de référence national et régional dans le domaine des maladies infectieuses.

## Chapitre II. Matériel et méthodes

### 2.1 - L'enquête

Le travail présenté dans ce rapport a été réalisé entre les mois d'avril et septembre 2004, en collaboration avec la Maison du Petit Elevage(MPE), l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) et la Direction de Santé Animale et Phytosanitaire de Madagascar (DSAPS). Il s'agit d'une enquête réalisée dans la ville d'Antananarivo concernant les points de vente du poulet de chair. L'objectif est de donner une image de l'état sanitaire des produits à base de poulet. Les personnes ayant participé directement à ce travail en collaboration avec le stagiaire sont :

Le docteur vétérinaire Hélène VIDON, conseiller technique principal de la Maison du Petit Elevage et maître de stage à Madagascar ;

Le docteur vétérinaire Hugues RAKOTOARITAHINA, D&R du Laboratoire de Diagnostic des Pathologies Aviaires de la Maison du Petit Elevage ;

La technicienne de laboratoire Fleurette RAVAOMANANA, du Laboratoire de Diagnostic des Pathologies Aviaires de la Maison du Petit Elevage ;

Le biologiste RAMANANA Aimé Jean Doris, du Laboratoire de Diagnostic des Pathologies Aviaires de la Maison du Petit Elevage ;

Le docteur Jean Louis SOARES, épidémiologiste de l'Institut Pasteur de Madagascar ;

Le docteur Manutea GAY, responsable du laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement de l'Institut Pasteur de Madagascar ;

Le docteur vétérinaire Renaud LANCELOT, épidémiologiste détaché auprès de la Direction de Santé Animale et du Phytosanitaire.

Ce chapitre expose le protocole d'enquête appliqué au cours de l'étude, le détail des zones visitées, les modalités de prélèvement ainsi que les techniques des analyses bactériologiques effectuées au laboratoire.

#### 2.1.1 - Définition de la méthode d'échantillonnage

Pour avoir une idée de la méthode d'échantillonnage la plus adaptée pour cette étude, une pré- enquête de type « sondage » a été faite sur la ville d'Antananarivo pour demander aux vendeurs et aux ménages quels étaient les principaux endroits de vente de poulet de chair à Antananarivo. Les informations recueillies ont servi à déterminer le plan d'échantillonnage qui sera détaillé ci-dessous.

La méthode d'échantillonnage a été élaborée en suivant les directives générales concernant l'exécution d'enquêtes sanitaires utilisant le sondage en grappes dans les pays en développement. C'est une méthode utilisable par des praticiens peu spécialisés en statistique et sans formation de base en matière de sondage. Ces méthodes font appel à un plan comportant un dispositif d'auto - évaluation simple, inspiré de celui qui est utilisé par le Programme élargi de vaccination de l'OMS. (S. Bennett, *et al* 1991). Le plan d'échantillonnage donne une description de la méthode

#### 2.1.2 - Principes

Il s'agit de constituer un échantillon représentatif de poulets vendus sur les quatre types de sites de vente. L'unité épidémiologique est donc le poulet.

En ce qui concerne les sites « petits étals » (PE) et « marché en ville » (MA), le principe d'échantillonnage retenu est celui d'un sondage à deux degrés. On appellera : V : le nombre de vendeurs faisant partie de l'échantillon et P : le nombre de poulets prélevés chez chaque vendeur

Dans un premier temps V vendeurs seront tirés au sort puis dans un second temps, pour chacun des vendeurs sera prélevé un échantillon P de poulets (peau du cou).

Le nombre d'aliments total à analyser pendant la période d'étude est égal à  $V \times P$ .

En ce qui concerne les sites « grande surface » (GS) et « point spécialisé » (PS), pour chacun des points de vente l'échantillonnage se fera sur le principe d'un sondage aléatoire simple.



## Contraintes

Période de l'étude: La période de l'étude est fixée à 9 semaines pour tenir compte du caractère de l'étude (étude pilote à budget limité), pour disposer de résultats rapidement exploitables et en ne prenant pas en compte volontairement de possibles variations saisonnières compte tenu des contraintes exposées.

Caractéristiques des vendeurs et ou points de vente : le nombre de poulets vendus peut être différent d'un point de vente à l'autre.

L'analyse statistique doit en tenir compte et donner plus de poids aux « *gros vendeurs* ». A cet effet, lors de la présentation des résultats globaux, une pondération sera appliquée sur la base du nombre moyen de poulets vendus par mois.

Tirage au sort des points de vente: **Site PE** : la base de sondage utilisée pour définir le point de départ sera la carte de la ville d'Antananarivo. La liste des points de vente des poulets de chair n'étant pas connue, il faudra à partir d'un endroit désigné par tirage au sort sur la carte de la ville et si ce dernier ne présente pas de poulets de chair à la vente, cheminer de manière aléatoire jusqu'à la rencontre d'un point de vente proposant des poulets de chair.

**Site MA** : après avoir désigné les marchés à mettre dans l'étude, la sélection du vendeur se fera par tirage au sort au moment d'arriver sur place et entre les étals qui sont installés .

**Site GS** : les sites vendant au moins 50 poulets de chair par semaine ont tous été identifiés et figurent exhaustivement dans l'échantillon.

Il s'agit des grandes surfaces suivantes :

- enseigne Shoprite, 5 points de vente : Shoprite Analakely, Shoprite Ankorondrano, Shoprite Ampefiloha, Shoprite Ambohibao, Shoprite Antaninarenina.

- enseigne Leader price, avec 3 points de vente : Leader Tanjombato, Leader Ambohibao et Leader price Ankorondrano.

- enseigne Jumbo, 3 points de vente : Jumbo Ankorondrano, Jumbo Tanjombato, Jumbo Digue.

**Site PS** : une enseigne de points de vente spécialisés a été identifiée :

La Hutte Canadienne avec 7 points de vente.

Tirage au sort des aliments: une fois sur le site de vente identifié, la sélection des poulets dans le stock du vendeur sera réalisé en attribuant un numéro à chacun des poulets disponibles et en réalisant un tirage au sort simple.

Le prélèvement sera réalisé par l'enquêteur (le don de l'échantillon a été convenu avec les vendeurs).

L'achat sera fait le matin, permettant ainsi la réalisation indirecte d'un tirage au sort parmi les aliments susceptibles d'être vendus dans la journée.

Nombre d'analyses pouvant être effectuées: la durée de l'enquête et le rythme des prélèvements sont basés sur le nombre d'échantillons que le laboratoire est susceptible de prendre en charge quotidiennement.

Dans le cadre de cette étude, l'effectif maximum de prélèvements retenu est de 10 par jour sur la base de 5 jours de travail par semaine. La période d'étude étant de 9 semaines, ceci représente un échantillon total maximum de 450 prélèvements analysables.

Nombre d'aliments nécessaires: des recherches faites au Sénégal ont révélé une prévalence des *Salmonella* dans les carcasses de poulet de chair exposés sur les points de vente de 29 % (Cardinale, 2003).

Pour un sondage élémentaire, si l'on retient un pourcentage de poulets contaminés de 30 %, pour une précision souhaitée de l'ordre de 20 % (30 % +/-20 %), en prenant en compte un risque de première espèce  $\alpha = 5\%$ , il faudrait un échantillon minimum de 21 poulets.

Il est important, pour des raisons de représentativité que les prélèvements se fassent tout au long de la période d'étude selon une fréquence comparable et des modalités aléatoires.

Ceci souligne l'importance de la planification en début de l'enquête, donnant libre cours au hasard pour les jours de l'enquête et de l'heure d'enquête.

### 2.1.3 - Méthodologie d'enquête

**Site PE** : Compte tenu des contraintes, un échantillonnage en grappes est le plus à même de répondre aux besoins de l'étude avec une certaine robustesse sur le plan méthodologique. L'échantillon doit comporter V grappes de P poulets.

Compte tenu du choix de l'échantillonnage en grappes, pour prendre en compte les modifications de variabilité liées à un effet de grappe, il paraît acceptable d'espérer atteindre avec 54 poulets, une précision de +/- 20% (effet de grappe estimé à 2).

L'obtention de la précision optimale serait obtenue en sélectionnant au moins 27 vendeurs (V=27) et en prélevant à chaque fois 2 poulets (P=2).

Compte tenu des contraintes de l'enquête (durée de 9 semaines), ceci pourrait être cohérent avec la sélection de 3 vendeurs par semaine et le prélèvement de 2 échantillons par vendeur soit un total de 6 échantillons par semaine. L'on pourrait obtenir ainsi sur la durée de l'enquête un échantillon total de 54 poulets. L'endroit (quartier) a été fixé après un tirage au sort sur la carte de la ville, le point de départ est défini par tirage au sort parmi les vendeurs présentes sur place au moment d'arriver au lieu choisi pour faire les prélèvements, l'enquêteur cheminera de manière aléatoire depuis ce point (par exemple en numérotant les directions possibles et en tirant au sort un de ces chiffres ou en fixant la direction de cheminement en faisant tourner un crayon à chaque croisement ou en demandant à la population de voisinage quel est l'étal de boucher le plus proche vendant des poulets de chair). L'échantillon de poulet (40 g) a été acheté aux vendeurs par rapport au prix sur marché pour gagner du temps et favoriser le dialogue.

**Site MA** : Un choix raisonné, en prenant en compte des marchés assurant les effectifs de vente les plus importants oriente vers la réalisation de l'enquête sur quatre grands marchés d'Antananarivo :

Marché d'Analakely, marché d'Andravoahangy, marché d'Isotry, marché d'Anosibe.

Le tirage au sort du jour de passage se fait à partir des jours d'une semaine donnée distincts de jours où des prélèvements sur sites PE sont prévus.

Sur place, après avoir compté le nombre de vendeurs de poulets de chair sur le marché et leur avoir attribué un numéro de 1 à n, la sélection de 3 vendeurs se fera par tirage au sort d'un nombre entre 1 et n. Pour chaque vendeur 1 échantillon distinct sera prélevé. L'échantillon de poulet (40 g) a été acheté aux vendeurs par rapport au prix sur marché pour gagner du temps et favoriser le dialogue avec les vendeurs

**Site GS** : Le premier interlocuteur du rayon de vente de la grande surface sera invité à fournir les échantillons de poulet. Pour chaque grande surface, les passages se feront dans les deux jours de la semaine pendant lesquels les autres groupes n'ont pas d'activité de prélèvement. Un circuit défini sur un principe rationnel de moindre temps passé permettra de définir un sens A et un sens B qui est le sens inverse du circuit précédent. On alternera à chaque fois le sens emprunté pour la collecte des échantillons. Lors du jour de passage une alternance permettra de collecter 3 prélèvements par point de vente une semaine et 2 prélèvements par point de vente les jour de passage la semaine suivant, soit un total global de 22 échantillons par grande surface.

**Site PS** : Le premier interlocuteur du rayon de vente du point de vente spécialisé sera invité à fournir les échantillons de poulet.

Le prélèvement se fera un seul jour de la semaine. Lors des passages hebdomadaires sur l'enseigne « La Hutte », compte tenu du nombre de points de vente (7 à Antananarivo), il faudra prélever un échantillon par point de vente soit un total de 7 échantillons par semaine.

Tableau 10. Récapitulatif des effectifs totaux d'échantillons par type de point de vente après 9 semaines d'enquête

Type de point de vente	Enseigne	Nombre total d'échantillons	Total (%)
Petit étals		54	11,5
Grand surface	Shoprite Ankorondrano	22	51,8
	Shoprite Analakely	22	
	Shoprite Ambohibao	22	
	Shoprite Antaninarenina	22	
	Shoprite Ampefiloha	22	
	Leader Price Tanjombato	22	
	Leader Price Ambohibao	22	
	Leader Price Ankorondrano	22	
	Jumbo Tanjombato	22	
	Juambo Ankorondrano	22	
	Jumbo Digue	22	
Point spécialisé	La Hutte Antaninarenina	9	13,5
	La Hutte Analamahitsy	9	
	La Hutte 67 Ha	9	
	La Hutte Manjakaray	9	
	La hutte Ivato	9	
	La Hutte La route circulaire	9	
	La Hutte Ampefiloha	9	
Marché en ville	Marché Analakely	27	23,1
	Marché Andravoahangy	27	
	Marché Isotry	27	
	Marché Anosibe	27	
<b>TOTAL</b>		<b>467</b>	<b>100</b>

Source: laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

### Formulaire d'enquête

Pour enregistrer de façon immédiate l'information concernant les vendeurs a été utilisé un formulaire composé de la manière suivante :

-Un document de recueil d'informations sur le vendeur dénommé « FICHE VENDEUR » lequel a pour but d'apporter des informations concernant le vendeur, son profil et son activité commerciale, des informations concernant aux caractéristiques du point de vente et aussi les attentes des vendeurs par rapport à la démarche de qualité (voir annexe nbre. 2).

-Un document de recueil d'informations sur l'aliment dénommé « FICHE POULET » lequel a pour but d'apporter les informations concernant le poulet, plus spécifiquement l'échantillon et les conditions dans lesquelles celui-ci est exposé à la vente et prélevé (voir annexe nbre. 2).

#### 2.1.4 - Zones visitées

Les zones visitées sont situées dans le périmètre urbain d'Antananarivo, spécifiquement sur les principaux points de vente de viande de poulet de chair.

Tableau 11 . Plan chronologique d'échantillonnage pour l'étude sur la prévalence de *Salmonella* sur les carcasses de poulet de chair exposés à la vente à Antananarivo

Semaine	Jour	P.Etats	Vendeurs	Echant.	H. début	G.surface	Echant.	Sens	H. début	Marchés	Vendeurs	Echant.	Sens	H. début	Hutte	Echant.	Sens	H. début	Total échantillons	Echant. analyses
S1	Lundi	3*2 <sup>(a)</sup>	3	6	8H00														6	6
	Mardi									4	3 par marché	12	A	8H00	7*1	7	A	8H00	19	25
	Mercredi																		0	25
	Jeudi					7*2	14	A	9H00										14	39
	Vendredi					4*2	8	A	9H00										8	47
S2	Lundi					4*3	12	B	9H00										12	59
	Mardi																		0	59
	Mercredi	3*2	3	6	8H00														6	65
	Jeudi									4	3 par marché	12	B	8H00	7*1	7	B	8H00	19	84
	Vendredi					7*3	21	B	9H00										21	105
S3	Lundi					7*2	14	A	9H00										14	119
	Mardi									4	3 par marché	12	A	8H00	7*1	7	A	8H00	19	138
	Mercredi	3*2	3	6	8H00														6	144
	Jeudi																		0	144
	Vendredi					4*2	8	A	9H00										8	152
S4	Lundi	3*2	3	6	8H00														6	158
	Mardi																		0	158
	Mercredi									4	3 par marché	12	B	8H00	7*1	7	B	8H00	19	177
	Jeudi					4*3	12	B	9H00										12	189
	Vendredi					7*3	21	B	9H00										21	210
S5	Lundi					7*2	14	A	9H00										14	224
	Mardi																		0	224
	Mercredi	3*2	3	6	8H00														6	230
	Jeudi									4	3 par marché	12	A	8H00	7*1	7	A	8H00	19	249
	Vendredi					4*2	8	A	9H00										8	257

S6	Lundi				4*3	12	B	9H00					12	269					
	Mardi												0	269					
	Mercredi				7*3	21	B	9H00					21	290					
	Jeudi	3*2	3	6	8H00								6	296					
	Vendredi								4	3 par marché	12	B	8H00	7*1	7	B	8H00	19	315
S7	Lundi				7*2	14	A	9H00					14	329					
	Mardi												0	329					
	Mercredi								4	3 par marché	12	A	8H00	7*1	7	A	8H00	19	348
	Jeudi				4*2	8	A	9H00					8	356					
	Vendredi	3*2	3	6	8H00								6	362					
S8	Lundi				4*3	12	B	9H00					12	374					
	Mardi				7*3	21	B	9H00					21	395					
	Mercredi	3*2	3	6	8H00								6	401					
	Jeudi												0	401					
	Vendredi								4	3 par marché	12	B	8H00	7*1	7	B	8H00	19	420
S9	Lundi								4	3 par marché	12	A	8H00	7*1	7	A	8H00	19	439
	Mardi												0	439					
	Mercredi	3*2	3	6	8H00								6	445					
	Jeudi				7*2	14	A	9H00					14	459					
	Vendredi				4*2	8	A	9H00					8	467					
<b>TOTAL</b>					<b>54</b>	<b>242</b>							<b>108</b>				<b>63</b>	<b>467</b>	
<b>Total %</b>					<b>11,5</b>	<b>51,8</b>							<b>23,1</b>				<b>13,5</b>	<b>100</b>	

(a) : dans le style A\*B : A = Nbre. de points de vente ; B = Nbre. d'échantillons à prélever/point de vente

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE



## 2.1.5 - Budget matériel

La mis en place des analyses bactériologiques a demandé l'utilisation de nombreux réactifs de laboratoire, lesquels sont décrits dans le tableau suivant :

Tableau 12. Réactifs utilisés pour les analyses bactériologiques

Nom du milieu	Marque	Référence	Nbre. de lote	Date de péremption
Citrate de Simmons	BIORAD	64834	3D0112	2008-04-30
Manitol mobilité nitrate	BIORAD	64874	1B0113	2005-10-30
Clark et Lubs	AES	AEB 140272	327928	2007-08
Urée Indole	BIORAD	63714	2L0255	2004-11-30
ADH-ODC-LDC	BIORAD	53725	4C2082	2005-03-30
Réactif de Kovacs	BIORAD	55312	3C0231	2003-09-18
Rappaport Vassiliadis	AES	AEB 110879 N	416325	2005-06-11
XLD	AES	AEB 153402	416732	2006-04
Sélénite Cystine	BIORAD	64074	3B0114	2008-01-30
Salmonella Shiguella	BIORAD	64514	3B0210	2007-12-30
Sodium bisélénite	BIORAD	64075	3D0126	2005-06-30
Eau peptonnée tamponée	AES	AEB 140302	407139	2008-03
Muller Kauffman Tétrathionate	AES	AEB 140702	405837	2007-05
Gélose Nutritive à 2,8%	AES	AEB 151952	408635	2009-03
Kliger- Hajna	BIORAD	64844	2D0136	2007-01-30
Mannitol mobilité nitrate	BIORAD	64874	2L0114	2007-07-30
Gélose Hecktoen	BIORAD	64284	2G0125	2007-04-30
Reactif VP 1 et VP 2	BioMerieux	70422	794927301	2005-01-22
Disque ONPG	AES	AEB 191025	418136	2005-08-31
XLD gélose	AES	AEB 143402	410727	2005-10

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

Un budget prévisionnel des ressources affectées à la réalisation de l'étude a été présenté par le laboratoire de pathologie aviaire de la MPE. Il est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 13. Bilan prévisionnel des ressources destinées à la réalisation de l'étude sur la prévalence de *Salmonella* sur les carcasses de poulets de chair à Antananarivo

Description	Montant en euros
Milieux de culture	6200
Combustible	234
Achat des échantillons	14
Intrants et matériel jetable	218
Billet d'avion du stagiaire	1460
Courrier rapide	2161
Total	10287

## 2.2 – Les prélèvements

### 2.2.1 – Protocole technique des prélèvements

#### 2.2.1.1 - Le pré-enrichissement : *Eau peptonée tamponnée*

Edel et Kampelmacher <sup>1</sup> ont observé que l'eau peptonée tamponnée peut être utilisée comme milieu de pré-enrichissement avant l'enrichissement sélectif lors de la recherche des *Salmonella* dans les aliments car un choc sublétal pour les *Salmonella* peut se produire dans beaucoup de processus alimentaires. Il permet notamment de récupérer les cellules stressées par les procédés de conservation alimentaire. Dans une étude impliquant l'isolement de *Salmonella* dans une viande artificiellement contaminée par des germes ayant subi un choc sublétal, un pré-enrichissement dans l'eau peptonée tamponnée à 37°C pendant 17 heures avant ensemencement dans un bouillon bile-vert brillant- tétrathionate, a montré de meilleurs résultats comparé à un enrichissement direct.

Pietzsch <sup>2</sup> a trouvé que l'isolement de *Salmonella* dans des oeufs était nettement amélioré par un pré-enrichissement dans l'eau peptonée tamponnée à 37°C pendant 17 heures, suivi d'une incubation de 10 ml de l'échantillon dans 100 ml de bouillon Sélénite Cystine ou de bouillon de Muller-Kauffmann pendant 47 heures à 43°C.

Sadovski <sup>3</sup> a rapporté, lors d'expérimentations sur l'isolement de *Salmonella* dans des légumes congelés, que la baisse rapide du pH lorsqu'on utilise un bouillon lactose <sup>4</sup> comme milieu de pré-enrichissement était préjudiciable à la récupération des *Salmonella* ; ceci est dû à une sensibilité accrue à un pH bas des *Salmonella*, stressées par la congélation, qui peuvent contaminer les légumes congelés. Un pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée permet de maintenir un pH élevé pendant plus de 24 heures d'incubation <sup>5</sup>. Un temps d'enrichissement réduit de 6 heures a été étudié <sup>6</sup> mais, dans le cas d'échantillons fortement contaminés, il est conseillé d'ajouter 0,1 g de vert malachite par litre d'eau peptonée tamponnée.

Cette addition est importante quand les *Salmonella*, présentes en faible quantité, ont un temps de génération augmenté du fait de la flore associée et ne peuvent atteindre un nombre minimum pour être isolées avec succès.

#### 2.2.1.2.a - L'enrichissement : *milieu de Muller - Kauffmann tétrathionate (bouillon de base au tétrathionate avec novobiocine)*

Milieu d'enrichissement sélectif pour les *Salmonelles sp.* avec inhibition des *Proteus sp.*

Muller <sup>1</sup> a mis au point ce milieu en 1923. Il a été ensuite modifié par Kauffmann <sup>2,3</sup> qui a ajouté du vert brillant et de la bile de bœuf pour inhiber les germes commensaux et améliorer ainsi l'isolement des salmonelles.

Il est important d'ajouter le colorant en poudre comme indiqué le fabricant, car le chauffage du vert brillant ou son incorporation au milieu de base peut diminuer sérieusement son pouvoir sélectif. L'addition de 4 mg/l de novobiocine au bouillon a été décrite par Jeffries <sup>4</sup> pour supprimer la pousse des *Proteus sp.*

Ce bouillon a été testé, lors d'une vaste étude, par neuf laboratoires de différents pays.<sup>5</sup>

#### 2.2.1.2.b - L'enrichissement : *milieu RVS (bouillon Rappaport – Vassiliadis)*

C'est un bouillon recommandé comme milieu sélectif d'enrichissement pour l'isolement des *Salmonella* dans les aliments et les échantillons de l'environnement des *Salmonella*, ce milieu est basé sur la formule décrite par Van Schothorst et Renaud <sup>1</sup> ; il peut également être utilisé pour l'isolement des *Salmonella* dans les fèces, sans pré - enrichissement, à condition que l'inoculum soit faible. La formule originale décrite par Rappaport *et coll.*<sup>2</sup> a été développée en vue d'exploiter les 4 caractéristiques spécifiques des *Salmonella* par rapport aux autres Entérobactéries :

1. Capacité à survivre dans un milieu à forte pression osmotique.
2. Capacité à se multiplier à des pH bas.
3. Résistance plus grande au vert malachite.
4. Besoins nutritifs relativement moins importants.

Le bouillon de Rappaport a été trouvé supérieur <sup>2</sup> au bouillon Sélénite et au bouillon Tétrathionate pour l'enrichissement des *Salmonella* à l'exception de *Salmonella typhimurium*. Vassiliadis *et coll.*<sup>3</sup> ont modifié le bouillon de Rappaport en diminuant la concentration en vert malachite et en augmentant la température d'incubation à 43°C. Ce milieu modifié est le bouillon de



Rapport Vassiliadis (RV) et il s'est montré supérieur aux autres milieux d'enrichissement sélectif, particulièrement quand on utilise un faible inoculum de bouillon de préenrichissement.<sup>4,5,6,7</sup> Il est important que l'inoculum soit suffisamment faible pour ne pas modifier la sélectivité du milieu. Un rapport inoculum/bouillon de 1/100 à 1/2000 (vol/vol) est généralement retenu<sup>10</sup>. Il est possible d'améliorer la sélectivité du bouillon RV en ajoutant de la novobiocine<sup>11</sup>.

### 2.2.1.3.a - L'isolement : milieu XLD gélose

C'est un milieu sélectif pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella* à partir d'échantillons cliniques et de produits alimentaires.

Taylor<sup>1</sup> a été le premier à mettre au point la formule du milieu Xylose Lysine Désoxycholate pour l'isolement et l'identification des *Shigella* à partir d'échantillons de selles. Depuis, ce milieu a été trouvé satisfaisant pour l'isolement et l'identification présomptive à la fois des *Salmonella* et des *Shigella*<sup>2</sup>.

Il est basé sur la fermentation du xylose, la décarboxylation de la lysine et la production d'hydrogène sulfuré pour différencier les *Salmonella* et *Shigella* des bactéries non-pathogènes.

La fermentation rapide du xylose est une caractéristique commune aux entérobactéries, excepté celles des genres *Shigella sp.*, *Providencia sp.* et *Edwardsiella sp.*<sup>1</sup>. Ainsi le xylose a été inclus dans le milieu pour identifier les *Shigella* par une réaction négative. On différencie les *Salmonella* des germes non-pathogènes fermentant le xylose par incorporation de lysine dans le milieu. Les *Salmonella* fermentent le xylose et décarboxylent la lysine avec alcalinisation du pH, comme les *Shigella*. On différencie les *Shigella* des *Salmonella* et *Edwardsiella* par la production d'hydrogène sulfuré.

Le taux d'acide élevé produit par la fermentation du lactose et du saccharose empêche l'alcalinisation du milieu par les coliformes lysine (+) et la décarboxylation de la lysine par les germes non-pathogènes producteurs d'H<sub>2</sub>S. L'acidité empêche également le noircissement par ces microorganismes pendant 17 à 24 heures. Le désoxycholate de sodium est incorporé au milieu en tant qu'inhibiteur. La concentration utilisée inhibe les coliformes sans diminuer la pousse des *Shigella* et *Salmonella*. La sensibilité et la sélectivité du milieu XLD surpassent celles des milieux traditionnels en boîtes, par exemple la gélose Eosine-Bleu de méthylène, la gélose Salmonella - Shigella ou la gélose au sulfite de bismuth, qui ont tendance à inhiber la croissance des *Shigella sp.* On trouve de nombreuses comparaisons favorables entre le milieu XLD et ces autres milieux dans les publications.<sup>4,5,6,7,8,9</sup>

La présence des *Salmonella* et *Shigella sp.* n'est pas masquée par la pousse abondante d'autres germes<sup>3</sup>; par conséquent, le milieu XLD est idéal pour l'examen des échantillons contenant une flore mixte et suspectée d'abriter des germes entéropathogènes, par exemple prélèvements médicaux ou produits alimentaires. Chadwick, Delisle et Byer<sup>10</sup> ont recommandé l'utilisation de ce milieu pour aider au diagnostic d'identification des entérobactéries.

Tableau 14. Lecture des colonies sur milieu XLD gélose

Germe	Aspect
<i>Salmonella sp.</i> , <i>Edwardsiella sp.</i>	colonies rouges à centre noir
<i>Shigella sp.</i> , <i>Providencia sp.</i> , <i>Salmonella sp.</i> H <sub>2</sub> S nég. (ex. <i>S. paratyphi A</i> )	colonies rouges
<i>Escherichia sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Proteus sp.</i> , <i>Serratia sp.</i>	colonies jaunes, opaques

REMARQUE : *Proteus sp.* et *Pseudomonas sp.* peuvent donner des colonies rouges

### 2.2.1.3.b – L'isolement : Salmonella - Shigella (Gélose)

C'est un milieu sélectif différentiel pour l'isolement des *Salmonella* et de certaines *Shigella* dans les prélèvements cliniques, les aliments, etc...

Les germes Gram + et les coliformes sont inhibés par le vert brillant, les sels biliaires, le thiosulfate et le citrate.

Le thiosulfate combiné au fer constitue également un indicateur de la production d'H<sub>2</sub>S, qui se manifeste par un noircissement du centre des colonies.

Les germes lactose – donnent des colonies incolores, tandis que les coliformes pouvant pousser occasionnellement, ainsi que les autres germes lactose + donneront des colonies roses ou

rouges (Bourgerois *et al.*, 1988).

Ce milieu est hautement sélectif et les souches R de *Shigella* ne poussent pas. Il n'est donc pas recommandé pour un primo-isolement des *Shigella* <sup>1,2</sup>

#### **2.2.1.4 – Le repiquage des souches : Gélose nutritive**

La gélatine nutritive, milieu solide à 22°C et en-dessous, est utilisée pour la recherche de la liquéfaction de la gélatine et la numération des germes à 20°C <sup>1</sup>.

La gélatine est liquéfiée de façon caractéristique par certains germes protéolytiques ; bien que les milieux à la gélatine aient été largement supplantés par les milieux géloses dans la plupart des cas, la gélatine nutritive est toujours utilisée pour différencier les microorganismes par leur pouvoir protéolytique.

Pour l'utilisation, il faut incuber le milieu ensemencé par piqûre ou en surface, à 20–22°C ou incuber à plus haute température (habituellement la température optimale du germe étudié) puis placer le tube au réfrigérateur ou dans l'eau froide avant l'observation. Cette dernière méthode permet non seulement de faire le test sur les germes qui poussent lentement ou pas du tout à 20–22°C, mais évite également les résultats faussement positifs dus aux enzymes libérés lors de la mort des germes <sup>2</sup>. Si le milieu est incubé à une température plus élevée, il est nécessaire d'utiliser des tubes de contrôle non ensemencés pour étudier l'effet hydrolytique de la chaleur et d'autres facteurs. Le degré de liquéfaction est très variable ; ainsi, certains germes liquéfient la gélatine en moins de quelques jours alors que d'autres ne le font qu'en plusieurs semaines. Dans un but pratique, il est conseillé d'incuber au maximum 14 jours <sup>3,4</sup>.

#### **2.2.1.5 - La confirmation biochimique :**

##### ***Disques pour l'identification de l'oxydase***

C'est une présentation pratique et stable des réactifs oxydase pour la détection des bactéries oxydase positive. La cytochrome oxydase est produite par différents germes comme *Neisseria sp.* et *Pseudomonas sp.*. La recherche de l'oxydase est une réaction employée pour l'identification présomptive des cultures microbiennes. Les disques d'identification oxydase utilisent un réactif sec stabilisé qui est beaucoup plus pratique à utiliser.

Le disque est imprègne avec l'eau distillée et après la colonie est mis en contacte avec une extrémité du disque pour observer si un virage de coloration correspondant à la réaction (+) se produit.

Le test à l'oxydase est une procédure importante qui doit être réalisée pour toutes les bactéries Gram négatives à identifier. La réaction à l'oxydase, basée sur la capacité de certaines bactéries à produire du bleu d'indophénol à partir de l'oxydation du diméthyl-p-phénylènediamine et a-naphtol, a été établie par Gordon et McLeod <sup>1</sup> pour faciliter l'identification des gonocoques. Sa large utilisation a permis, selon la technique de Kovacs <sup>2</sup>, de distinguer les *Pseudomonas sp.* des entérobactéries

En cas de réaction positive, la cytochrome oxydase réagit avec l'oxalate de N,N-diméthyl-p-phénylènediamine et le  $\alpha$ -naphtol pour former du bleu d'indophénol.

Ils sont habituellement utilisés pour différencier *Neisseria sp.* (oxydase positive) des autres diplocoques Gram négatif, différencier les souches de *Pseudomonas sp.* (pigmentées et non-pigmentées) des entérobactéries.

##### ***Milieu de Kligler - Hajna***

Milieu d'identification des entérobactéries, basé sur une fermentation de deux sucres et sur la production d'hydrogène sulfuré.

Le milieu de Kligler basé sur la formule originale <sup>1,2,3</sup> associe les principes de Russel <sup>4</sup>, gélose à deux sucres, avec citrate ferrique comme indicateur qui détecte la production d'hydrogène sulfuré.

Ce milieu complexe permet de confirmer la fermentation du glucose (caractère d'identification de famille, avec ou sans production de gaz) et d'orienter l'identité du genre par l'étude de l'attaque du lactose et de la production de H<sub>2</sub>S. Ce milieu permet encore d'effectuer le test ONPG et de rechercher la LDC. Il est présenté en position inclinée avec un culot important de 3 cm environ.

Dans le culot (en anaérobiose relative), le glucose est toujours attaqué par voie fermentative

et bien qu'il soit en proportion faible, son attaque entraîne une acidification importante. Selon la voie de fermentation empruntée il y a ou non production de gaz (H<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>). Plus ou moins abondants, ces derniers peuvent entraîner seulement la formation de quelques bulles ou au contraire, créer une poche qui décolle complètement le milieu du fond du tube. Que le lactose soit ou non attaqué, l'acidification produite suffit toujours à faire virer au jaune l'indicateur de pH.

Sur la pente (en aérobiose), le glucose est attaqué surtout par voie oxydative. L'acidification produite sera donc faible, du fait que la quantité de glucose présente dans le milieu est faible. Si la bactérie ne peut que métaboliser la glucose (cas de microbes lactose-négatifs), la dégradation des acides aminés, très active en aérobiose et entraînant la formation des produits alcalins, va neutraliser la pente qui, après 24 heures d'incubation, apparaîtra rouge. Au contraire les bactéries lactose positif, oxydent et fermentant des quantités importantes de lactose présentes dans le milieu, acidifieront suffisamment pour que l'alcalinité due au métabolisme protéique n'interfère pas; en 24 h, la pente apparaîtra donc jaune (teinte du rouge de phénol à pH acide).

Par ailleurs, la réduction de thiosulfate en anaérobiose par certaines entérobactéries se traduira par la formation de sulfure de fer noir en présence du citrate ferrique.

Les peptones très dégradées entrant dans la composition de ce milieu sont riches en acides amides donc en lysine, d'où la possibilité de recherche de la lysine-décarboxylase. Le principe du milieu de Kligler est en réalité plus complexe car d'autres processus interfèrent, tant dans la mise en évidence de l'attaque des sucres que pour celle de la production de H<sub>2</sub>S (Marchal *et al.*, 1991).

Ce milieu donne trois résultats :

Tableau 15. Lecture des caractéristiques biochimiques sur milieu Kligler - Hajna

1 Utilisation du sucre	
(i) pente	(ii) culot
acidification: couleur jaune	acidification : couleur jaune
alcalisation:couleur rouge	alcalinisation: couleur rouge

### 2 . Production de gaz

Positif : bulles pouvant fragmenter la gélose.

Négatif : pas de production de gaz.

### 3 . Production d'H<sub>2</sub>S

Noircissement partiel ou total du culot.

Noter dans l'ordre, la réaction sur la pente, dans le culot, la production de gaz et celle d'H<sub>2</sub>S.

Fermentation du glucose : pente rouge et culot jaune.

Fermentation du glucose et du lactose : pente et culot jaunes.

Pas de fermentation du glucose ni du lactose : pente et culot rouges.

Lecture (après 17 à 24 heures à 37°C)

Du fait de la complexité et diversité des réactions biochimiques associées à ce milieu il faut prendre un soin particulier par rapport à la technique, c'est à dire avec le temps, les conditions et la température d'incubation et l'emploi de cultures bien purifiées, à même de distinguer les germes oxydatifs et fermentatifs qui poussent sur ce milieu.

Le test ONPG doit être systématiquement recherché chez toute souche lactose négative sur milieu de Kligler-Hajna .

Il faut faire attention aux souches apparemment H<sub>2</sub>S négatives , lorsque la forte acidification du milieu due à la fermentation du lactose entraîne la solubilisation du sulfure de fer, qui ne réapparaîtra avec sa coloration noire caractéristique qu'après alcalinisation du milieu (NaOH 4N) (Marchal *et al.*, 1991).

### **Recherche des enzymes ODC – LDC – ADH**

Il s'agit de détecter au sein d'une souche de *Salmonella* l'éventuel présence de ces trois enzymes, ornithine décarboxylase (ODC), lysine décarboxylase (LDC) et arginine dihydroxylase (ADH).

En présence de ODC, LDC, et ADH, la lysine, l'ornithine et l'arginine sont respectivement transformées en cadavérine, putrescine et citruline. Chaque tube de réaction contient l'acide aminé à tester, du glucose et du bromocrésol pourpre. En présence de salmonelles, le glucose est

métabolisé et il y a ainsi une acidification du milieu donc virage du violet au jaune. Si la salmonellaensemencée possède l'enzyme recherchée, il y aura transformation de l'acide aminé et alcalinisation du milieu, ce qui se traduit par un retour à la couleur violette ; une réaction positive se traduira par un virage au jaune puis un retour au violet (Coussens, 1987).

### **Disques ONPG**

Les entérobactérie acidifiant le lactose doivent posséder 2 enzymes :

Une B-galactoside perméase, nécessaire à la pénétration du lactose à l'intérieur de la bactérie ;

Une B- galactosidase, permettant de scinder la molécule de lactose

En l'absence de la première enzyme, une bactérie B-galactosidase (+) ne pourra exprimer son caractère lactose (+). Deux techniques ont été proposées pour la mise en évidence de la B-galactosidase : celle de Le Minor et Ben Hamida et celle de Lowe, qui utilisent comme substrat en milieu tamponnée, orthonitrophényl-bêta D-galactopiranoside ou ONPG. Les disques ONPG permettent d'effectuer aisément cette réaction (Le Minor *et al.* , 1986).

### **Milieu de Clark et Lubs**

Ce milieu au glucose-phosphate est recommandé pour les réactions au rouge de méthyle et de Voges - Proskauer afin d'identifier les Entérobactéries <sup>1</sup>.

Smith <sup>2</sup> a observé une plus faible production d'acides avec *Enterobacter aerogenes* qu'avec *Escherichia coli*. Clark et Lubs <sup>3</sup> ont utilisé le rouge de méthyle comme indicateur de la production d'acides dans le milieu. Ce test, connu maintenant sous le nom de réaction au rouge de méthyle, permet de différencier les germes produisant beaucoup d'acides à partir du glucose et entraînant une chute du pH en dessous de 4,4, de ceux qui ne font pas baisser le pH.

Le rouge de méthyle ajouté dans le milieu de culture permet de visualiser la différence de pH (milieu rouge à pH < 4,4 ; orange à pH 5,0-5,7 ; jaune à pH > 6,0).

Vaughn *et coll* <sup>4</sup> ont noté que des réactions VP peuvent être faussement positives si la lecture est faite plus d'une heure après l'addition des réactifs.

Chaque laboratoire doit standardiser la densité de l'inoculum, le volume de bouillon et la taille du flacon utilisés pour le test.

### **Réaction de Voges -Proskauer**

Tableau 16 Interprétation de réaction de Vosker - Proskaver

Couleur	Germe
Rouge (VP +)	<i>Enterobacter sp.</i> et autres
Pas de coloration (VP -)	<i>Salmonella sp.</i> , <i>E. coli</i> et autres

Source : Voges et Proskauer 1898

### **Test urée – indole**

Le milieu urée indole est un milieu synthétique dans lequel l'uréase, enzyme hydrolisant l'urée, à une activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation donnant la coloration rouge, suite à l'hydrolyse de l'urée et à la formation de carbonate d'ammonium : uréase (+) . Si le milieu demeure orange alors il n y a pas d'alcalinisation, le test est uréase (-).

Le test indole se prépare en utilisant la même suspension du test urée (-) indole à laquelle est ajouté le réactifs de Kovacs. Le dyméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge. La formation d'un anneau rouge est interprété comme indole (+) , alors que l'absence de l'anneau se traduit comme une réaction (-) .

### **Milieu au Citrate de Simmons**

La gélose citratée de Simmons est recommandée par Ewing et Edwards <sup>1</sup> pour différencier les entérobactéries d'après l'utilisation ou non du citrate comme seule source de carbone.

Ce milieu est en fait une forme solide du milieu au citrate de Koser qui, à l'origine, avait l'inconvénient de donner une fausse apparence de croissance avec un inoculum riche. L'addition de bleu de bromothymol dans le milieu l'a nettement amélioré.

L'utilisation du citrate entraîne une alcalinisation (+) avec un virage du milieu du vert au bleu

brillant. Dans le cas contraire, il n'y a pas de changement de couleur.

*Escherichia coli* (y compris les sérotypes responsables d'entérites infantiles), *Shigella sp.*, *Yersinia* et *Edwardsiella* ne poussent pas sur ce milieu. *Serratia*, la plupart des *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* et *Providentia*, (sauf *Morganella morganii* et *Klebsiella rhinoscleromatis*) utilisent le citrate et donnent une teinte bleue caractéristique<sup>2</sup>.

La gélose citratée de Simmons peut servir à différencier *Salmonella enteritidis* et les *Salmonella sp.* appartenant aux espèces II, III et IV qui sont citrate (+) de *Salmonella typhi*, *paratyphi A*, *pullorum* et *gallinarum* qui sont citrate (-).

Il est important de ne pas ajouter d'autres éléments nutritifs dans le milieu au citrate, ce qui entraînerait des réactions faussement positives.

### **Mannitol mobilité**

Ce milieu permet l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de dégradation du mannose. Il utilise le Rouge de phénol (indicateur de pH)

La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes. Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives



Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle : étude de la mobilité.

Les nitrates du milieu peuvent être réduits en nitrites puis en N<sub>2</sub> : test nitrate réductase.

Les nitrates inhibent l'hydrogène lyase, enzyme catalysant la production de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> à partir de l'acide méthanoïque (HCOOH). Dans le cas de bactéries mannitol +, le seul gaz produit est donc le CO<sub>2</sub>. Pour celles qui sont mannitol -, l'utilisation des peptones ne produit pas de gaz donc le CO<sub>2</sub> est alors sous forme d'hydrogénocarbonate, le milieu restant alcalin. L'apparition de bulles pour une bactérie mannitol - ne peut donc être due qu'à la respiration des nitrates et le gaz est alors de l'azote (N<sub>2</sub>). Une bactérie aérobic stricte pourra, si elle possède une nitrate réductase, se développer dans tout la masse du milieu

### **2.2.2 - L'échantillonnage des prélèvements**

L'échantillon est compris de 25 gr de peau de cou, lequel a été enlevé des carcasses à l'aide d'un gant stérile et d'une lame de rasoir stérile, et déposé dans un sac stérile (le même gant au verso) pour l'acheminement au laboratoire (norme ISO/FDIS 6579 :2001(F)).

### **2.2.3 - Conditionnement, conservation et acheminement**

Après le prélèvement, l'échantillon a été mis dans un sac plastique hermétique de 11 x 17 cm, jetable, stocke dans une glacière à + 4 °C en attendant que l'enquêteur finisse de faire fait les autres prélèvements correspondants à la demi journée d'échantillonnage sur terrain.

## **2.3 – Les analyses bactériologiques**

### **2.3.1 - Préparations / dilutions**

#### **2.3.1.1 – L'isolement**

Pour le pré-enrichissement a été utilisé le milieu *Eau peptonée tamponnée (bouillon)*, en versant 25 g de peau de cou sur un bouillon de 225 ml d'*eau peptonée tamponnée (bouillon)*, pour avoir une dilution 1/10. Ensuite, cette préparation a été incubée à l'étuve pendant 24 heures à 37 °C.

Pour l'enrichissement ont été utilisés les milieux *Muller Kauffman tétrathionate* avec novobiocine (*bouillon*) et le milieu *Rappaport Vassiliadis (bouillon)*. 1 ml de la préparation de pré - enrichissement (*eau peptonée tamponnée*) a été utilisé pour inoculer un bouillon en contenant 10 ml de milieu *Muller Kauffman tetrathionate*, et en même temps 0,1 ml de solution de pré-

enrichissement a été utilisé pour inoculer 10 ml d'un bouillon en contenant le milieu *Rappaport Vassiliadis*. Ces deux préparations ont été incubées à l'étuve pendant 24 h à 41 °C pour le milieu *Rappaport Vassiliadis* et 37 °C pour le milieu *Muller Kaufman tétrathionate*

Pour l'isolement ont été utilisés les milieux sélectifs *Gélose Xylose Lysine Décarboxylase (XLD)* et *Agar Gélose Salmonella – Shigella (SS)*. Une goutte de la préparation du milieu d'enrichissement a été utilisée pour ensemercer une boîte de Pétri contenant le milieu *XLD* et une autre goutte pour ensemercer la boîte contenant le milieu *SS*. Ces deux boîtes ont été incubées à l'étuve pendant 24 h à 37 °C (voir annexe nbre. 3)

### **2.3.1.2 - Identification et confirmation biochimique**

Une première phase d'identification a été faite au laboratoire de pathologie aviaire de la Maison du Petit Elevage. Cette première phase comprend le repiquage des colonies caractéristiques sur milieu *Gélose Nutritive*, et l'utilisation des tests de confirmation biochimiques par rapport à la norme *ISO/FDIS 6579 :2001(F)*. La continuation la procédure est expliquée de façon plus exhaustive:

### **2.3.1.3. - Choix et isolement des colonies pour la confirmation**

Pour la confirmation ont été prélevés à partir de chaque boîte de Pétri des milieux sélectifs, au moins une colonie considérée comme caractéristique ou suspecte, puis quatre autres colonies si la première s'est révélée négative.

Si se trouve une boîte avec moins de cinq colonies caractéristiques ou suspectes, toutes les colonies caractéristiques ou suspectes ont été retenues. Le numéro maximum de colonies à retenir est de cinq, même s'il y a beaucoup plus de colonies caractéristiques.

Ensemencer les colonies sélectionnées sur la surface de boîtes de *Gélose Nutritive*, préalablement séchées pour permettre le développement de colonies bien isolées. Incuber les boîtes ainsiensemencées pendant 24 heures à 37 °C.

Après, utiliser les cultures pures pour la confirmation biochimique et sérologique.

### **2.3.1.4 - Confirmation biochimique sur galerie classique**

#### ***Test de l'oxydase***

Déposer plusieurs disques préalablement trempés dans de l'eau distillée sur une couvercle de boîte de pétri.

Prélever les colonies à tester et les déposer sur les disques humides.

*Oxydase + : virage de la coloration en violet puis en noir*

*Oxydase - : pas de virage de la coloration*

#### ***Test Urée – Indole***

Ensemencer un tube contenant 1ml du milieu tryptone-tryptophane avec la colonie suspecte.

Incuber à 37°C pendant 24 h

*Si uréase + : virage du milieu au rouge violacé.*

*Si uréase - : pas de virage.*

Ajouter au milieu à l'urée quelques gouttes de réactif de Kovacs

*Si indole + : formation d'un anneau rouge en surface (réaction positive)*

*Si indole - : Anneau jaune brun (réaction négative).*

#### ***Vosges Proskaver***

Ensemencer 5 ml de milieu avec la souche à étudier

Incuber à 37°C pendant 47 h

Après 2 jours d'incubation,

Prendre 1ml de milieu, ajouter 0,6 ml de  $\alpha$ -naphtol à 6%(VP1), et 0,5 ml de solution de KOH (VP2).

*VP + : coloration rouge en surface pouvant diffuser dans le milieu*

*VP - : pas de coloration.*

## **ONPG**

Faire une suspension microbienne épaisse dans 0.5 ml d'eau distillée dans un tube à hémolyse

Mettre un disque d'ONPG dans le tube et le mettre à 37 °C pendant 15 à 30 min.

ONPG + : *coloration jaune.*

ONPG - : *pas de coloration.*

## **ADH – ODC – LDC**

Préparer une suspension microbienne épaisse en eau physiologique.

Ensemencer les trois tubes par la suspension (les tubes doivent être pleins).

NB : Bien fermer les tubes pour créer des conditions d'anaérobiose requises pour la recherche des décarboxylases.

*Virage acide (jaune) : Résultat négatif*

*Virage alcalin (violet) : Résultat positif*

## **Citrate de Simmons**

Ensemencer en zigzag sur la pente de la gélose en tube

Incuber à 37°C pendant 24 heures

*Citrate + : Virage au bleu du milieu*

*Citrate - : Pas de virage*

## **Kligler**

Ensemencer le milieu en pratiquant des stries sur la pente et par une piqûre en culot. Ne pas capuchonner de façon à permettre l'aération du milieu.

*Virage au jaune du culot uniquement: Glucose +*

*Virage au jaune de la pente : Lactose +*

*Apparition de bulles et /ou fragmentation du milieu : Gaz +*

*Noircissement au niveau de la zone culot pente : H<sub>2</sub>S +*

## **Mannitol – Mobilité**

Ensemencer par piqûre centrale jusqu'au fond du tube

Incuber à 37 °C pendant 24 heures.

*Virage au jaune du milieu : Mannitol +*

*Poussée uniquement le long de la strie d'ensemencement : Mobilité –*

*Poussée provoquant un trouble du milieu (strie d'ensemencement invisible) :*

*Mobilité +*

Remplir la fiche de traçabilité (voir annexe 1)

## **2.3.2 - Confirmation sérologique et serotypage**

La deuxième phase d'identification qui correspond au sérotypage a été faite par l'Institut Pasteur de Madagascar.

Cet phase a pour but de différencier les souches de microorganismes en fonction de leur composition antigénique (sérotipe et sérovar) grâce à une technique sérologique.

### **2.3.2.1 - Principe**

La recherche est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le microorganisme étudié. Cette réaction est visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène anticorps (Letonturier, 2001).

La recherche de la présence des antigènes « O », « Vi », ou « H » des *Salmonella* a été effectuée par une agglutination sur lame avec des sérums appropriés, à partir de colonies pures, et après élimination des souches auto-agglutinantes. L'utilisation des antisérums a été faite selon les indications du fabricant.

### **2.3.2.2 - Elimination de souches auto – agglutinantes**

Déposer sur une lame de verre parfaitement propre, une goutte de solution saline

A l'aide d'une anse boucle disperser dans cette goutte une fraction de la colonie à tester, de manière à obtenir une suspension homogène et trouble.

Faire osciller la lame pendant 30 à 60 secondes

Observer le résultat sur fond noir, de préférence à l'aide d'une loupe.

Si les bactéries se sont rassemblées en masse plus ou moins distinctes, la souche est considérée comme auto-agglutinable et ne doit pas être soumise aux essais suivants, la mise en évidence des antigènes étant rendue impossible.

### **2.3.2.3 - Mise en évidence des antigènes « O »**

A partir d'une colonie pure reconnue non auto-agglutinable, opérer comme dans la procédure antérieure, mais en utilisant une goutte de l'antisérum « O » au lieu de la solution saline.

S'il y a agglutination la réaction est considérée comme positive.

Utiliser les sérums poly et monovalents l'un après l'autre.

### **2.3.2.4 - Mise en évidence des antigènes « Vi »**

Opérer comme dans la procédure antérieure, mais en utilisant une goutte de l'antisérum sérum « Vi ».

S'il y a une agglutination la réaction est considérée comme positive

### **2.3.2.5 - Mise en évidence des antigènes « H »**

Ensemencer la gélose nutritive semi-solide avec une colonie pure non auto-agglutinable.

Incuber à 37°C durant 24 heures

Utiliser cette culture pour l'examen des antigènes « H » de la même manière que dans la procédure antérieure, mais en utilisant une goutte de l'antisérum « H »

S'il y a agglutination la réaction est considérée comme positive (norme *ISO/FDIS 6579 :2001(F)* ; norme AFNOR : NF V08-052).

### **2.3.3 - Traçabilité dans le laboratoire d'isolement et confirmation biochimique**

La traçabilité des échantillons pendant l'analyse bactériologique a été assurée par la mise en place d'une fiche de traçabilité dans laquelle ont été enregistrées toutes les manipulations des échantillons et la provenance des souches isolées et soumises à la confirmation biochimique. Cette démarche a permis d'assigner un numéro d'identification unique à chaque souche. Cette fiche est illustrée dans les annexes (voir annexe 1)

### **2.3.4 - Le stockage et traitement des données**

Les données obtenues à partir de l'enquête sur terrain ont été regroupées sur tableaux Microsoft ACCESS et Epi Info 3.2.2, les données des analyses bactériologiques ont été regroupées en tableaux Microsoft ACCESS. Ces données seront soumises aux analyses statistiques en vue de obtenir une moyenne pondérée en donnant l'importance à chaque vendeur selon ses ventes.



## Chapitre III. Résultats et discussion

### 3.1 – Résultats

#### 3.1.1 - Résultats provisoires de recherche de *Salmonella* avec la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F)

Tableau 17. Résultat des recherches de *Salmonella* du 19/07/2004 à 19/08/04 avec la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F)

	quantité	(%)
Nbre. de prélèvements	105	(100)
Nbre. de cultures +	81	(77)
Nbre. de colonies (souches) prélevées pour confirmation biochimique	81	(77)
Nbre. de cultures caractéristiques confirmées pour tests biochimiques	2	(0,01)

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

Tableau 18 Résultat des isollements dans la recherche de *Salmonella* sur les deux milieux de culture pour l'isolement dans la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F)

	quantité	(%)
Nbre. de cultures caractéristiques <sup>(1)</sup>	81	(100)
Nbre. de cultures caractéristiques sur milieu XLD	65	(80)
Nbre. de cultures caractéristiques sur milieu SS	72	(88)
Ecart	7	(8)

(1) le terme cultures caractéristiques fait référence aux boîtes de Pétri ensemencées présentant 1 ou plus colonies caractéristiques de *Salmonella*

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

Tableau 19. Résultat des tests de confirmation biochimique dans la technique ISO/FDIS 6579 :2001(F)

	quantité	(%)
Nbre. de souches testées	81	(100)
Nbre. de souches confirmées pour test biochimiques	2	(2)

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

Tableau 20. Relève des tests de confirmation biochimique pour la recherche des souches présumés de *Salmonella*

	Quantité	(%)
Ne. de souches testées	226	100
Ne. de souches compatibles avec <i>Salmonella</i>	71	3,18

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

#### 3.1.2- Espèces et sérotypes trouvées

Les analyses faites les premières deux semaines de travail ont donné que 2 souches de *Salmonella*, la sérologie qui a été fait à l'IPM a donné comme résultat l'identification d'une souche *Salmonella arizonae*, à partir d'un échantillon prélevé le 28 juillet 2004 au marché d'Isotry.

#### 3.1.3 - Limitations du protocole initial

Au niveau de l'enrichissement le milieu de culture MKTn a présenté un faible spécificité et sélectivité, en donnant des plaques d'isolement avec un fort envahissement de colonies caractéristiques de *Proteus* et *E. coli*. dont la lecture a été difficile et il fallait purifier plusieurs fois les colonies pour obtenir des souches stables à la biochimie .

La technique *ISO/FDIS 6579 :2001(F)* semblait ne être pas assez sensible ou adaptée à nos conditions de travail du fait que les échantillons de poulets obtenus étaient très contaminés et que l'invasion par autres bactéries au niveau des analyses était en train de gêner fortement l'analyse.

Au niveau de la deuxième semaine d'échantillonnage sur terrain, il y a eu des problèmes logistiques par rapport à l'heure d'arrivée des échantillons au laboratoire, ce qui demandait parfois de rester jusqu'à 19 heures pour lancer la technique d'analyse.

### **3.1.3 - Adaptation du protocole aux conditions d'expérimentation**

Après d'une réunion avec le personnel du laboratoire a été décidé de modifier la technique d'analyses et d'incorporer à partir de la troisième semaine le milieu bouillon Sélénite Cystine au niveau de l'enrichissement car il présente une plus haute sélectivité et capacité d'atténuer la croissance des entérobactéries <sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9,10</sup>, (AFNOR : NF V08-052), et aussi avoir une augmentation de la sensibilité de la technique car les résultats obtenus jusqu'à la deuxième semaine ne se correspondaient pas avec la littérature existant qui parle sur l'Afrique (Cardinale, 2003). Au niveau de l'isolement des bactéries a été pris la décision d'incorporer les milieux Agar Hecktoen <sup>1,2,3,4</sup> et Brillant Green Agar « BGA » (norme *ISO/FDIS 6579 :2001(F)*) pour avoir une augmentation de la sensibilité de la technique au niveau d'isolement et en correspondance avec la normative qui permet d'avoir une technique alternative si le laboratoire le considère nécessaire.

Au niveau de l'isolement a été pris la décision d'incorporer un deuxième repiquage sur le milieu d'isolement correspondant pour purifier les colonies caractéristiques obtenues dans le premier isolement et avoir des boîtes purifiées car il y avait le problème de la faible sélectivité du milieu de culture MKTn au niveau de l'enrichissement, ce qui donnait des boîtes de Pétri avec une grande variété des colonies, donc il fallait repiquer pour purifier les colonies et obtenir un renforcement des caractéristiques d'identification coloniale.

Après la purification des colonies sur les géloses sélectives, a été incorporé un testage à l'oxydase et à l'urée - indole pour contrôler la stabilité des souches isolées. Finalement après cette procédure on a lancé la confirmation biochimique par rapport à la norme *ISO/FDIS 6579 :2001(F)*. La technique finale, laquelle on appellera en désormais technique définitive, a été schématisée dans l'annexe 4.

Pour gérer le problème logistique sur l'heure d'arrivée des échantillons au laboratoire a été lancé un test pratique de diagnostic en faisant des doubles analyses sur les mêmes prélèvements sur 10 échantillons, en ayant comme but d'identifier la différence du stockage des échantillons à + 4 °C jusqu'à la journée suivante, ce qui a donné comme résultat une inhibition des bactéries du type urée (-) donc toutes les analyses lancées le jour suivant ont donné des colonies urée (+) en présentant une différence absolue avec les échantillons analysés tout de suite. D'après ces résultats a été décidé de préparer les échantillons et lancer l'analyse immédiatement après de l'arrivée des échantillons au laboratoire, et même s'il fallait travailler temps additionnel à l'horaire d'engagement du personnel.

### **3.1.5- Démarche qualité incorporée au laboratoire**

La situation décrite en avant a demandé aussi l'incorporation d'une démarche qualité au niveau du laboratoire car il fallait faire le maximum des compétences du personnel disponible dans les heures de travail normales et aussi de gérer les possibles points critiques au niveau de préparation de milieu de cultures et de la stabilité des conditions d'analyse dans le laboratoire. Les suivantes mesures ont été prises comme démarche de qualité :

Comme première mesure a été décidé de réaménager le laboratoire en incorporant deux nouvelles ambiances qui n'avaient pas été utilisées en avant, donc qu'a été désignée une ambiance exclusive pour faire la pathologie aviaire et le lavage physique, une autre ambiance pour la stérilisation du matériel et la préparation du milieu de culture (nouveau) et une dernière ambiance pour faire la bactériologie et stocker les milieux préparés, toute cette démarche en cherchant la

mieux stérilité possible dans la salle de bactériologie. Le bureau du laboratoire et le stockage de matériel jetable a été déménagé dans un bâtiment à côté du laboratoire (voir annexe 5).

Par rapport au contrôle de température sur les étuves on a décidé de mettre de thermomètres dans chaque étuve pour être sûr de la stabilité des températures d'incubation et en même temps a été incorporé une autre étuve, donc qu'on a utilisé trois étuves pour avoir l'avantage de stériliser les étuves à chaque semaine en profitant des jours avec une baisse quantité de prélèvements.

La technique d'autoclave avec laquelle on a travaillé est 90 ° C pendant 30 min, toujours précédé d'un premier lavage physique avec savon et un deuxième lavage physique avec l'eau de javel. Désormais la procédure de lavage et stérilisation a été faite en équipe pour avoir une personne pour manipulation pour empêcher le possible contamination croisée du matériel de travail.

Par évaluer la qualité de la préparation des milieux de culture, les étapes dans la préparation ont été les suivantes :

1. pesage des milieux de base ;
2. dilution, stérilisation en fonction du type de milieu ;
3. Contrôle du pH ;
4. Distribution ;
5. Contrôle de stérilité du lot à l'étuve à 37 °C pendant 24 h ;
6. Enregistrement des préparations de milieu de culture et identification avec un N° de préparation pour les distinguer dans le lieu de stockage (voir tableau 21) ;
7. Identification ;
8. Stockage ;
9. Incorporation des témoins au moment de l'analyse.

Tableau 21. Cahier d'enregistrement de préparation des milieux de culture

Nbre. d'ordre	Date /heure	Milieu	Marque	Référence	Lote	Composition	Boite ou tubes préparés

Source ; laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

### 3.1.6 - Résultats définitifs

Tableau 22. Résultat des analyses de recherche de *Salmonella* faite avec la technique définitive

	Quantité	(%)
Nbre. d'échantillons analyses	362	(100)
Nbre. d'analyse positifs	50	(14)

Source : ENVA

Tableau 23. Résultat des analyses pour la recherche de *Salmonella* sur les carcasses de poulet de chair effectuées avec la technique définitive

	Quantité	(%)
Nbre. de échantillons	362	(100)
Nbre. de cultures +	235	(64)
Nbre. de colonies (souches) soumis à tests biochimiques	145	(61)
Nbre. de souches confirmées pour tests biochimiques	71	(30)

Source : laboratoire de pathologie aviaire de la MPE

Figure 4. Incidence absolue de *Salmonella* pendant l'étude

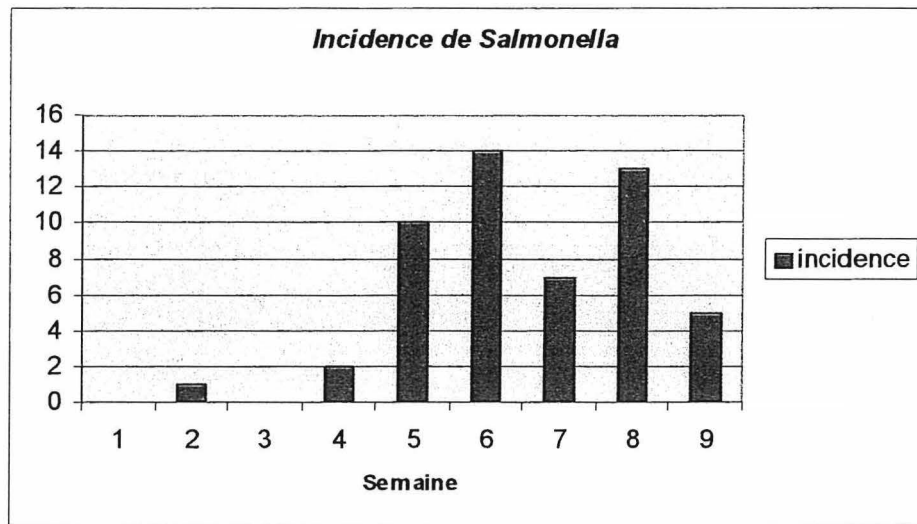


Figure 5. Taux d'incidence de *Salmonella* pendant l'étude

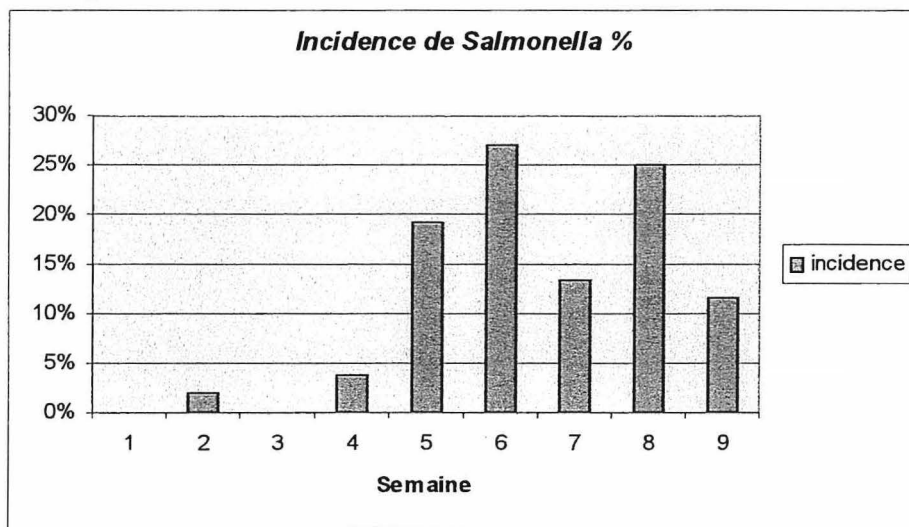
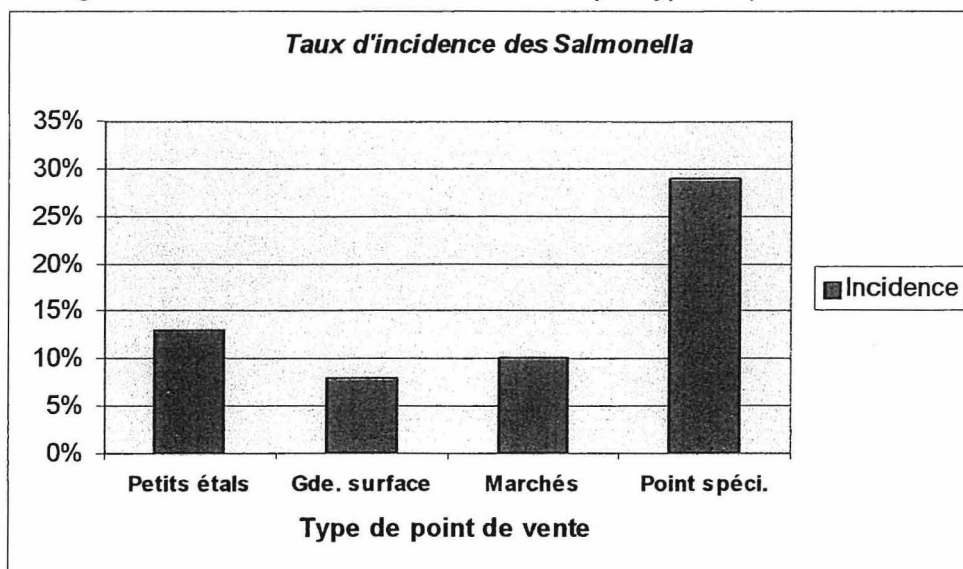


Figure 6. Taux d'incidence de salmonella par type de point de vente

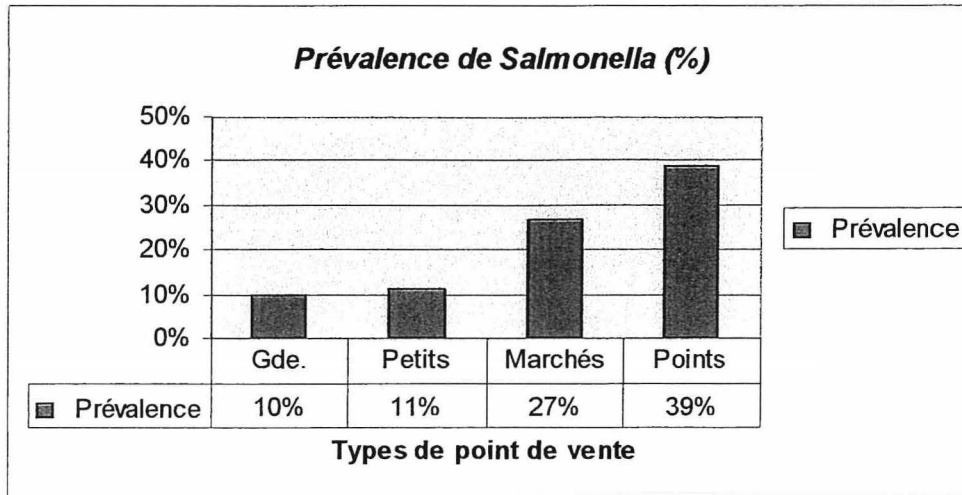


Le strate avec la plus forte incidence a été les « points spécialises ». L'abattage industriel dans cette catégorie pourrait expliquer cette haute incidence pour contamination croisée du produit

pendant le processus industriel, ce qui est toutefois à tester. Une tableau avec l'information plus détaillée est disponible dans l'annexe 6.

Les résultats absolues des analyses ont été soumis aux tests statistiques de pondération, dans le but donner un poids à chaque groupe par rapport aux volumes commercialisés. Les résultats sont exprimés dans les suivants figures :

Figure 7. Prévalence de *Salmonella* par type de point de vente



Après la procédure statistique, le groupe « points spécialise » à resté le plus contaminé, les groupes « grandes surfaces » et « marchés » ont monté quelques points, les « petits étals » ont diminué du fait des faibles volumes commercialisés.

La figure suivante décrit la procédure de pondération, ainsi comme le calcul de l'intervalle de confiance du résultat. La donnée clé utilisé pour faire cette pondération a été la moyenne des ventes de chaque groupe. La prévalence trouvé a été de 20 % +/- 3,8 ( $\alpha=0,05$ ).

Figure 8. Procédure de pondération des résultats des analyses

Groupe	Moyenne	F. pondération	Prévalence	Prév. Pondere
Grandes surfaces	76.08	0.43591	0.10	0.04359
Petits étals	25.37	0.14533	0.11	0.01599
Marchés	33.49	0.19187	0.27	0.05180
Points spécial.	39.60	0.22689	0.39	0.08849
	174.54	1		
			<b>Total prév.</b>	<b>0.19987</b>
			<b>Prévalence (%)</b>	<b>20%</b>

$\alpha=0,05$   
Source: propre

Figure 9. Calcul de l'intervalle de confiance du résultat

	PE	GS	MA	PS	Total
Analyses	54	242	108	63	467
Prévalence	11%	10%	27%	39%	
Moyenne	25.37	76.08	33.49	39.6	174.54
Poids	0.14535	0.43589	0.19188	0.22688	1
poids 2	0.02113	0.19000	0.03682	0.05148	
Variance	0.00181	0.00037	0.00183	0.00378	
<b>Prévalence total</b>	<b>20%</b>				
<b>Var. totale</b>	<b>0.000370535</b>				
<b>B. inférieur</b>	<b>16.2%</b>				
<b>B. supérieur</b>	<b>23.8%</b>				

$\alpha=0,05$

Tableau 24. Resultat du sérotypage des *Salmonella sp.* faits à l'Institut Pasteur de Madagascar

	Quantité	(%)
Nbre. de souches reçues pour sérotypage	71	(100)
Nbre. de souches soumis au sérotypage	41	(57)
Nbre. de souches positives à <i>Salmonella</i>	39	(54)

Source : Institut Pasteur de Madagascar

Le laboratoire s'est trompé avec l'identification de deux souches qui ont été envoies par erreur à l'IPM. A la fin les souches soumises à sérotypage ont été 39.

Tableau 25. Sérotypes trouvés sur les souches de *Salmonella*

	Quantité	(%)
<i>Salmonella sp.</i>	39	(100)
<i>Salmonella enteritidis</i>	29	(73)
<i>Salmonella give</i>	8	(21)
<i>Salmonella arizonae</i>	1	(3)
<i>Salmonella glostrup</i>	1	(3)

Source : Institut Pasteur de Madagascar

La présence des sérotypes *S. give*, *S. glostrup* et *S. arizonae* a été toutefois inattendue et reste à rapporter. D'après les analyses a été observé que les échantillons prélevés chez les grandes surfaces avaient une dominance des bactéries physiquement compatibles avec *Salmonella* mais après écartes pour soit Urée (+) à la biochimique, cette observation a été correspondant avec des résultats des analyses dont les échantillons arrivaient plutôt au laboratoire, en conclusion la réfrigération chez les grandes surfaces et pendant la permanence sur le terrain a inhibé la croissance des *Salmonella*.

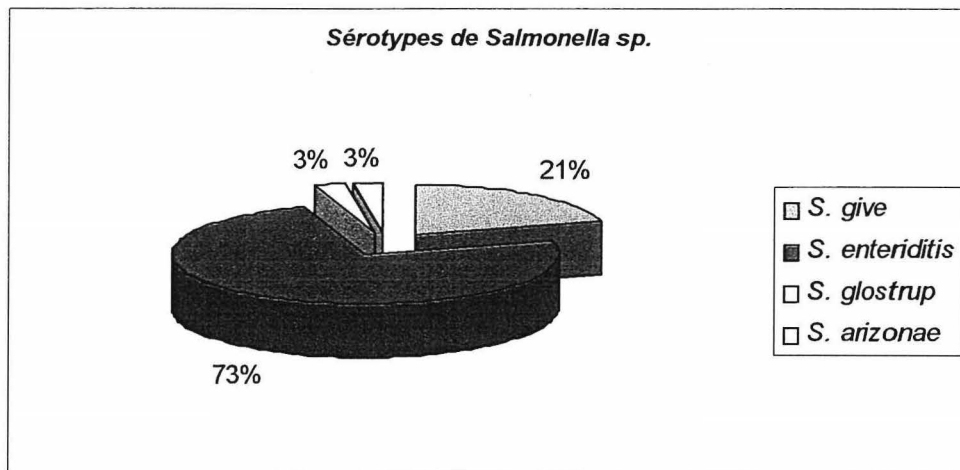


Figure 10. Sérotypes de *Salmonella* isolées

Pendant les analyses a été observé que la pousse des colonies caractéristiques sur XLD, était correspondant sur le milieu Hecktoen, mais la réciprocity inverse n'existait pas, en correspondance avec l'hypothèse de la plus haute sensibilité du milieu Hecktoen pour l'isolement des *Salmonella* (Taylor et Schelhaut, 1971; Hoben *et al.*, 1973).

Les enquêtes sur terrain ont aussi révélé les multiples difficultés qui ont les petits vendeurs (petits étals et marchés en ville) pour consolider ses activités du fait de sa situation juridique irrégulière avant les autorités, ce qui empêche de planifier des améliorations de façon responsable, et la présence des périodes d'absence de poulets sur le marché empêchant de faire son activité commerciale de manière continue et stable.

## 3.2 - Discussion

Ces recherches ont donné comme résultat l'identification de *Salmonella* sur le territoire malgache en correspondance avec des observations de Brisabois *et al.*, 1995 et en contradiction avec la législation valable du pays. Les *Salmonella* ont été déjà identifiées sur l'ensemble de l'Afrique, à l'Angola (Savon, 1984), Soudan (Yagoub et Mohamed, 1987), Ethiopie (Teshome et Mebratu, 1984) Sénégal (Doutre *et al.*, 1979) Tchad (Chamoiseau et Vigier, 1972), Zaire (Mafama *et al.*, 1982) sur la viande de volaille, avec prédominance des sérovars *Enteritidis* et *Typhimurium*. La majorité des auteurs attribuent cette dispersion de la bactérie à l'importation des produits et d'œufs par les entreprises avicoles sans contrôle efficace des autorités sanitaires ainsi qu'à l'utilisation des antibiotiques dans l'élevage qui donne des phénomènes de résistance bactérienne.

L'index de prévalence de *Salmonella sp.* trouvé pendant l'étude est 20 % +/- 3,8 ( $\alpha=0,05$ ), en correspondance aux observations de Brisabois *et al.*, (1995), qui avaient rapporté la présence de la bactérie dans le territoire malgache. Cette observation donne un élément important qui peut être utilisé a posteriori pour estimer de façon plus objective le risque associé à la présence de la bactérie sur la viande. Les 50 analyses positives ont donné 69 souches à sérotyper car parfois un même échantillon donnait des souches optiquement différentes du fait d'avoir une technique bactériologique très sensible qui donnait la possibilité d'isoler deux serotypes d'un même échantillon, ce qui effectivement est arrivé sur un échantillon.

Ce 20 % des résultats positifs ont été partiellement soumis au sérotypage (39/69 souches), en donnant comme résultat une présence du serovar *Salmonella arizonae* de (3 %), *Salmonella glostrup* (3 %), *Salmonella give* (21 %) et la prédominance du serovar *Salmonella enteritidis* (73 %) des sérotypages pratiqués.

La présence des serotypes *S. arizonae*, *S. give* et *S. glostrup* a été inattendue et reste à rapporter. La présence de *S. give* représente une donnée d'importance en élevage avicole du fait de son rôle comme cause de pertes de production (Soldati *et al.*, 1997). Cette présence de *Salmonella* dans la filière avicole pourrait être un facteur d'importance dans les élevages malgaches en tant que cause des pertes de production. Son mécanisme de transmission verticale permet proposer que cette contamination a l'origine en amont dans la filière.

Par rapport aux techniques bactériologiques, l'incorporation des nouveaux éléments dans la technique d'isolement a donné résultat positifs en augmentant l'effectivité de la technique. Le bouillon Sélénite Cystine et Rappaport Vassiliadis ont montré une bonne performance sur l'enrichissement, très supérieure au bouillon *Muller Kauffmann tétrathionate novobiocine* qui a présenté des problèmes de sélectivité et peu performance en contradiction avec des études faits en Europe (Edel et Kapelmacher, 1969).

## 3.3 - Recommandations

### 3.3.1 - Mesures proposes pour maîtriser le risque

Actuellement à Madagascar, la situation sanitaire de la filière avicole est un thème complexe et bien installé sur l'opinion publique du fait de la croissance qui a enregistré la filière avicole dans les dernières années comme source de revenus pour les paysans sur un schéma d'élevage périurbain semi-intensive laquelle est maintenant menacé à l'émergence de nombreuses pathologies au niveau de l'élevage (maladie de Marek, maladie de Gumboro, maladie de Newcastle, suspicions de leucoses aviaire) qui sont en train de produire sévères ravages. Cette situation a produit un contexte favorable a cette étude qui a été exprime par la réceptivité des opérateurs à collaborer à notre enquête.

La présence de *Salmonella* sur les carcasses de poulet de chair est une conséquence de la transmission verticale après l'élevage et au long de la filière, principalement dans la chaîne de commercialisation où le produit est susceptible de avoir une contamination croisée pendant les manipulations auxquelles est soumise la carcasse avant d'avoir des produits prêts à la consommation qui représente un risque réel de TIAC pour les consommateurs (Mossel, 1982 ; Kapelmacher, 1983 ; Genigeorgis, 1986 ; Humbert et Salvat 1987 ; Cardinale 2003).

Ces recherches ont conduit à établir une prévalence de *Salmonella sp.* de 20% sur le produit au niveau du consommateur, donc la présence du risque a été confirmée et demandera la mise en place d'une démarche de qualité pour garantir la salubrité des produits à base de poulet de chair qui sont mis à disposition des consommateurs. Cette démarche fait appel à une étude plus exhaustive et sur l'ensemble de la filière car la bactérie a été trouvée dans tous les groupes enquêtés en même temps qu'il y a des opérateurs qui ont mis en place des cahiers de charges strictes pour gérer ce risque, situation qui permet de conclure que le problème vient d'amont dans la filière. Une analyse des risques en tenant comme objectif déterminer avec précision les points critiques, l'efficacité des mesures appliquées actuellement et les mesures applicables dans le contexte de Madagascar pour maîtriser ce risque.

### **3.3.2 - Limites des mesures proposées**

La mise en place d'une étude exhaustive et la conséquente adoption de mesures pour initier une démarche de qualité sur la filière poulet de chair demandera toutefois l'emploi des ressources humaines, logistiques et économiques, lesquels l'Etat malgache n'est pas en condition de financer. Donc que l'initiative doit venir obligatoirement de l'ensemble des opérateurs, situation qui demandera finalement un incrément du coût du produit pour les consommateurs déjà avec un très faible pouvoir d'achat. Les ONG et autres bailleurs de fonds doivent participer à la sensibilisation des consommateurs pour exiger et rémunérer la qualité, à la formation des vendeurs sur l'hygiène alimentaire et à l'appui technique et économique nécessaire pour continuer les recherches qui ont été déjà démarrées pour arriver à construire une filière avicole performante en quantité et qualité.

### **3.3.3 - Conséquences de l'étude**

Cette étude a servi à mettre au courant plusieurs des opérateurs de la filière de l'existence du problème *Salmonella* à Madagascar, et à faire un point de départ sur l'évaluation de la qualité sanitaire des produits mis à disposition des consommateurs commun malgache. La majorité des vendeurs participant à l'enquête ont été informés des résultats, en même temps qu'il est remarquable la disposition à participer et profiter d'une amélioration des conditions sanitaires des points de vente et de la qualité des produits chez les vendeurs.



## Conclusion

L'élevage avicole à Madagascar est en constante croissance sur les diverses formes auxquelles est pratiqué. Le soutien de cette croissance est la localisation autour des grandes villes au centre du pays qui expérimentent une augmentation démographique considérable. Cette croissance des villes est à maîtriser en vue de garantir un minimum de conditions de bien être et salubrité de la population.

La production et la commercialisation des aliments dont la maîtrise de la qualité est garantie de la santé publique a été abordé en vue de déterminer la qualité sanitaire par rapport au risque *Salmonella* des poulets de chair proposés à la vente à Antananarivo.

Ces recherches ont conduit à confirmer la présence de *Salmonella sp.* sur le territoire malgache et plus spécifiquement sur la viande de volaille prête à la consommation. L'étude a permis d'avoir une estimation du risque, en donnant une index de prévalence de *Salmonella sp.* sur les carcasses de poulet de chair de 20 % +/- 3,8 ( $\alpha=0,05$ ), distribué dans toutes les groupes étudiés.

Le sérotypage partiel des souches isolées a mis en évidence la présence de quatre sérovars : *Salmonella enteritidis*, *Salmonella give*, *Salmonella glostrup* et *Salmonella arizonae*. Le sérovar prédominant est *Salmonella enteritidis* (73 %) suivi par *Salmonella give* (21 %), *Salmonella arizonae* (3 %) et *Salmonella glostrup* (3 %) des souches sérotypés.

Ces résultats font appel à la prise en compte de manière responsable la maîtrise de ce risque, en visant à mettre en place une étude sur les acteurs en amont et en aval, qui détermine les points critiques à gérer, et ainsi continuer la démarche de qualité dans la filière dont le point de partie a été représenté par cette étude.

La réussite de toute initiative passera toujours pour la planification au long terme, avec une pensée prospective et visionnaire en promouvant la participation et regroupement volontaire des acteurs locaux et l'implémentation des mesures de contrôle qui soient soutenables et gérables pour les malgaches. Dans ce contexte, l'appui technique devra être apporté pour le gouvernement et les ONG. La maîtrise de la qualité donnera confiance aux consommateurs et investisseurs. Celui-ci favorisera la croissance soutenue d'une filière dans laquelle les acteurs ont déjà montré la réceptivité et la disposition à participer pendant la réalisation de cette enquête. Il reste à continuer à travailler pour faire devenir la motivation et la volonté en progrès pour ce beau pays.

## Bibliographie

BENET B., WOODS T., LIYANAGE W. M., SMITH D., 1991. *A simplified general method for cluster-sample surveys of health in developing countries*. World health statistic Journal. 8 p.

BERAUD C. et al., 1990. *Etude étiologique des diarrhées menée de novembre 1988 à octobre 1989*. Arch. Inst. Past. Mad, 1990,57,1

BRISABOIS A, FREMY S., MOURY F., OUDART C., PIQUET C., PIRES GOMES C., 1995. *Inventaire des Salmonella 1994 – 1995*. CNEVA. Paris. 75 p.

BURGEROIS C. M., MESCLE J.F., ZUCCA J., 1988. *Microbiologie alimentaire*. Tome I. Dans chapitre III par J. GLEDEL « Les intoxications et toxi-infection ». Ed. Lavoisier Paris. p. 51-64

CARDINALE, 2003. *Prevalence of Salmonella and Campylobacter in Retail Chicken Carcasses in Senegal*. Revue Elevage et Méd. Vét. Pays Trop. 56, (1-2) : 13-16

CHAMIOSEAU G. et VIGIER M., 1972. *Enquête épidémiologique sur les Salmonellas au Tchad*. Rapport N° 116. XL<sup>ème</sup> session générale du comité de l'OIE. Paris 15 – 20 Mai 1972.

COUSSENS F., 1987. *Essai d'innocuité d'un vaccin vivant de virulence atténuée contre la salmonellose abortive ovine*. Thèse de doctorat. ENVN. p. 84

DOUTRE et al., 1979. *Les Salmonelloses animales au Sénégal*. Société française de microbiologie - ISRA. Colloque de Dakar, 18 – 21 février 1980.

ELLIOT R.P., CLARK D.S., LEWIS R.H., LUNDBECK H., OLSON J.C. Jr., SIMONSEN B., 1988. *Micro-organismes in foods I. 2eme édition*. Dans Chapitre I "Significance of microorganismes and their toxins in foods". Ed. ICMSF. Université de Toronto. Toronto. p. 15 - 20

GENIGEORGIS C., 1986. *Problems associated with perishable processed meats*. Rev. Food Technology, Avril. p. 140 – 154

GLEDEL J., 1985. *Rôle des réservoirs et de l'environnement dans la Salmonellose bovine*. Rev. Epidémiologie et Santé Animale, 7. p. 39 – 70

HELMUTH R., STEPHAN R., BUNGE C., HOOG B., STEINBECK A., BULLING E., 1985. *Epidemiology of virulence associated plasmides and outer membrane protein patterns within seven common Salmonella serotypes*. Rev. Infection and Immunity, 48, 1. p. 175 – 182

HOBEN D.A., ASHTON D.H.A. et PETERSON A.C., 1973. *Applied Microbiology*. 21, 126-129.

HUMBERT F. et SALVAT G., 1987. *Risques de transmission des Salmonelles en aviculture. Détection et prévention en Europe*. Revue. Sci. Tech. OIE 16 (1) 83-90

KAMPELMACHER E. H., 1983. *Salmonelloses as a cause of food poisoning; methods of prevention aimed at reducing the incidence of Salmonellae and standards for harmonisation of detection methods*. 51<sup>ème</sup> session générale de l'OIE. Paris 23 – 29 mai 1983.

LE MINOR L., LE MINOR S., GRIMONT P.A.D., 1985. *Rapport quadriennal du centre National des Salmonella sur l'origine et la répartition des serotypes des souches isolées en France continentale au cours des années 1980 à 1983*. Rev. d'épidémiologie et santé publique, 33. p. 13 – 21

LE MINOR L., VERON M., 1989. *Bactériologie médicale. 2eme édition*. Dans chapitre XVII « Entérobactéries ». Ed. Médecine - Sciences Flammarion. Paris. p. 389 – 427

LETONTURIER P., 2001. *Immunologie générale. 7ème édition*. Chapitre IX. « Mise en évidence des témoins des réactions immunitaires. Edit. Masson. Paris. p. 110 – 152

MAFAMA N.N., MANYA T., KALOMBO M., 1982. *Epidémiologie des salmonelloses chez quelques espèces animales au Zaïre*. Revue Elev. méd. vet. Pays trop. 1982 35 (2) : 221 – 224

MAMOUN et al., 1992. *Salmonella enteritidis infection in the Sudan*. Revue Elevage et méd. vét. Pays trop. 1992 45 (2) : 137 – 138

MARCHAL N., BOURDON J.L. RICHARD C., 1991. *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Edit. Doin éditeurs. Paris. p. 226 – 285

MOSSEL D. A. A., 1982. *Microbiology of foods*. The University of UTRECH. 188 p.  
NICOLAS J.A., VIDAUD N., CORNUEJOLS M.J., REGNIER C., FERIAI M.L., 1986. *Toxi-infection alimentaire à S. goldscoast*. Enquête épidémiologique. Rec. Médecine Vétérinaire. 162, 2. p. 125 – 128.

POPOFF M.Y., MIRAS I., COYNAULT C., LASSELIN C., PARDON P., 1984. *Molecular relationship between virulence plasmid of Salmonella serotypes Thiphymurium and Dublin and large plasmid of other Salmonella serotypes*. Annuaire de Microbiologie. Inst. Pasteur, 135A. p. 389 – 398

SARRUDIN F.H. et MASSON I., 1969. *Hemagglutinating and hydrophobic surface properties of Salmonellae producing enterotoxin neutralized by cholera antitoxin*. Veterinary Microbiology 17, 4, p. 533-539

SAVON D., 1984. *Souches de Salmonella et Escherichia coli chez quelques animales et chez l'homme en Angola*. Revue Elevage et Méd. Vét. Pays Trop. 1984, 37 (2) : 129 – 132

SOLDATI G., GELMINI L., PONGOLINI S. - *Sierotipi di salmonelle isolati presso la Sezione Zooprofilattica di Modena nell'ultimo triennio*. Il Progresso Veterinario, 23, 833-835, 1997.

TAYLOR W.I. et SCHELHAUT D., 1971. *Applied Microbiology*, 21, 32-37.

TESHOME M. et MEBRATU G. Y., 1984. *A study of the dissemination and age difference of chicks in susceptibility to Salmonella pullorum*. Rapport. National Veterinary Institute, 13 p.

YAGOUB I.A. et MOHAMED T.E., 1987. *Isolation and identification of Salmonella from chickens in Khartoum province of the Sudan*. British Vet. Journal 1987. 143 : 537 – 540.

### Bibliographie concernant les milieux de culture utilisés

#### *Bouillon Eau peptonée tamponnée*

1. Edel W. et Kampelmacher E.H. (1973), Bull. Wld. Hlth. Org., 48, 167-174.
2. Pietzsch O., Kretschmer F.J. et Bulling E. (1975), Zbl. Bakt. Abt. I. Orig., 232, 232-246.
3. Sadvski A.Y. (1977), J. Fd. Technol., 12, 85-91.
4. Angelotti R. (1963), "Microbiological Quality of Foods" Academic Press, New York, p. 149.
5. American Public Health Association (1976), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA Inc. Washington DC.
6. Van Schothorst M. et Renaud A.M. (1985), J. Appl. Bact., 59, 223-230.

#### *Bouillon de Muller - Kauffmann tetrathionate*

1. Muller L. (1923), C.R. Soc. Biol. (Paris), 89, 434-443.
2. Kauffmann F. (1930) Z. f. Hyg., 113, 148-157.
3. Kauffmann F. (1935) Z. f. Hyg., 117, 26-32.
4. Jeffries L. (1959) J. Clin. Path., 12, 568-570.

5. Edel W. et Kampelmacher E.H. (1969), Bull. Wld. Hlth. Org., 41, 297-306.

### ***Bouillon de Rappaport - Vassiliadis***

1. van Schothorst M. et Renaud A.M. (1983), J. Appl. Bact., 54, 209-215.
2. Rappaport F., Konforti N. et Navon B. (1956), J. Clin. Path., 9, 261-266.
3. Vassiliadis P., Pateraki E., Papaiconomou N., Papadakis J.A. et Trichopoulos D. (1976a), Annales de Microbiologie (Institut Pasteur), 127B, 195-200.
4. Vassiliadis P., Trichopoulos D., Kalapothaki V. et Serie C. (1981), J. Hyg. Camb., 87, 35-39.
5. Harvey R.W.S., Price T.H. et Xirouchaki E. (1979), J. Hyg. Camb., 82, 451-460.
6. Vassiliadis P. (1983), J. Appl. Bact., 54, 69-75.
7. Vassiliadis P., Kalapothaki V., Trichopoulos D., Mavromatte C. et Serie C. (1981), Appl. & Environ. Microbiol., 42, 615-618.
8. Vassiliadis P. (1983), J. Appl. Bact., 56, 69-76.
9. McGibbon L., Quail E. et Fricker C.R. (1984), Inter. J. Food Microbiol., 1, 171-177.
10. Fricker C.R. (1987), J. Appl. Bact., 63, 99-116.
11. Fricker C.R. (1984), J. Appl. Bact., 56, 305-309.

### ***Bouillon Sélénite Cystine***

1. Leifson E. (1936), Am. J. Hyg., 24 (2), 423-432.
2. North W.R. et Bartram M.T. (1953), Appl. Microbiol. I., 130-134.
3. Fricker C.R. (1987), J. Appl. Bact., 63, 99-116.
4. Association of Official Analytical Chemists (1978), Bacteriological Analytic Manual. 5th Edn. AOAC, Washington DC.
5. American Public Health Association (1976), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, Inc. Washington DC.
6. American Public Health Association (1978), Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 14th Edn. APHA Inc. Washington DC.
7. United States Pharmacopeia XXI (1980), Microbial Test Limits.
8. Harvey R.W.S. et Scott T. (1953), Mon. Bull. Min. Hlth & PHLS, 12, 149-150.
9. Harvey R.W.S. et Price T.H. (1979), J. Appl. Bact., 46, 27-56.
10. Chattopadhyay W. et Pilford J.N. (1976), Med. Lab. Sci., 33, 191-194.

### ***XLD gélose***

1. Taylor W.I. (1965) Am. J. Clin. Path., 44. 471-475.
2. McCarthy M.D. (1966) N.Z. J. Med. Lab. Technol., 20. 127-131.
3. Isenberg H.D., Kominos S. et Siegal M. (1969) Appl. Microbiol., 18. 656-659.
4. Taylor W.I. et Harris B. (1965) Am. J. Clin. Path., 44. 476-479.
5. Taylor W.I. et Harris B. (1967) Am. J. Clin. Path., 48. 350-355.
6. Taylor W.I. et Schelhart D. (1967) Am. J. Clin. Path., 48. 356-362.
7. Taylor W.I. et Schelhart D. (1966) Appl. Microbiol., 16. 1387-1392.
8. Taylor W.I. et Schelhart D. (1969) Appl. Microbiol., 18. 393-395.
9. Dunn C. et Martin W.J. (1971) Appl. Microbiol., 22. 17-22.
10. Chadwick P., Delisle G.H. et Byer M. (1974) Can. J. Microbiol., 20. 1653-1664.

### ***Gélose Salmonella - Shiguelia***

1. Leifson E. (1935), J. Path. Bact., 40, 581.
2. Taylor W.I. et Harris B. (1965), Am. J. Clin. Path., 44, 476.

### ***Agar Hektoen***

1. King S. et Metzger W.I. (1968) Appl. Microbiol., 16, 577-578.
2. Taylor W.I. et Schelhart D. (1971) Appl. Microbiol., 21, 32-37.
3. Hoben D.A., Ashton D.H.A. et Peterson A.C. (1973) Appl. Microbiol., 21, 126-129.
4. American Public Health Association (1976) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA Inc. Washington DC

### ***Gélose nutritive***

1. American Public Health Association (1946), Standard Methods for the Examination of Water et Sewage, 9th, Edn. APHA Inc. Washington, DC.
2. American Society for Microbiology (1981), Manual of Methods for General Bacteriology, ASM, Washington DC.
3. Cowan S.T. et Steel K.J. (1966), Manual for the Identification of Medical Bacteria, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 19, 27-28, 116 et 156.
4. Wilson G.S. et Miles A.A (1964), Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 5th Edn, Vol 1, Edward Arnold, London, pp. 493-494.

### ***Disques oxydase***

1. Gordon J. et McLeod J.W. (1928) J. Path.Bact. 31.185
2. Kovacs W. (1956) Nature Lond. 178,703

### ***Kligler Hajna***

1. Kligler I.J. (1917) Am. J. Pub. Hlth., 7, 1042-1044.
2. Kligler I.J. (1918) J. Exper. Med., 28, 319-322.
3. Bailey Sadie F. et Lacey G.R. (1927) J. Bact., 13, 182-189.
4. Russel F.F. (1911) J. Med. Res., 25, 217-229.

### ***ADH-ODC-ADH***

Coussens F., 1987. Essai d'innocuité d'un vaccin vivant de virulence atténuée contre la salmonellose abortive ovine. Thèse de doctorat. ENVN. p. 84

### ***Disques ONPG***

Le Minor L., Veron M., 1989 . Bactériologie médicale. 2eme édition. Chap. XVII « Entérobactéries ». Ed. Médecine - Sciences Flammarion. Paris. p. 389 – 427

### ***Clark et Lubs***

1. DHSS Report 71 (1982) "The Bacteriological Examination of Drinking Water Supplies" HMSO London.
2. Smith T. (1985) Amer. J. Med. Sci., 110, 283.
3. Clark W.M. et Lubs H.A. (1915), J. Inf. Dis., 17, 160-173.
4. Vaughn R., Mitchell N.B. et Levine M. (1939), J. Amer. Water Works Assoc., 31, 993

### ***Voges proskauer***

Voges O. et Proskauer B. (1898), Z.f. Hyg., 28, 20-22.

### ***Citrate de Simmons***

1. Ewing W.H. et Edwards P.R. (1960), Bull. Bact. Nomen and Taxon., 10, 1-12.
2. Kauffman F. (1954), "Enterobacteriaceae" 2nd ed., Munksgaard, Copenhagen.

### ***Mannitol Mobilité***

[http://www2.ac-lyon.fr/enseignement/biotech/microbio/Milieu\\_culture/MANNITOL\\_MOBILITE.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseignement/biotech/microbio/Milieu_culture/MANNITOL_MOBILITE.htm)



## Annexes

## Annexe 1. Fiche de traçabilité des échantillons.

### ANALYSES DE LABORATOIRE

#### Recherche et identification de *SALMONELLA* spp. sur peau de cou de poulet selon la norme ISO/FDIS 6579 :2001(F)

Fiche de traçabilité I

Nbre. d'échantillon : \_\_\_\_\_

**1- Prélèvement** de peau de cou, pesant 25 g chacun

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_

**2- Pré – enrichissement** : Ensemencer le prélèvement sur 225 ml de bouillon d'eau peptonée tamponée  
Incuber 24 h à 37 °C

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_

**3- Enrichissement** : Ensemencer 1 ou 2 ml de bouillon eau peptonée sur 10 ou 20 ml de bouillon *Muller Kauffman tétrathionate* et *Rappaport Vassilladis*

Incuber 24 h à 37 °C pour le *Muller Kauffman*

Incuber 24 h à 41 °C pour le *Rappaport Vasilladis*

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_

**4- Isolement** : Ensemencer une goutte de chaque bouillon sur milieu XLD et BGA

Incuber a 24 h à 37 °C

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_

**5- Identification** : Si les colonies poussent sur les milieux XLD ou BGA, faire des tests d'identification. Au moins une colonie caractéristique (pour chaque milieu) et 4 colonies si la première est négative

**6- Confirmation phase 1**: Répliquer sur gélose nutritive (**fiche II**)

Incuber 24 h à 37 °C

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_

**7- Confirmation phase 2** : Faire des tests de confirmation biochimique selon la norme

7.1 Test Oxydase : il est pratiqué sur toutes les souches. Déchet des souches oxydase +

7.2 Test Urée – Indole : il est pratiqué sur les souches oxydase -. Déchet des souches Uréase +

7.4 Galerie de confirmation composée des milieux Kligler – Hajna, Manitol, VP, ADH – ODC - LDC, test ONPG.

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_



## Fiche de traçabilité des échantillons II (repiquage sur GN)

Nbre. d'échantillon : \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_ Technicien : \_\_\_\_\_ Heure : \_\_\_\_\_

### A partir de Muller Kauffman :

# de colonies caractéristiques provenant de Muller Kauffman poussées: \_\_\_\_\_

# de colonies provenant de Muller Kaufman, poussées sur SS et repiquées sur Gélose nutritive \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

# de colonies provenant de Muller Kaufman, poussées sur XLD et repiquées sur Gélose nutritive: \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

### A partir de Rappaport Vassiliadis :

# de colonies caractéristiques provenant de Rappaport Vassiliadis poussées

# de colonies provenant de Rappaport Vassiliadis, poussées sur SS et repiquées sur Gélose Nutritive : \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

# de colonies provenant de Rappaport Vassiliadis poussées sur XLD et repiquées sur Gélose Nutritive: \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

# de boîte de GN : \_\_\_\_\_ # de souche : \_\_\_\_\_

**Fiche de traçabilité des échantillons III – (confirmation biochimique)**

# d'échantillon : \_\_\_\_\_

# de boîte de gélose nutritive : \_\_\_\_\_

**Test biochimiques appliqués :**

**1. Oxydase**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**2. Urée Indole**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**3. Kliger - Hajna**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**4. Mannitol mobilité**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**5. ONPG**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**6. ADH – ODC – LDC**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**7. Citrate de Simmons**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**8. Vosker – Proskaver**

Date : \_\_\_\_\_

Technicien : \_\_\_\_\_

**Synthèses des caractéristiques biochimiques de la souche testée**

Oxyd	Urée	Lac	Glu	H2S	Gaz	M.M	ONPG	ADH	ODC	LDC	CS	VP

Résultat:

\_\_\_\_\_  
 D&R du laboratoire MPE  
 Dr . RAKOTOARITAHINA Hugues

## Annexe 2. Formulaire d'enquête

Fiche vendeur			
Numéro vendeur / / / /			
Date d'enquête / / / /		Heure / / / h / / / min	
Adresse			
Données vendeur			
Age : / / / ans		Sexe M / / F / /	
Présentation Blouse		Oui / / Non / /	
Propreté		Propre / / Sale / /	
Scolarisation : Primaire / / Secondaire / / Technique / /			
Univers. / / Autre			
Nombre total d'années scolaires / / / années			
Avez vous été formé sur les règles générales d'hygiène ? Oui / / Non / /			
Enseignement reçu en matière de restauration/boucherie/charcuterie Oui / / Non / /			
Si oui quel type :			
Lieu :		Durée :	
Ancienneté du vendeur dans la profession actuelle		Ans / / / Mois / / /	
Données du point de vente			
Type de point de vente			
Petit étal / / Grande surface / / Marché / / Point spécialisé / /			
Ancienneté du point de vente actuel (depuis combien de temps l'activité existe à cet endroit) ? / / ans / / mois			
Mobilité Fixe / / Mobil. pédestre / / Mobil. Sédentaire / /			
Proximité immédiate d'un point d'eau(<10m) Oui / / Non / /			
Nombre moyen de poulets entiers vendus par jour de semaine / / /			
Nombre moyen de Kg de poulets vendus par jour de semaine / / /			
Nombre moyen de poulets entiers vendus par jour de week-end / / /			
Nombre moyen de Kg de poulets vendus par jour de week-end / / /			
Durée d'ouverture du point de vente		Par semaine / / jours	
		Par mois / / semaines	
		Par année / / mois	
Produits vendus dans le point de vente		Poulet seul / /	
Autre produits en plus de poulet		/ /	
Produit 1 _____		Produit 2 _____	
Produit 3 _____		Produit 4 _____	
Modalité de vente du poulet		Poulet entier / / Poulet découpé / /	
Présentation du poulet		Vitrine réfrigérée / / Vitrine non réfrigérée / /	
		Air libre / / Table en bois / /	
		Table en fer / / Table en Inox / /	
		Recouverte d'un film / / Autre / /	

Nettoyage et désinfection de support de présentation		Oui / <u>  </u> /	Non / <u>  </u> /
Produits utilisés		Fréquence	
Eau utilisée			
Devenir du produit en fin de journée			
Tout vendu / <u>  </u> /		Cuit / <u>  </u> /	Rôti / <u>  </u> /
Conservé / <u>  </u> /		Préparé / <u>  </u> /	
Réfrigérée / <u>  </u> /		Autre _____	
Temps moyen de stockage _____			
Modalités d'approvisionnement			
Lieu d'approvisionnement		Grossiste / <u>  </u> /	Petit éleveur / <u>  </u> /
Elevage par vendeur / <u>  </u> /		Autre / <u>  </u> / Préciser :	
Modalités d'achat			
Poulet acheté vivant (tué par le vendeur) / <u>  </u> /		Poulet acheté tout préparé / <u>  </u> /	
Fréquence d'achats			
Quotidien / <u>  </u> /		Hebdomadaire / <u>  </u> /	
Autre fréquence / <u>  </u> / Tous les / <u>  </u> / jours			
Entretien avec le vendeur			
Quelles sont les arguments que vous utilisez pour vendre ?			
D'après vous, l'hygiène du point de vente conditionne-t-elle l'attrance des clients ?			
Avez vous des idées pour améliorer vos ventes ?			
Quel est votre opinion sur les conditions d'hygiène de cet endroit ?		Pensez vous qu'une amélioration des conditions de vente sera bénéfique ?	
Acceptable / <u>  </u> /		Pour vous / <u>  </u> /	
Améliorable / <u>  </u> /		Pour les consommateurs / <u>  </u> /	
Inacceptable / <u>  </u> /		Pour les deux / <u>  </u> /	
Si une formation vous était proposée, pour combien de jour seriez vous prêt à la prendre ?			
Etes vous prêt à vous organiser entre vendeurs ?		Oui / <u>  </u> /	Non / <u>  </u> /

Fiche poulet prélevé	
Numéro de vendeur: /_/_/_/_/	Numéro d'échantillon :
Date de prélèvement : /_/_/_/04	Heure /_/_/_/_/_/ AM /_/_/ PM /_/_/
Température extérieure ambiance /_/_/ °C	
Température de vente du poulet /_/_/_/ °C Réfrigérée /_/_/	
Non réfrigérée /_/_/	
Depuis quand le vendeur possède-t-il le poulet ?	Date : __/__/04
Y a-t-il un moyen d'identification de la date d'achat des poulets proposés à la vente ?	Oui /_/_/ Non /_/_/
Si oui préciser :	
Présence d'emballage	Oui /_/_/ Non /_/_/
Présentation du poulet	Complète /_/_/ Découpé /_/_/

## Annexe 3. Analyses de laboratoire pour la recherche des *Salmonella*

**ANALYSES DE LABORATOIRE**  
**Recherche et identification de SALMONELLAE spp. sur peau de cou de poulet selon la norme**  
**ISO/FDIS 6579 :2001(F)**

1- **Prélèvement** de peaux de cou, pesant 25 g chacune et homogénéisées sur le Stomacker.



2- **Pré – enrichissement** : Ensemencer le prélèvement sur 225 ml de bouillon d'eau peptonée tamponnée  
Incuber 24 h à 37 °C



3- **Enrichissement** : Ensemencer 1 ou 2 ml de bouillon eau peptonée sur 10 ou 20 ml de bouillon *Muller Kauffman tétrathionate* et *Rappaport Vassilladis*  
Incuber 24 h à 37 °C pour le *Muller Kauffman*  
Incuber 24 h à 41 °C pour le *Rappaport Vasilladis*



4- **Isolement** : Ensemencer une goutte de chaque bouillon sur milieu *XLD* et *SS*  
Incuber à 24 h à 37 °C



5- **Identification** : Si les colonies poussent sur les milieux *XLD* ou *SS*, faire des tests d'identification. Au moins une colonie caractéristique (pour chaque milieu) et 4 colonies si la première est négative



6- **Confirmation phase 1**: Répliquer sur gélose nutritive  
Incuber 24 h à 37 °C



7- **Confirmation phase 2** : Faire des test de confirmation biochimique selon la norme.

7.1 Test *Oxydase* : il est pratiqué sur toutes les souches. Déchet des souches oxydase +

7.2 Test *Urée – Indole* : il est pratiqué sur les souches oxydase -. Déchet des souches Uréase +

7.4 Galerie de confirmation composée des milieux *Kligher – Hajna*, *Manitol*, *Citrate de Simmons*, *VP*, *ADH – ODC - LDC*, test *ONPG*, sur les souches uréase -



7- **Sérotypage** : Envoyer les colonies suspectes de *Salmonella sp.* à l'Institut Pasteur de Madagascar sur milieu *Gélose Nutritive*.



# Le sérotypage des bacilles Gram -

Test d'autoagglutination sur lame (eau + colonie)

No

Test positif: le sérotypage est impossible

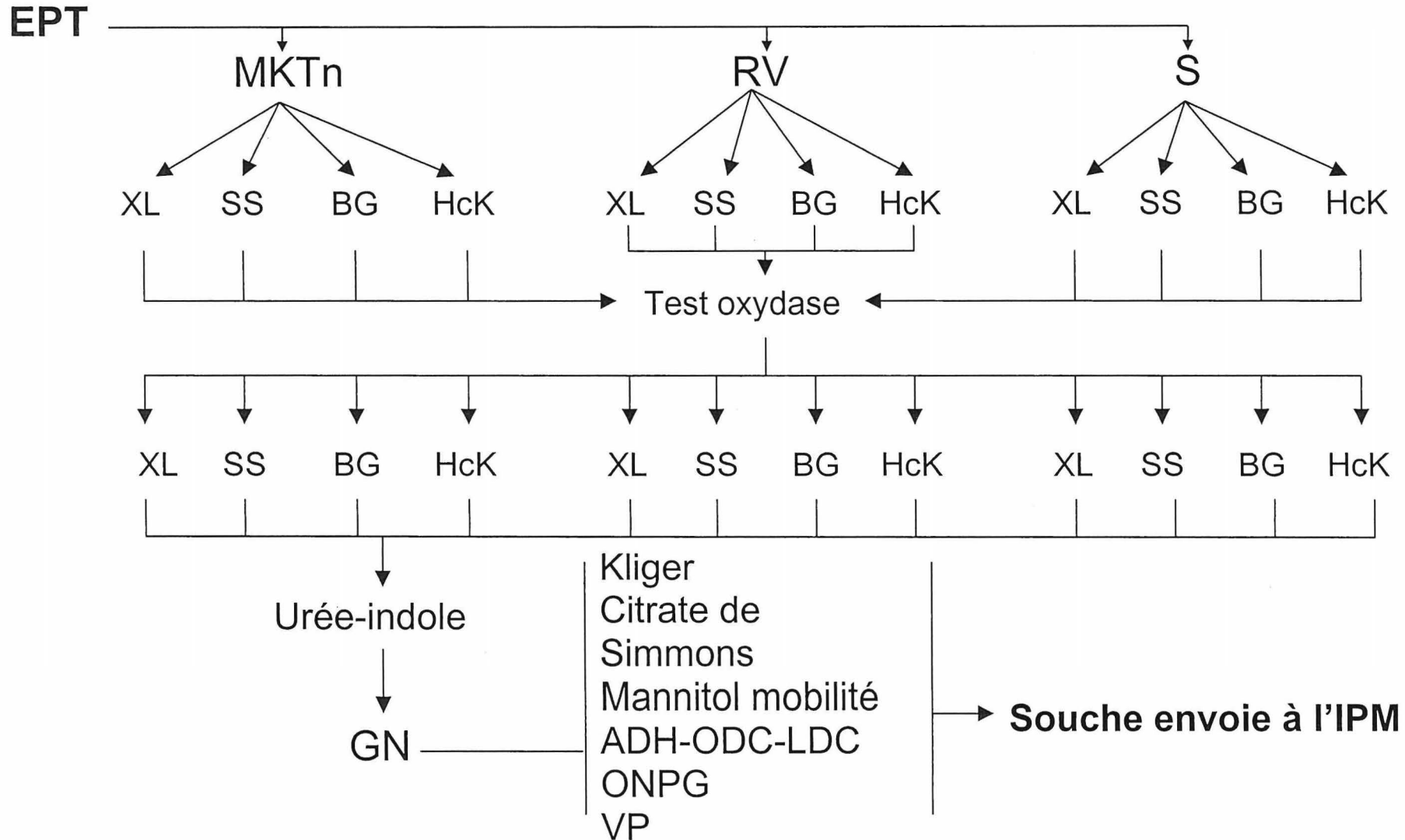
Test avec mélanges anti O: OMA, OMB et OMC	
Si OMA +	Si OMB -
Groupe A, B, D, E ou L	Groupe C, F G, ou H
Tester anti O: ➤ Groupe B: anti O 4,5 ➤ Groupe D: anti O 9 ➤ Groupe E: anti O 2, 10, 15	Tester anti O: Le plus courant est le groupe C: Anti O 6, 7, 8

OMA et OMB négatifs	
Tester le sérum anti Vi	
Négatif: Vérifier qu'il s'agit bien d'une salmonella et recommencer le sérotypage	Positif: Détruire l'antigène Vi par chauffage 10 m à 100°C et recommencer le sérotypage

Tester les sérum anti H correspondants au groupe. On détermine ainsi le nom du sérovar. Le nom de genre et sérovar portent une majuscule

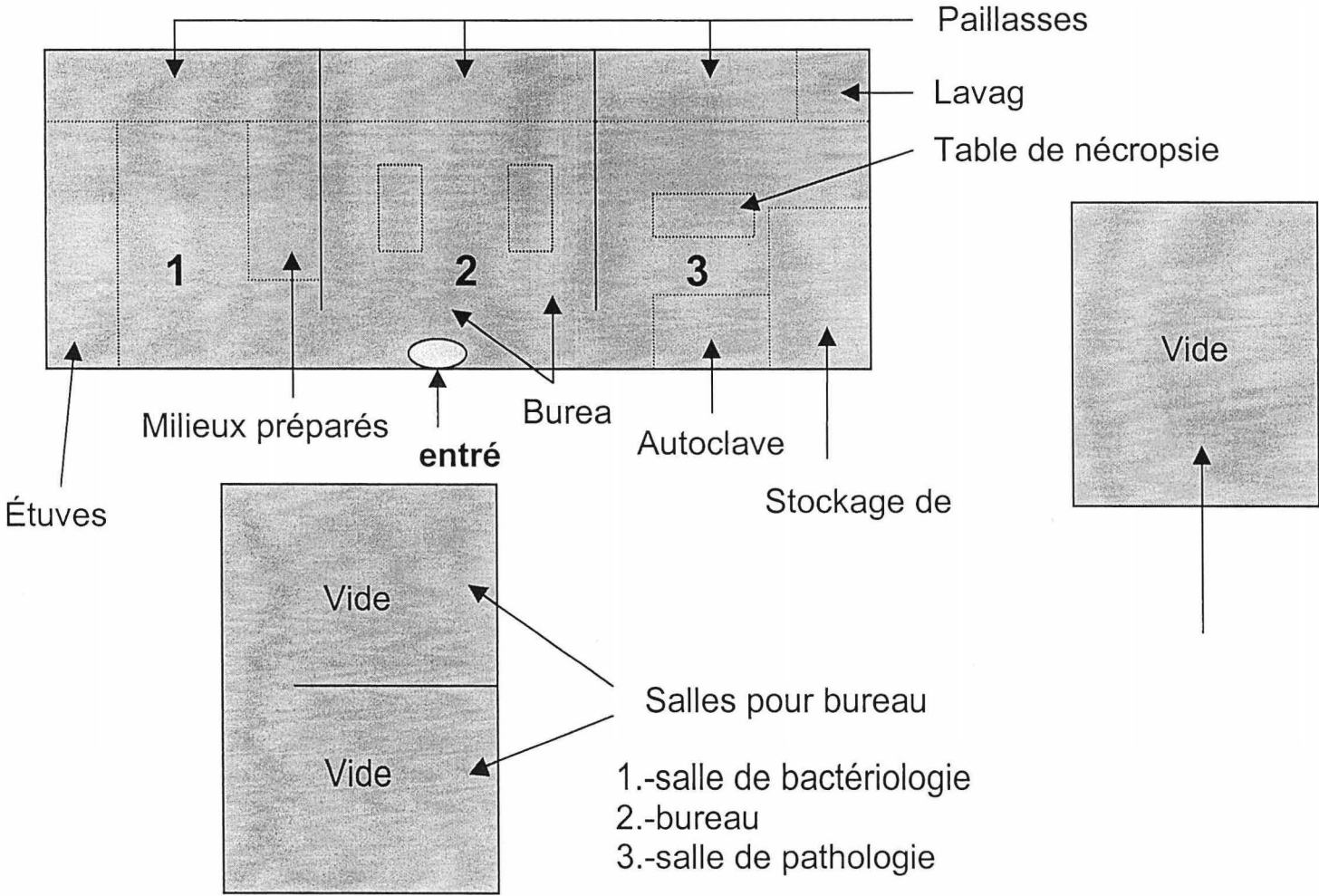
## Annexe 4. Schéma de la technique définitive des analyses

## Technique définitive des analyses *Salmonella*

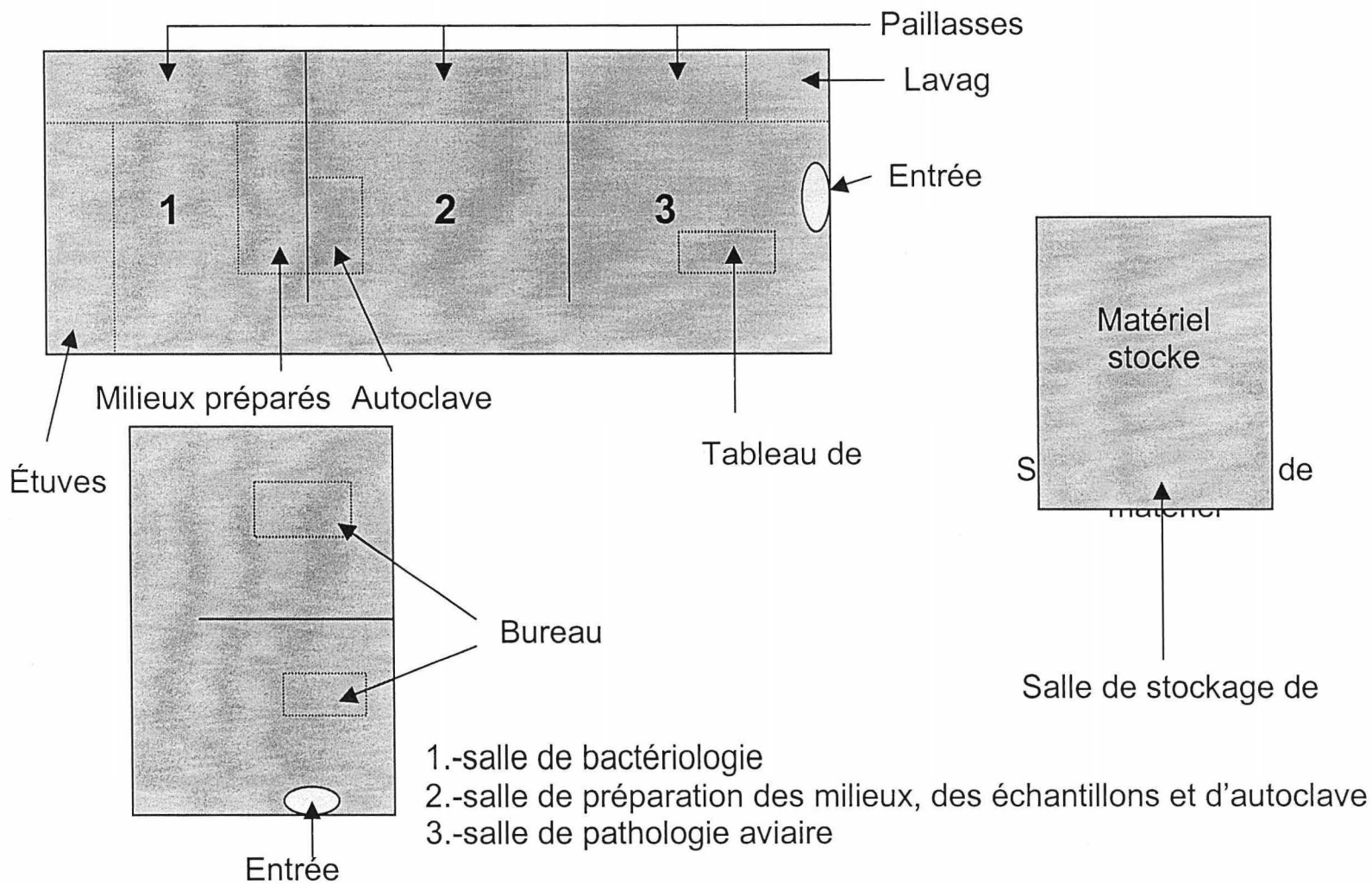


## Annexe. 5 Aménagement du Laboratoire de Pathologie Aviaire de la MPE

# Laboratoire de pathologie aviaire avant le 03/08/2004



# Laboratoire de pathologie aviaire après le 03/09/2004



## Annexe 6. Relève des analyses positifs à *Salmonella*

# d'échantillon	Date de prélèvement	SEROTYPE	Lieu de prélèvement
042A	28-juil	ARIZONAE	Isotry
109 RVS XLD	11-août	ENTERITIDIS	La Hutte Antaninarenina
137A	"	ENTERITIDIS	Jumbo Digue
138A RVS BGA	16-août	ENTERITIDIS	Leader Price Ambohibao
139 RVS BGA	"	ENTERITIDIS	Jumbo Digue
141 A RVS BGA	"	ENTERITIDIS	Leader Price Ankorondrano
141B RVS HEK	"	ENTERITIDIS	Leader Price Ankorondrano
143 A RVS HEK	"	ENTERITIDIS	Shoprite Ankorondrano
143 A RVS XLD	"	ENTERITIDIS	Shoprite Ankorondrano
143 B RVS HEK	"	ENTERITIDIS	Shoprite Ankorondrano
146 B MKT BGA	18-août	GIVE	Tanjombato
146 B RVS BGA	"	GIVE	Tanjombato
146 MKT XLD HEK	"	GIVE	Tanjombato
163 RVS BGA	19-août	ENTERITIDIS	La Hutte Antaninarenina
171 A (1) RVS BGA	"	GIVE	Jumbo Tanjombato
171 A (2) RVS BGA	"	GIVE	Jumbo Tanjombato
172 B MKT XLD	23-août	ENTERITIDIS	Leader Price Tanjombato
185 RVS BGA	"	ENTERITIDIS	Anosibe marché
185 RVS XLD	27-août	ENTERITIDIS	Anosibe marché
186 RVS HEK	"	GIVE	Anosibe marché
186 RVS XLD	"	GIVE	Anosibe marché
189 RVS XLD	"	GLOSTRUP	Isotry marché
191 RVS BGA	"	ENTERITIDIS	La Hutte Analamahitsy
191 RVS XLD	27-août	ENTERITIDIS	La Hutte Analamahitsy
192 RVS BGA	"	ENTERITIDIS	Analakely marché
192 RVS XLD	27-août	GIVE	Analakely marché
194 RVS XLD	27-août	ENTERITIDIS	Analakely marché
195 RVS BGA	"	ENTERITIDIS	La Hutte Antaninarenina
195 RVS SS	"	ENTERITIDIS	La Hutte Antaninarenina
195 RVS XLD	"	ENTERITIDIS	La Hutte Antaninarenina
196 RVS BGA	"	ENTERITIDIS	La Hutte Antsakaviro
196 RVS XLD	"	ENTERITIDIS	La Hutte Antsakaviro
197 RVS SS	"	ENTERITIDIS	La Hutte Ampefiloha
197 RVS XLD	"	ENTERITIDIS	La Hutte Ampefiloha
199 RVS SS	"	ENTERITIDIS	La Hutte Manjakaray
199 RVS XLD	"	ENTERITIDIS	La Hutte Manjakaray
200 RVS XLD	27-août	ENTERITIDIS	La Hutte Ampefiloha
201 RVS XLD	"	ENTERITIDIS	La Hutte 67Ha
202 RVS XLD	"	ENTERITIDIS	La Hutte Manjakaray
205 B RVS BGA	30-août		Leader Price Ankorondrano
205 B RVS BGA	"		Leader Price Ankorondrano
220 RVS HEK	"		Analakely marché
228 BSC HEK	01-sept		La Hutte Analamahitsy
228 BSC SS	"		La Hutte Analamahitsy
229 RVS XLD	"		Jumbo Tanjombato
230 A RVS XLD	"		Leader Price Tanjombato
230 RVS SS	02-sept		Leader Price Tanjombato
236 A RVS HEK	"		Ambodin'Isotry
238 C MKT HEK	"		Shoprite Analakely
242 RVS XLD	08-sept		Shoprite Ambodivona

245 B RVS HEK	"	Leader Price Andranomena
246 A MKT SS	"	Shoprite Talatamaty
249 B RVS HEK	"	Ampasapito marché
249A RVS BGA	"	Ampasapito marché
250 RVS XLD	10-sept	La Hutte Manjakaray
251 RVS XLD	"	La Hutte Analamahitsy
257 RVS XLD	"	La Hutte 67 Ha
259 RVS BGA	"	La Hutte Antaninarenina
260 RVS BGA	"	Ampefiloha marché
261 RVS BGA	"	Ampefiloha marché
261 RVS XLD	"	Ampefiloha marché
266 RVS XLD	"	Analakely marché
268 RVS XLD	"	La Hutte Antsakaviro
272 MKT XLD	13-sept	La Hutte Ivato
275 MKT XLD	"	Isotry marché
285 MKT SS	"	La Hutte Analamahitsy
286 MKT SS	"	La Hutte Manjakaray
288 RVS HEK		
288 RVS XLD		



Julie PONCET  
14 rue LANNES  
31130 BALMA  
[j.poncet@laposte.net](mailto:j.poncet@laposte.net)

REÇU LE 28/10/04  
N° 236...ENS

Balma, le 22 octobre 2004

A : Christine GERBAUD, CIRAD Enseignement et formation.

Objet : Rapport de stage.

Bonjour Christine,

Veillez trouver ci-joints :

- 5 versions papier de la synthèse bibliographique (titre : LE LAMA EN BOLIVIE : ELEVAGE ET FILIERE VIANDE) ;
- 5 versions papier du rapport de stage (titre : PRODUCTIONS ET STRATEGIES ECONOMIQUES DES ELEVEURS DE LAMAS DE L' ALTIPLANO, BOLIVIE) ;
- 1 CD-ROM contenant les fichiers de ces documents.

Par ailleurs, je vous serai reconnaissante de bien vouloir modifier le nom de mon maître de stage sur la page de garde du rapport : il s'appelle Roberto APARICIO, et non Patricio ROBERTO !

A bientôt !

Julie