

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

\*\*\*\*\*

Faculté des Sciences  
et Techniques  
(FST)



Année 2003

Ecole Inter - Etats  
des Sciences et Médecine  
Vétérinaires  
(EISMV)



N° 13

---

**EFFET DE LA FERMENTATION DU LAIT SUR LA PRESENCE  
DES BRUCELLA ET DES ANTICORPS BRUCELLIQUES AU  
MALI**

---

**MEMOIRE DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES  
DE PRODUCTIONS ANIMALES**

Présenté et soutenu publiquement le 16 octobre 2003 à 11 heures à l'EISMV de Dakar

Par

**Adama FANE**

Né en 1956 à Ségou (MALI)

**JURY**

<b>PRESIDENT</b>	<b>Monsieur François Adébayo ABIOLA</b>	<b>Professeur à l'EISMV</b>
<b>MEMBRES</b>	<b>Monsieur Bhen Sikina TOGUEBAYE</b>	<b>Professeur à la FST de l'UCAD</b>
	<b>Monsieur Malang SEYDI</b>	<b>Professeur à l'EISMV</b>
	<b>Monsieur Ayayi Justin AKAKPO</b>	<b>Professeur à l'EISMV</b>

## AVANT PROPOS

Ce travail a été financé par le projet « Lait Sain Pour le Sahel » à travers le Fonds National, Suisse de la Recherche Scientifique(FNRS) et la Direction pour le Développement et la Coopération Suisse(DDC). Que ces institutions trouvent ici l'assurance de ma parfaite reconnaissance !

L'étude a eu comme cadre l'EISMV, le LCV, l'INSAH et l'ETH;

elle a bénéficié de l'encadrement et des conseils avisés des **Docteurs Jakob ZINSTAG et**

**Bassirou BONFOH.**

Qu'ils en soient vivement remerciés.

## **DEDICACES**

Je dédie ce mémoire :

A ma mère Alimata Koné pour son courage et son dévouement.

A ma femme et mes enfants pour la grande affection qu'ils me témoignent.

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord au bon Dieu pour m'avoir donné la chance et le courage d'étudier.

Au Professeur Malang Seydi pour m'avoir donné l'opportunité de m'inscrire au

DEA de productions animales à l'EISMV.

Au FNRS : Pour avoir financé le projet.

A l'ETHZ : En la personne du professeur Zakaria Farah pour ses conseils.

A l'ITS : En la personne du Dr. Bassirou Bonfoh pour son appui technique.

A l'INSAH : Pour leur grande disponibilité.

Au LCV : A tous mes collègues de travail pour leur soutien moral.

A l'EISMV : A son Directeur le professeur François Adébayo ABIOLA et tout le

corps professoral pour la qualité de l'enseignement reçu.

Au professeur Ayayi Justin Akakpo qui a consenti le sacrifice de m'encadrer malgré ses

multiples occupations.

Merci à tous mes amis d'Afrique et d'ailleurs, puisque quelque part tous ont contribué à

l'accomplissement de ce travail.

## SOMMAIRE

Avant propos.....	i
Dédicaces .....	ii
Remerciements.....	iii
Sommaire.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Table des illustrations .....	vi
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1<sup>ère</sup> - PARTIE : Production et consommation du lait au Mali.....</b>	<b>4</b>
I- Production du lait au Mali.....	5
II- Consommation du lait au Mali.....	7
III- Transformation du lait.....	8
IV- Qualité du lait.....	9
<b>2<sup>ème</sup> - PARTIE : Effet de la fermentation du lait sur la présence des brucelles et sur les anticorps brucelliques.....</b>	<b>13</b>
I- Matériel et méthode.....	14
1- Zone d'étude.....	14
2- Matériel et méthode sur le terrain.....	14
3- Matériel et méthode au laboratoire.....	15
-Équipement de laboratoire.....	15
-Matériel de laboratoire.....	15
-Méthode .....	15
Bactériologique.....	15
Sérologique.....	16
Technique de Rose Bengale et du test de l'anneau.....	17
Technique de l'ELISA.....	17
II- Résultats.....	19
1- Résultat des prélèvements sur le terrain.....	19
2- Résultats du laboratoire.....	19
-Isolement de Brucella abortus dans le lait frais.....	19
-Effets de la fermentation du lait sur les anticorps et sur les corps bactériens.....	20
III- Discussions et recommandations.....	24
1- Discussions.....	24
- Matériel et méthode.....	24
- Résultat.....	25
2- Recommandations.....	29
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>29</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>30</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>33.</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

DNSI :	Direction Nationale de la Statistique et de l'Informatique.
ELL:	Équivalent Litre de Lait
ETHZ :	École Polytechnique Fédérale de Zurich.
.FAO :	Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation.
FNRS :	Fond National Suisse de la Recherche Scientifique.
GAM :	Générale Alimentaire du Mali.
IER :	Institut d'Économie Rurale.
.INSAH :	Institut National du Sahel.
ITS :	Institut Tropical Suisse.
UFC :	Unité de Formation Colonie.
WHO:	World Health Organization
ELISA :	Enzyme linked immuno absorbent assay
GAM :	Générale Alimentaire Malienne

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1.....	16
Tableau 2.....	20
Tableau 3.....	21
Tableau 4.....	22
Tableau 5 et 6.....	23
Tableau 7.....	24
Figure 1 .....	27

**EFFET DE LA FERMENTATION DU LAIT SUR LA  
PRESENCE DES *BRUCELLA* ET DES ANTICORPS**

**BRUCELLIQUES AU MALI**



## **Introduction**

En Afrique sub-saharienne la production et la consommation de lait et des produits laitiers varient entre les régions et dépendent fortement des facteurs environnementaux, de la productivité des animaux, des saisons et des habitudes alimentaires des différents groupes ethniques. Le Mali a une longue tradition d'élevage, de production et de consommation de lait. La production laitière au Mali est très faible malgré l'effectif élevé de son cheptel. Paradoxalement le pays a augmenté ses exportations de bétail sur pied vers les pays côtiers, depuis la dévaluation du F cfa (Diagana et al, 1999). Les deux intrants (lait frais local et lait en poudre importé) subissent des transformations semi modernes ou artisanales dans des circuits très complexes (Debrah et al, 1995). Ce qui contribue à la mise sur le marché de produits laitiers dont la qualité est peu connue des consommateurs. Les pathologies animales (zoonoses, mammites sub-cliniques et certaines pratiques (mouillage, hygiène) peuvent rendre ces produits impropres à la consommation (Gran et al, 2002).

## **Justification de l'étude**

La recrudescence de certaines maladies zoonotiques comme la brucellose : Tounkara et al, (1994), Tasei et al. (1982), Steinmann (2003), Coulibaly (1992), Perez-Avraham et al. (2001), milite pour des études épidémiologiques sur certaines pathologies re-émergentes.

La brucellose, se transmet entre autre par contact avec les animaux malades et la consommation du lait cru provenant d'une vache infectée. Il devient alors impérieux d'effectuer un contrôle de qualité hygiénique du lait de ferme pour juguler les risques de contamination des consommateurs.

Au plan international de fortes avancées ont eu lieu, notamment en Europe où des campagnes d'éradication ont été menées. Lesquelles campagnes ont permis une baisse très importante du taux de la maladie (Meyer, 1985). Ces campagnes ont été soutenues par des pratiques de

pasteurisation du lait. Aujourd'hui le traitement thermique du lait au Mali est peu pratiqué et le lait est spontanément fermenté pour la consommation.

Est-il possible d'identifier un lait fermenté « brucellique » et ce lait est-il dangereux pour le consommateur ? Les risques encourus par les acteurs des filières animales (éleveurs, bergers, vétérinaires, bouchers, consommateurs) font de la brucellose un problème de santé publique, dont le coût de la prise en charge va s'alourdir si rien n'est fait à court et moyen terme (FAO, 1964).

**Les objectifs de l'étude sont :**

- sur un plan général, l'amélioration de la qualité hygiénique du lait ;
  - et sur un plan spécifique : l'évaluation de l'effet de la fermentation sur les anticorps anti-*Brucella abortus* pour envisager le diagnostic de la brucellose dans le lait fermenté ;
- l'évaluation de l'effet de la fermentation sur la survie de *Brucella abortus*.

Le présent mémoire est présenté en deux parties. La première partie traite de la revue bibliographique sur le Mali. La deuxième partie décrit la méthodologie du travail et présente les résultats obtenus et les discussions.

**PREMIERE PARTIE**

**PRODUCTION ET CONSOMMATION DU LAIT AU MALI**

Le Mali est un pays de l'Afrique de l'Ouest à vocation d'élevage. Le bétail est exploité pour la viande mais aussi pour le lait. Cependant, la production laitière est faible.

Malgré les 5,4 millions de bovins et 15,9 millions d'ovins/caprins que compte le Mali, la production locale n'offre qu'un niveau de consommation de 20 kg d'équivalent lait liquide (ELL)/habitant/an (source DNSI, 1986). Ce niveau de consommation est faible aussi bien par rapport aux normes internationales que par rapport aux objectifs fixés par l'Etat malien (40 kg ELL/habitant/an avant l'an 2000).

L'accroissement démographique : 2,8p.100 en général et 4,5 p.100 au niveau urbain, l'augmentation du prix des produits importés et la fixation des quotas de production des produits d'élevage dans les pays européens ont entraîné la diminution des importations, l'augmentation des prix et accentué ainsi la demande de lait localement produit.

## **I- Production du lait au Mali**

### ***I-1 Mode de production***

Quelle que soit l'espèce concernée, le lait local est produit au Mali dans deux grands systèmes de production : l'élevage extensif et l'élevage intensif. L'élevage extensif est pratiqué dans les systèmes pastoraux purs et dans les différents types de systèmes agropastoraux. Il est caractérisé par une production laitière fortement tributaire de la cyclicité observée dans la fourniture des pâturages naturels qui constituent l'essentiel des ressources alimentaires du bétail. Le lait est abondant pendant l'hivernage mais disponible loin des zones de consommation. Si le maintien d'un troupeau de laitières autour des villages permet de satisfaire les besoins familiaux en lait, il est loin d'optimiser l'exploitation du potentiel laitier du troupeau au niveau national (Coulibaly, 2002).

L'élevage intensif est pratiqué autour des grandes agglomérations et cités urbaines et dans ce qui est plus connu sous le vocable d'élevage périurbain. Ce sont des élevages à visée commerciale installés pour l'approvisionnement en lait des villes. La tendance est à la rationalisation des pratiques et gestion de l'exploitation (Debrah et al, 1995) Ces élevages périurbains intègrent des systèmes de lutte contre les pathologies de la reproduction et de la production laitière comme les mammites.

### **I-1-1 La production locale de lait**

#### *II-1-1-1 Dans le bassin laitier de Bamako :*

Les estimations de l'effectif des bovins de la zone périurbaine de Bamako (100 km de rayon) varient entre 160 000 et 200 000 têtes. Pour cette étude nous retiendrons la moyenne de 180 000 têtes. En 1996 l'IER admettait que cette population est composée d'environ 3.4% de vaches laitières et 96.6% de vaches d'autres types génétiques (Zébus, taurins et des produits de croisements zébu X taurin). Par la même enquête la structure du troupeau dans la zone indiquait 18 % de vaches allaitantes chez les métisses et 20 % chez les autres. L'étude de la productivité laitière des métisses en cours au Programme Bovin indique un prélèvement laitier moyen de 4 kg/jour pour les métisses et 2,7 pour les autres vaches. Sur la base de ces hypothèses, le disponible laitier du bassin s'établirait autour de 98,3 tonnes pays de lait par jour soit 35 880 tonnes par an (Coulibaly, 2002).

#### *I-1-1-2 Ailleurs dans le pays :*

Autour des villes de Ségou, Niono, Koutiala, Sikasso, Mopti, et Kayes, un système laitier périurbain, à l'instar de celui de Bamako, est entrain de s'implanter. Dans ces élevages extensif et villageois, le prélèvement laitier a été estimé à 1,1 l/j par vache, (Wilson, 1988 ; Wagenaar et al, 1988) et entre 1,2 l/j à 1,6 l/j (Coulibaly, 2002). Selon la structure du troupeau établie par Pradère et Sidibé (1989), les vaches allaitantes représentent les 16 % du troupeau.

En considérant l'effectif de 6,2 millions et un prélèvement quotidien minimum de 1,2 litres, la production quotidienne de lait s'établirait autour de 1100 tonnes soit une production annuelle d'environ 400 000 tonnes par an (Coulibaly, 2002),

Cette production locale ajoutée à celle d'autres espèces, comme les petits ruminants (399864 tonnes par an) et les chamelles (42171 tonnes par an) n'arriveraient pas à satisfaire la demande locale. Le Mali est donc obligé d'importer du lait.

### **I-1-2 Les importations et la commercialisation :**

Les importations de lait et produits laitiers ont représenté près de 15 Milliards de francs CFA pour la seule année 1999 (DNSI,1999) Thienta (1996). Ce qui équivaut à près de 16000 tonnes équivalent lait liquide (ELL). Ce volume bien que directement consommé en partie dans les ménages, suivrait un circuit d'une multitude d'industries laitières.

## **II- Consommation du lait**

Le lait est consommé au moins une fois par jour par la majeure partie de la population.. La consommation est évaluée à 12 kg ELL/ an/ personne 60% représentent le lait importé (Tamboura et Sangaré, 2002).

En milieu rural près de 93,1% de la population consomme du lait (Waelti, 2002) Le lait est recherché pour ses qualités nutritives, pour son goût et la facilité d'ingestion des aliments auxquels il est mélangé.

Le lait le plus consommé est le lait en poudre ou concentré à cause de sa disponibilité, de son bon prix peu élevé et de sa conservation facile. Il est suivi par le lait de vache, alors que les laits de brebis et de chèvre ne sont presque pas consommés à cause de l'odeur forte. (Waelti, 2002 ).

Dans la plupart des ménages, le lait est consommé sous forme caillé. Il peu être consommé frais. Les autres formes de consommation sont le beurre et le ghee (beurre fondu).

A Bamako, 97,4% de la population déclare consommer le lait et les produits laitiers au moins une fois par semaine. Près de 58,8 % des consommateurs préfère le lait cru. Il est mélangé avec les aliments chauds (thé, café, bouillie ) Par contre le lait caillé est consommé par 22,1% des habitants (Hetzl, 2003 ).

### **III- Transformation**

Au Mali, la transformation du lait est une pratique ancienne et assez diversifiée. La transformation traditionnelle artisanale, encore largement majoritaire, joue un rôle essentiel dans la valorisation du lait et des produits dérivés. Cependant, on note une dynamique de développement d'unités semi-industrielles des mini laiterie reparties à travers le pays (Tamboura & Sangaré, 2002).

Si l'offre est encore largement inférieure à la demande, la transformation locale du lait s'est cependant beaucoup développée dans la capitale depuis les années 1980 et peut encore trouver une place plus importante dans l'économie.

#### **III-1- Le circuit artisanal :**

Les mini laiteries à caractère artisanal sont des unités de transformation disposant d'équipements simples : casseroles en aluminium, réchaud à gaz, congélateurs, "mixeur" électrique, glacière, écrémeuse et d'autres petits matériels. Ces mini-laiteries développent leurs activités en transformant essentiellement le lait en poudre. Ce choix est lié au coût élevé du lait local sur le marché (300 à 400 Fcfa le litre alors qu'un litre de lait reconstitué leur revient à moins de 280 Fcfa), à la facilité de stockage, de traitement et à la disponibilité régulière du lait en poudre. Les produits vendus sont le lait frais reconstitué, pasteurisé, le yaourt et le féné (crème "maturée") (Tamboura et Sangaré, 2002).

#### **III-2- Les grands circuits industriels (laiteries modernes)**

Ils sont représentés par Mali-Lait, GAM, Ségou lait, Harry Délices... Ce sont des unités de transformation du lait de capacité moyenne (1.000 à 20.000 litres/ jour) et possédant des

équipements techniques modernes. Leur production est assez diversifiée (lait pasteurisé, yaourt, lait fermenté, crème ou fènè, fromage à pâte molle) (Tamboura & Sangaré, 2002 ).

### **III-3 Les circuits semi-industriels (mini laiteries)**

Ce sont des unités de transformation de faible capacité de production (200 à 350 litres/ j )

Pour la plupart, la transformation est réalisée de manière artisanale améliorée et elles utilisent du matériel semi-moderne (pasteurisateur, écrémeuse, encapsuleuse, étui pour yaourt, mixeur, tank de réfrigération...).

Ces unités sont implantés dans les bassins laitiers périurbains des villes secondaires : comme Mopti, Ségou, Sikasso, San, Koutiala, Niono, Fana et Bamako.

Ces unités de transformation disposent de circuits de collecte ou de ramassage de lait. Les centres de ramassage sont situés dans le périmètre laitier de Bamako et ailleurs. Ils sont gérés par des associations d'éleveurs.

Une grande partie de la production laitière locale passe par des systèmes de transformation individuelle en milieu rural et urbain. Les équipements restent assez rudimentaires. On trouve dans ce système essentiellement des femmes d'éleveurs des zones pastorales ou des zones périurbaines. Ce circuit absorbe au moins 80 % de la production locale (Tamboura & Sangaré, 2002).

## **IV- Qualité du lait et des produits laitiers**

Le lait produit localement (lait frais, lait fermenté) ne répond pas toujours aux normes internationales ( $10^3$  ufc/ml) de qualité avec une flore bactérienne de  $10^7$  ufc/ml (Bonfoh et al. 2002). Cette flore est essentiellement composée d'Entérobactéries, de staphylocoques, de streptocoques, de levures et de moisissures.

Près du quart du lait frais est mouillé. Ces phénomènes sont surtout observés en période chaude où la demande en lait frais est très forte. Les motifs de ces pratiques sont le souci de



maîtriser le niveau de revenu des vendeurs ambulants ou des bergers. Cela est d'autant plus accentué qu'il n'existe aucun contrôle par les services compétents. Il s'ensuit une diminution de la qualité nutritive du produit. Le même phénomène peut s'observer aussi au niveau des industries laitières qui pratiquent aussi cette fraude. (Bonfoh et al, 2002).

L'acidité est un facteur déterminant dans la diminution de la charge bactérienne du lait et ses dérivés, surtout sur les produits qui ont subi une fermentation spontanée. On retrouve plus de produits fermentés en zone rurale (Bonfoh et al, 2002).

Les températures des produits sont très élevées indiquant la précarité de la conservation. A ces températures, il est reconnu que le nombre de germes est doublé toutes les 20 minutes. Le niveau de contamination n'est donc pas surprenant. La chaîne de froid est rarement continue. Dans le cas où elle existe, les coupures de l'électricité et les économies d'énergie chez les revendeurs (débranchements intempestifs), contribuent à l'élévation de la température surtout en période chaude (Bonfoh et al, 2002).

Les principales sources de contamination dans la filière locale sont les récipients du berger et des vendeurs). On y retrouve des germes de contaminations (Coliformes fécaux) et des pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*) (Bonfoh et al, 2002).

Signalons aussi la présence dans le lait de germes de mammites cliniques ou sub cliniques mais aussi de la présence de résidus d'antibiotiques par suite du non respect des délais d'attente lors des traitements avec les antibiotiques.

Sur le plan économique, les vaches séropositives peuvent entraîner une baisse de 20% de la fertilité et 16% de la production laitière. Notons que la brucellose est une zoonose transmissible à l'homme par contact avec les animaux et leurs sécrétions d'une part et par la consommation de lait non pasteurisé provenant d'un troupeau positif d'autre part. Si la corrélation entre la présence d'anticorps et la présence de germes dans le lait n'est pas établie

dans cette étude, on sait que la présence des anticorps peut être intimement liée à celle des bactéries.

La brucellose humaine est bien décrite au Mali. C'est une pathologie très gênante entraînant des fièvres intermittentes (fièvre de Malte), des rhumatismes, des avortements et des cas de tumeurs cérébrales (Bonfoh et al, 2002). Si la pasteurisation contribue à détruire les brucelles, d'autres pensent que la fermentation pourrait aussi jouer un rôle dans ce sens (Mensah 1997). C'est pour vérifier cela que le projet « lait sain pour le sahel », a initié une étude pour évaluer le taux de survie des brucelles dans le lait fermenté, afin de mieux évaluer les risques de contamination de l'homme dans toute la gamme de produits laitiers (Bonfoh et al, 2002).

Si l'on sait que la prévalence de certaines pathologies transmissibles à l'homme comme la brucellose ne sont pas négligeables au sein des troupeaux, il n'est pas utopique de penser que les risques de contamination de l'homme à travers les denrées d'origine animale comme le lait soient réels. C'est pourquoi tout doit être fait pour déceler et évaluer les facteurs de risque de contamination de l'homme et y remédier.

Des actions d'amélioration de l'hygiène, bien que timides ont été menées sur la filière laitière, particulièrement au niveau de la traite, de la conservation et du transport du lait.

Elles ont consisté à organiser des séances de traites dirigées par des spécialistes. Les objectifs étaient d'attirer l'attention des producteurs sur les mesures d'hygiène à la traite et après la traite. L'utilisation du matériel propre et désinfecté, la désinfection de la mamelle des vaches, des trayons, de la main du trayeur, des récipients de collecte et de transport...

Au total, la production de lait au Mali est insuffisante pour satisfaire les besoins de la consommation locale. Pour combler le déficit, le Mali est obligé d'importer du lait. Cette denrée très prisée par le consommateur malien, est consommée frais, mais surtout après transformation. Le projet « *lait sain pour le sahel* » s'est fixé pour objectif d'évaluer la qualité microbiologique du lait et de ses dérivés livrés à la consommation humaine. L'étude de la

qualité du lait fermenté rentre dans les aspects de cette étude. C'est pourquoi la deuxième partie sera consacrée à l'effet de la fermentation du lait sur la présence des *Brucella* et des anticorps anti-brucelliques dans le lait fermenté.

**DEUXIEME PARTIE**

**EFFET DE LA FERMENTATION DU LAIT SUR LA**

**PRESENCE DES *BRUCELLA* ET DES ANTICORPS ANTI-**

**BRUCELLIQUES**

## **I - MATERIEL ET METHODES**

### **I-1 – Zone de l'étude**

L'étude a été effectuée de 2001 à 2003 au Mali dans le cadre du projet « Lait Sain pour le Sahel ». Les recherches ont été effectuées dans le District de Bamako et ses environs ( sur un rayon de 100 km), mais aussi dans les régions de Mopti, Ségou, Sikasso et Tombouctou. Les centres de production ont été choisis au hasard dans un lot d'élevages identifiés sur une base participative et les points de ventes retenus sont ceux identifiés à Bamako.

### **I-2 - Matériel et méthodes sur le terrain**

#### **I-2-1 Matériel de prélèvement :**

Il s'agit du matériel classique de prise de sang, comprenant entre autres :

Aiguilles de prélèvement de sang, tubes de type « Venoject » sous vide sans anticoagulant ; portes aiguilles ; porte tubes ou portoirs ; sachets en plastic ; flacons stériles de 500ml pour le prélèvement du lait frais et du lait fermenté, glacière avec conservateur de froid(liquide réfrigérant), pissette d'alcool de 100ml, gants en plastic, papier hygiénique et serviette

#### **I-2-2 Méthode de prélèvement :**

Elle concerne les prélèvements de sang et de lait.

Les prélèvements de lait sont effectués de façon aseptique au niveau des centres de collecte, sur les points de vente et dans les fermes de production et conditionnés dans les flacons stériles.

Dans les fermes de production les bergers assurent la contention des animaux. Le sang est prélevé à la veine jugulaire dans des tubes secs sans anticoagulant. Le lait est prélevé aux trayons dans des flacons ou des tubes à essai stériles. Le sang est maintenu à la température ambiante alors que le lait est mis en glacière pendant toute la durée du travail et du transport au laboratoire.

### **I-3 - Matériel et méthode au laboratoire**

#### **I-3-1 Équipements de laboratoire :**

Il s'agit du matériel et de l'équipement normal dans un laboratoire de bactériologie et de sérologie.

#### **I-3-2 Matériel**

-pour l'isolement des bactéries, nous avons utilisé le matériel classique de laboratoire de bactériologie

-pour la sérologie : Matériel classique de laboratoire de sérologie à savoir l'agglutination rapide sur lame pour le sérum et en tube pour le lait et un lecteur ELISA pour le titrage des anticorps dans le sérum et les laits.

#### **I-3-3 Méthodes**

##### **A - bactériologie : isolement des brucelles dans le lait**

Les échantillons positifs au test de l'anneau et à l'ELISA ont été cultivés en vue d'un isolement de *Brucella abortus*

L'isolement et l'identification des germes à partir du lait ont été effectués sur des milieux appropriés. Pour l'isolement des *Brucella*, n'ont étéensemencés que les prélèvements venant d'animaux positifs en sérologie brucellique.

L'identification des *Brucellas* a été effectuée par agglutination avec du sérum anti *Brucella abortus* de référence.

Le lait de ferme et le Rapilait® ont été soumis à un contrôle bactériologique (dénombrement) de germes en Bactériologie alimentaire. Un millilitre de ferment lactique est utilisé pour ensemencher chaque flacon contenant 100ml respectivement du Rapilait® et du lait de ferme. Les solutions tamponnées n'ont pas reçu de ferment (tableau 1 page 16).

Les trois solutions (Rapilait®+ferment, Lait de ferme+ferment, solutions tamponnées) ont étéensemencées avec 1 ml de la suspension de souche de *Brucella*. Une partie est placée à l'étuve à 37° et l'autre dans le réfrigérateur (+4°C) pendant 7 jours (J0 à J7). Chaque jour 0,5 ml de chaque solution est prélevée après homogénéisation pour ensemer sur les milieux de culture de *Brucella*. Pour chaque flacon deux géloses en boîtes de pétri sont utilisées.

**Tableau 1** : Ensemencement des différents laits et tampon à l'aide des souches de *Brucella*

Milieux	Quantité	Ambiance	Ferment	Colonies Brucella ensemencé	Incubation
Rapilait® reconstitué	100 ml	37°C	1 ml	3x10 <sup>8</sup> ufc	J0 à J7
	100 ml	+4°C	1 ml	3x10 <sup>8</sup> ufc	J0 à J7
Lait de ferme	100 ml	37°C	1 ml	3x10 <sup>8</sup> ufc	J0 à J7
	100 ml	+4°C	1 ml	3x10 <sup>8</sup> ufc	J0 à J7
Tampon à différent pH (n=6)	6x100 ml	37°C	0 ml	6x3x10 <sup>8</sup> ufc	J0 à J7
	6x100 ml	+4°C	0 ml	6x3x10 <sup>8</sup> ufc	J0 à J7

**Ufc= unité formant colonie**

### **B - Serologie :**

Les sérums sont testés directement au rose Bengale et en ELISA ; le lait frais a subit le test de l'anneau (Ring test) et le test de l' ELISA. Le lait fermenté est évalué en ELISA-anticorps comme le lait frais et le sérum.

Le Kit ELISA du sérum et du lait est utilisé conformément aux recommandations du fabricant (Bommeli, 1998a, Bommeli 1998b). A cause de la température élevée dans le

laboratoire (26-30°C), la réaction est modifiée et est arrêtée entre 15 et 25mn. Un agitateur est utilisé pour homogénéiser le lait fermenté. Certains échantillons sont centrifugés et leur petit lait ou (lactosérum) est testé.

L'effet de la dilution est testé avec des échantillons de lait fortement positif(%OD=260) et du sérum hyper immune de lapin (%OD s'étend de 392-505) dilué dans du lait frais négatif et fermenté.

#### **a) Techniques du test au Rose Bengale et du test de l'anneau**

Ce sont celles décrites par ALTON et JONES (1988). Les cas positifs à ces tests sont soumis au test de l'ELISA pour la confirmation du résultat.

#### **b) Technique ELISA**

##### *b1) ELISA-sérum*

Nous avons utilisé le CHEKIT\_BRUCELLOTEST qui est un test immuno enzymatique (ELISA) pour la détection des anticorps dirigés contre *B. abortus* responsable de la brucellose bovine. Les anticorps spécifiques sont détectables dans les échantillons de sérums individuels.

##### **Principe et description du test**

Les cupules de la plaque de microtitration de du CHEKIT-BRUCELLOTEST sont sensibilisées avec l'antigène inactivé qui se lie spécifiquement aux anticorps dirigés contre *Br. abortus*. Si l'échantillon contient des anticorps anti *B. abortus*, ceux-ci se combinent avec l'antigène inactivé fixé dans les cupules. Les anticorps de l'échantillon liés aux cupules sont détectés avec le conjugué CHEKIT-Anti-IgG-Ruminant marqué à la peroxydase qui oxyde la solution chromogène-CHEKIT. Il apparaît en une coloration verte.

L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques de l'échantillon retenus dans les cupules, l'utilisation d'une seule dilution de l'échantillon à



tester est suffisante dans l'appréciation des résultats. Le résultat est apprécié par comparaison des densités optiques (OD) obtenues pour les échantillons et les contrôles positif et négatif (voir protocole en annexe).

### **Lecture des résultats**

Les résultats des réactions colorimétriques sont lus sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405nm (longueur d'onde de référence = 492nm). Pour la **validation** de la manipulation, la différence des densités optiques entre les contrôles positif et négatif doit être supérieure ou égale à 0,3 après 25 minutes. La DO du témoin négatif ne devrait pas dépasser 0.3. La DO du témoin positif ne devrait pas dépasser 1.8.

### **Interprétation des résultats**

La moyenne des valeurs de la densité optique (OD) des échantillons testés en double est calculée. Les valeurs moyennes de densité optique des échantillons ( $DO_{éch}$ ) et du contrôle positif ( $DO_{pos}$ ) sont corrigées par la soustraction de la valeur moyenne de densité optique du contrôle négatif ( $DO_{nég}$ ). Les valeurs corrigées des échantillons sont exprimées en pourcentage de la valeur corrigée du positif (fixée à 100%) :

$$Valeur\ échantillon\ (VE) = \frac{DO_{éch} - DO_{nég}}{DO_{pos} - DO_{nég}} \times 100\%$$

- Si  $VE < 50\%$ , le résultat est négatif
- $50 \leq VE \leq 75\%$ , le résultat est douteux
- $VE > 75\%$ , le résultat est positif

Lorsqu'un échantillon est testé "douteux", il convient de le re-tester. Le résultat obtenu est définitif (Bommeli 1998b).

### ***b2) ELISA-Lait***

Le même procédé que le sérum est utilisé sauf que l'incubation se fait pendant 90 minutes.

L'interprétation est la suivante :

- Si  $VE < 70\%$ , le résultat est négatif
- $70 \leq VE \leq 100\%$ , le résultat est douteux
- $VE > 100\%$ , le résultat est positif (Bommeli, 1998a).

Le détail technique figure en annexe.

### C- Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel Access.

## II- RESULTATS

### II-1- Résultat des prélèvements effectués sur le terrain :

. Un total de 301 échantillons de lait sont prélevés sur les points de vente de Bamako pour l'isolement des brucelles du lait.,

. Un lot composé de : 17 sérums (1 seul parc), 95 échantillons de lait individuel des vaches (8 parcs) et 43 échantillons de mélange de lait (25 vendeurs) sont utilisés pour déterminer l'effet de la fermentation sur les anticorps anti-brucelliques.

. Une série de 6 flacons tampon phosphate à pH différents, du lait de ferme négatif à la sérologie et du Rapolait (lait en poudre reconstitué) reconstitué, sont utilisés pour évaluer l'effet de la fermentation sur la présence de *Brucella abortus*

### II-2 Résultats de laboratoire

#### II-2-1 Isolement de *Brucella abortus* dans le frais

Sur un total de 301 échantillons de lait prélevés sur les points de vente de Bamako pour l'isolement des brucelles du lait, 34 animaux étaient positifs en sérologie brucellique (test de l'anneau et ELISA-Lait). Ces échantillons ( $n=34$  : lait frais  $n_1=32$  et lait fermenté  $n_2=2$ ) ont étéensemencés sur le milieu de culture sélectif pour *Brucella abortus*, en même temps que des boîtes témoins avec les mêmes souches. 12 prélèvements à sérologie positive ont donné des colonies suspectes de *Brucella*. Cependant l'agglutination avec un antisérum brucellique de

référence s'est révélée négative pour toutes les cultures suspectes. Les espèces bactériennes isolées sur le milieu après passage successif des colonies suspectes sont *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.* et *Bacillus spp.* (tableau 2).

**Tableau 2:** Germes isolés dans le lait et les produits laitiers à Bamako

Nombre de cultures suspectes	Culture	
	Brucelles	Autres
12	Néant	<i>Pseudomonas spp</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Bacillus spp</i>

## II-2-2 Effet de la fermentation du lait sur les anticorps brucelliques et les corps

### bactériens

#### a) Détection des anticorps dans le lait fermenté

Trois échantillons de lait frais venant d'animaux à sérologie positive (Rose Bengale et ELISA-serum) sont positifs à la fois aux tests de test de l'anneau(23,9%) et de l'ELISA(21,7%). Trois échantillons de lait fermenté sont aussi positifs au test de l'ELISA.

La proportion de cas positifs(39,5%) à l'ELISA dans les mélanges de lait est significativement plus élevée que dans les laits individuels (13,7%). Les 5,8% de cas suspects enregistrés peuvent être considérés comme positifs surtout dans les échantillons de mélange de lait (9,3%).

Le pH moyen du lait frais est de  $7,04 \pm 0,17$ (min= 6,5, max=8), et la moyenne de température est de  $26,7 \pm 1,8$  (min=25, max=29°C). Le pH du lait conservé au réfrigérateur à 4-8°C reste à 7,00 pendant 4 jours et descend à 6,5 à partir des jours 6 et 7. Le pH du lait fermenté descend à 4,5, 4,0 et 3,5 respectivement aux jours 4, 6 et 7. Le tableau 3 montre l'effet du pH et de la température sur les résultats de l'ELISA sur le lait frais et sur le même lait après fermentation.

**Tableau 3:** Variation du pH et de la moyenne de la densité optique (%OD) du lait frais et du lait fermentés au cours du temps.

Lait	Paramètres	Jour 1 (frais)	Jour 2	Jour 3
Frais	Température	27	4	4
	(°C)	7	7	7
	pH	192	187	178
	%OD	30	28	29
	Positifs (n)			
Fermenté	Température	27	26	27
	(°C)	7	5	4,2
	pH	192	180	156
	%OD	30	26	24
	Positif (n)			

Le nombre d'échantillons positifs et la moyenne de la DO du jour 1 au jour 3 ne varie pas significativement ( $X^2 < 3,84$ ) aussi bien sur le lait frais que sur le lait fermenté. Nous avons aussi observé qu'il n'y a pas de variation significative de la densité optique (OD) sur les échantillons de lait conservés au réfrigérateur (+4°C) pendant 7 jours. Cependant il y existe une augmentation significative ( $X^2 > 5,2$ ) de la DO sur le petit lait ou lacto-sérum aux 2e et 4e jour où le pH est respectivement de 5,00 et 4,5. L'absorption baisse significativement à la fois sur le lacto-sérum et le lait fermenté homogénéisé quand le pH décroît (de 4,5 à 4,0 ou 3,5 pour le lacto-sérum et 4,00 à 3,5 pour le lait fermenté homogénéisé). Ces résultats montrent que l'abaissement du pH réduit de 70 à 80% les résultats de l'ELISA.

#### *Détection des Brucella dans le lait fermenté*

*Brucella abortus*ensemencé dans les différents tampons n'a pas poussé, car le milieu ne contenait aucun élément nutritif permettant sa survie. L'inhibition de *Brucella abortus* est liée

à la composition du milieu mais aussi au pH. La confirmation de ces hypothèses est obtenue en partie dans les résultats du lait frais et du Rapolait incubé à +4°C (tableau 7 page 24). De J0 à J5, toutes les boîtes ont présenté des unités de formation de colonies autour de  $1,5 \times 10^6$ .

Les boîtesensemencées avec le lait à J0 présentent une très forte contamination (levures contenues dans le ferment) qui empêche l'observation des colonies de *Brucella abortus*. Ce phénomène s'observe aussi bien avec le lait de ferme qu'avec le Rapolait.

*Brucella abortus* a une vitesse de croissance lente. Les colonies ne sont visibles qu'à partir de J3 ; mais sont difficilement détectables du fait des contaminations par des levures.

La mise en évidence des colonies se précise mieux à J3 avec un nombre difficilement quantifiable sur les boîtes de pétri ( $\leq 1,5 \times 10^6$  ufc) s'il n'y a pas eu de contamination.

Par la suite, on note une baisse considérable (3000 fois moins) du nombre de colonies en J4 ( $0,5 \times 10^3$  ufc) avec une disparition de ces colonies à partir de J5 jusqu'à J7 dans les deux milieux (tableau 5 et 6 ci-dessous).

**Tableau 4:** Qualité micro biologique des produits laitiers soumis à la fermentation

Dénombrement	Lait cru de ferme	Lait reconstitué (Rapolait)
	Ufc.ml <sup>-1</sup>	Ufc.ml <sup>-1</sup>
Germes totaux		
	6,4 10 <sup>6</sup>	<10
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,4 10 <sup>5</sup>	<10
Enterocoques	1,6 10 <sup>5</sup>	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10	<10
Levures	9,3 10 <sup>4</sup>	<10
Moisissures	3,4 10 <sup>4</sup>	<10

Le lait de ferme est plus riche en flore bactérienne que le lait reconstitué (Rapolait) qui est stérilisé.

**Tableau 5:** Survie des brucelles dans le lait frais fermenté

<b>Jours</b>	<b>Température ambiante du lait</b>	<b>pH</b>	<b>intensité de croissance</b>	<b>Moyennes des colonies</b>
J0	23°C	6,8	+	<10
J1	37°C	5,5	+	0,3 10 <sup>2</sup>
J2	37°C	5	+++	≤1,5 10 <sup>6</sup>
J3	37°C	4,5	+++	≤1,5 10 <sup>6</sup>
J4	37°C	4,4	++	0,5 10 <sup>3</sup>
J5	37°C	4	-	<10
J6	37°C	4	-	<10
J7	37°C	4	-	<10

La croissance des *Brucella* est lente, les colonies ne sont visibles qu'au delà de 48 heures

**Tableau 6:** Survie des brucelles dans le Rapilait® à 37°C.

<b>Jours</b>	<b>Température ambiante du lait</b>	<b>pH</b>	<b>Pousse</b>	<b>Moyennes des colonies</b>
J0	23°C	6,5	+	<10
J1	37°C	5	+	5,1 10 <sup>2</sup>
J2	37°C	4,7	+++	4,5 10 <sup>2</sup>
J3	37°C	4,4	+++	4,04 10 <sup>3</sup>
J4	37°C	4,4	++	1,07 10 <sup>3</sup>
J5	37°C	4,4	+	1,8-10 <sup>2</sup>
J6	37°C	4	-	<10
J7	37°C	4	-	<10

. La baisse du pH est fatale pour les contaminants, surtout les moisissures (pH 6 à 5) puis pour les *Brucella* (pH 4.5).

**Tableau 7:** Suivi de la survie des brucelles dans le Rapilait à 4°C

<b>Jours</b>	<b>Température ambiante du lait</b>	<b>pH</b>	<b>Pousse</b>	<b>Moyennes des colonies</b>
J0	23°C	6,5	+	<10
J1	4°C	6,5	+	4,4-10 <sup>2</sup>
J2	4°C	6,5	+	4,1 10 <sup>2</sup>
J3	4°C	6,5	+	2,9 10 <sup>2</sup>
J4	4°C	6,5	+	3,5 10 <sup>2</sup>
J5	4°C	6,5	+	1,1-10 <sup>2</sup>
J6	4°C	6,5	-	<10
J7	4°C	6,5	-	<10

Le lait conservé à +4° ne présente pas de variation de pH au cours du temps ; cependant la moyenne des unités formant colonie diminue au cours du temps.

### III- DISCUSSIONS ET RECOMMANDATIONS

#### III-1 Discussions

##### III-1-1 Matériel et méthodes

Le lait est choisi comme matériel de travail pour répondre à l'esprit du Projet « Lait sain pour le Sahel » qui est l'amélioration de la qualité hygiénique du lait . Le nombre de 301 échantillons peut ne pas être significatif par rapport à l'effectif du cheptel du Mali, mais il est suffisant sur le plan statistique pour attirer l'attention des pouvoirs publics et des consommateurs sur les risques encourus par les consommateurs de lait frais.

Le kit de Bommeli a été retenu pour le test ELISA dans cette étude, pour confirmer les cas positifs aux tests de l'anneau et du Rose Bengale, à cause de sa spécificité et sa facilité d'exécution.

L'étude de l'isolement de *Brucella abortus* dans le lait a porté sur 301 échantillons prélevés aussi bien dans le District de Bamako que dans les régions.

### III-1-2 Résultats

Le résultat sérologique négatif sur le lait homogénéisé au 7<sup>e</sup> jour suggère une dénaturation des anticorps à un pH bas ou acide (figure 1 page 27), ou la tendance des grumeaux de lait peut avoir empêché la fixation des anticorps sur les antigènes.

Une baisse du pH à 4,5-4,0 provoque une baisse de la sensibilité du test ELISA sur les laits frais et fermenté respectivement de 89,7 et 80%. En conséquence, dans certains cas un test négatif sur du lait fermenté peut être un faux négatif. En dessous du pH 4,0 on estime que les anticorps sont dégradés. Ainsi le résultat d'une recherche d'anticorps sur du lait fermenté doit être interprété avec beaucoup de précaution, sachant que la sensibilité est plus faible par rapport au lactosérum.

Les résultats du test de l'ELISA sur du lait frais et du lait fermenté peuvent donner des faux négatifs ; c'est la cas principalement du lait du marché où l'effet de la dilution par mouillage est très forte. L'utilisation de l'ELISA pour la détection des anticorps brucelliques dans le lait fermenté donne de bons résultats jusqu'à un pH limite de 4,5. Ces résultats permettent de déterminer la prévalence en anticorps brucellique du lait fermenté.

L'isolement des brucelles à partir du lait frais n'est pas facile. Le résultat dépend entre autre, du moment du prélèvement, car l'excrétion des brucelles dans le lait n'est pas continue, mais aussi de beaucoup d'autres facteurs. L'excrétion des brucelles est élevée autour de la mise bas.

Les facteurs favorisant l'échec d'isolement, sont le stade avancé de lactation, le mélange du lait d'un ou de plusieurs troupeaux, la quantité de lait prélevée, le mouillage du lait,



l'utilisation d'antibiotiques, la forte contamination par d'autres bactéries (germes totaux =  $10^7$  ufc/ ml) qui inhibent la croissance des *Brucella*, la fermentation ou le chauffage du lait.

Si la corrélation entre la présence d'anticorps et la présence de germes n'est pas établie dans cette étude, il est prouvé que la présence des anticorps peut être intimement liée à celle des bactéries. Toutefois, la présence d'anticorps peut effectivement ne pas corrélérer avec la présence des brucelles à cause des réactions croisées possibles avec d'autres bactéries comme les *Bacillus* par exemple. Par ailleurs la brucellose humaine est bien décrite au Mali (Ag-Ikatakhit, 1988, Tasei et al, 1992, Steinmann, 2003) où une partie de la population consomme le lait non pasteurisé. L'évaluation du risque de la brucellose chez les consommateurs de lait et de produits laitiers passe par l'isolement des agents (*Br. abortus* et *Br. melitensis*) dans ces produits pour effectivement prouver la transmission. Les travaux d'isolements des brucelles des liquides d'hygroma ont été effectués par Akakpo (1987) et Tounkara et al. (1994) et ont permis d'isoler et d'identifier quatre souches de brucelle au Mali. La mise en évidence de ces brucelles prouve l'existence du risque de contamination pour les professionnels de la filière laitière et les consommateurs de lait cru.

L'effet de la dilution du lait frais et du lait fermenté sur les résultats du test de l'ELISA indique la possibilité d'obtenir des faux négatifs principalement sur du lait de marché où l'effet de la dilution est très forte. Les résultats montrent que l'acidité influence négativement la survie des bactéries. Cela peut être dû, à l'abaissement du pH du lait ou tout simplement à la lenteur du développement de *Brucella abortus*. En outre, il existerait une phase d'adaptation (période de latence) de la bactérie dans son nouveau milieu (lait frais et Rapilait).

Les résultats montrent que *Brucella abortus* résiste à l'effet de la fermentation jusqu'à un pH minimum de 4,4 au-dessous duquel sa présence n'est plus détectée dans le lait fermenté. En dessous d'un pH de 4,5 les sucres et les protéines sont fortement dégradés. Ce milieu ne

permettrait plus la survie de *Brucella abortus*. De plus l'inhibition peut être aussi due à l'effet de l'acidité du lait fermenté et à l'épuisement du milieu de culture en nutriments.

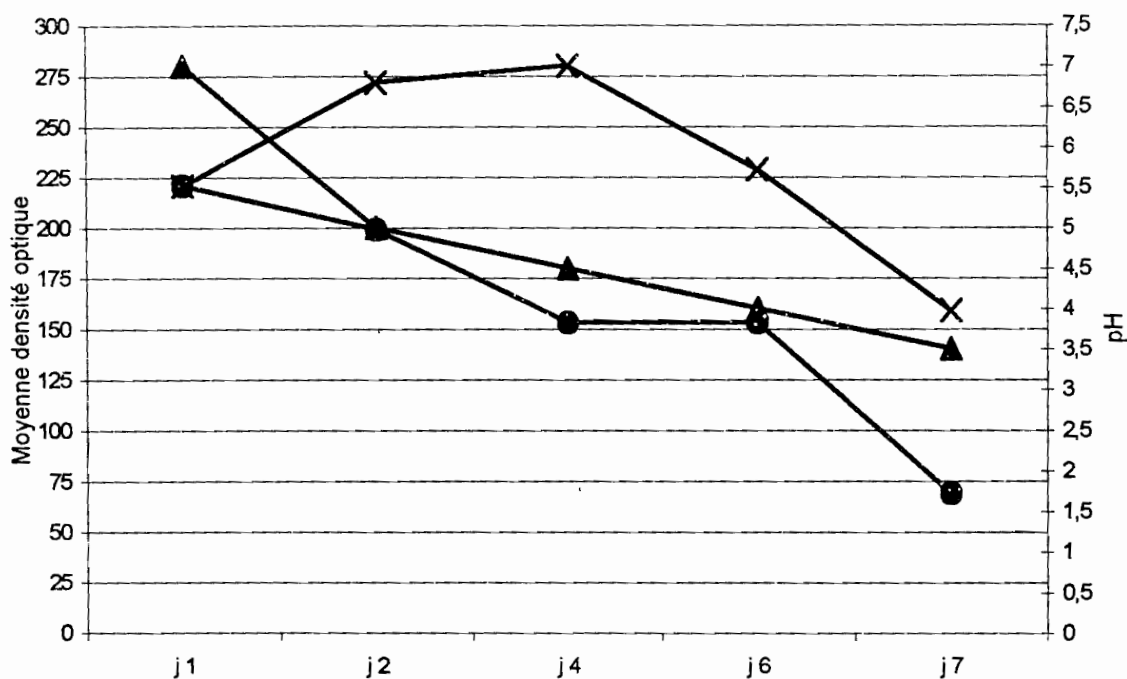


Figure 1: Variation de la Densité Optique (%DO) avec le pH sur le lacto-sérum et le lait fermenté homogénéisé à la température ambiante pendant 7 jours.

Les résultats de l'étude sur la survie des brucelles dans le lait fermenté, montrent une forte diminution du nombre de colonie à un pH inférieur ou égale à 4,4 dans les conditions de laboratoire. Dans les conditions normales, ce pH ne peut être obtenu qu'après 3-4 jours de culture. Les modes de consommation et la forte demande en produits laitiers font que le lait fermenté est consommé en 24-48 heures. Le pH critique peut ne pas être atteint et donc le risque que d'infection pour le consommateur existe toujours, quand le lait provient d'une vache brucellique. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de Steinmann (2003) qui a montré que 10,1% des patients fébricitants consommateurs de lait (frais ou caillé) étaient positifs à la brucellose.

## **III-2 Recommandations**

Nos recommandations s'adressent à l'éleveur, aux vendeurs de lait, aux consommateurs et à l'Etat

### **III-2-1 Les éleveurs**

Les éleveurs doivent savoir qu'à travers leur production, ils peuvent mettre sur le marché des produits dangereux pour le consommateur, mais aussi se contaminer eux-même au contact de leurs animaux malades ou infectés. C'est pourquoi il est nécessaire de faire suivre les troupeaux par des techniciens de l'élevage, d'appliquer la prévention des principales maladies infectieuses du bétail et de respecter les règles d'hygiène de l'élevage et de la traite.

### **III-2-2 Les transformateurs et commerçants de lait et de ses dérivés.**

Il faut se garder du mouillage du lait mais aussi bien respecter les règles d'hygiène et la chaîne de froid

### **III-2-3 Les consommateurs**

Les consommateurs doivent être conscients qu'ils peuvent s'infecter à travers la consommation des produits animaux et particulièrement à travers la consommation des laits frais ou fermenté. C'est pourquoi ils doivent être regardant sur la qualité des produits laitiers qu'ils achètent et ne pas seulement donner la priorité aux prix peu élevés des denrées. Dans les zones d'endémie, il serait bon de chauffer le lait avant sa consommation.

### **III-2-4 L'Etat**

L'Etat doit s'investir dans :

- la sensibilisation des populations vis à vis des zoonoses transmissibles par consommation de denrées alimentaires, particulièrement du lait et de ses dérivés,
- la formation et la sensibilisation des acteurs de la filière laitière,
- le contrôle permanent de la qualité des produits laitiers.

## CONCLUSION :

Les 301 échantillons de lait que nous avons examinés, sans être représentatif du cheptel malien, permettent d'attirer l'attention des pouvoirs publics sur les risques de contamination que courent les consommateurs de lait. Les travaux menés dans le cadre de cette étude montrent que certaines pratiques en amont et en aval de la traite réduisent les chances d'isolement des brucelles dans le lait frais ou le lait fermenté.

Les résultats de la fermentation du lait montrent que la technique ELISA peut être utilisée pour détecter les anticorps anti-Brucella. Toutefois, nous conseillons de travailler sur du lactosérum dont le pH est supérieur à 4,5. Il est donc possible de poser un diagnostic de brucellose à partir du lait fermenté, technique inédite jusqu'à présent. L'utilisation du Kit-ELISA, pour la détection des anticorps brucelliques dans les laits et sérum, ouvrent des perspectives de diagnostic et de contrôle de la brucellose dans les zones rurales où la chaîne de froid fait défaut et où le lait fermenté est le plus consommé.

L'étude de la survie de brucelles dans le lait fermenté montre que ceux-ci résistent à l'effet de la fermentation jusqu'à un pH de 4,5. La fermentation n'offre pas une garantie de sécurité pour les consommateurs contre l'infection brucellique car la durée de conservation du lait fermenté ne dépasse pas 48h dans les conditions habituelles. La fermentation ne stérilise pas le lait brucellique.

En l'absence de toute décision politique visant à éradiquer la brucellose dans le cheptel malien, la sensibilisation de nos populations sur les risques de contamination par consommation du lait cru et la vulgarisation du traitement thermique du lait frais s'imposent. Le contrôle de la qualité du lait et des produits laitiers doit être de rigueur. Dans l'attente des mesures plus rigoureuses, la pasteurisation reste le seul moyen d'application facile, pour minimiser les risques d'infection brucellique à partir de la consommation du lait. Le chauffage avant la fermentation devient donc impérieux pour diminuer les risques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. AG-IKATAHIT, A.: Etat actuel des connaissances sur la brucellose au Mali. A propos de 24 cas observés en médecine interne (Hôpital du Point G) In Th. Doc. Méd. Vét. ENMP, Bamako, Mali (1988)
2. AKAKPO A.J. & BORNAREL P. (1987). Epidémiologie des brucelloses animales en Afrique tropicale : enquêtes clinique, sérologique et bactériologique. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 6 (4 ): 981-1027.
3. AKAKPO A.J. (1987). Brucelloses animales en Afrique tropicale. Particularités épidémiologique, clinique et bactériologique. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trp. 40 (4) : 307-320.
4. ALTON G.G & JONES L.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National Recherche Agronomique, Paris, 43-44pp
5. BOMMELI, A.G (1998a). In CHEKIT® Brucellose milk instructions, Bern, A.9 version 0, 1-5
6. BOMMELI, A.G.(1998b) In CHEKIT® Brucellose serum instructions, Bern, A.8 version 0, 1-5
7. BONFOH B., FANE A., TRAORE, N.A., COULIBALY Z., SIMBE C.F., ALFAROUK I.O., NICOLET J., FARAH Z. AND ZINSTAG J. (2002) Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le distrit de Bamako au Mali . Bioterre N° spécial: 242-250
8. COULIBALY M D. (2002). La production laitière au Mali. In Bonfoh B. (2002). Hygiène et Qualité du lait et des produits laitiers au Mali : Implications en production laitière et en santé publique. Atelier de restitution projet << Lait sain pour le Sahel >>, LCV-INSAH/STI-ETH 59p.
9. COULIBALY, A.. (1992): Contribution à l'étude de la brucellose bovine au Mali, cercle de Youvarou. Th. Doc, Méd. Vét. ENVL, n° 77 p 127
10. DEBRAH, S., SISSOKO, K., SOUMARE, S. (1995).: Etude économique de la production laitière dans la zone périurbaine de Bamako au Mali. Revue Elev. Méd. vét. Pays Trop. 48 (1), 101-109.

11. DIAGANA, B., AKINDES, F., SAVADOGO, K., REARDON, T., STAATZ, J. (1999). Effects of the CFA franc devaluation on urban food consumption in West Africa: overview and cross-country comparisons, *Food Policy* 24:465
12. DNSI (1999). Statistiques annuelles des importations de produits alimentaires au Mali. Direction National des Statistiques, Bamako Mali.
13. FAO (1964) Joint FAO/ WHO Expert committee on brucellosis. Fourth Report N°. 289.65 p.
14. GRAN, H.M., MUTUKUMIRA, A.N., WETLESEN, A. and NARVHUS, J.A. (2002). Smallholder dairy processing in Zimbabwe: The production of fermented milk products with particular emphasis on sanitation and microbiological quality. *Food Control* In Press.
15. HETZEL M. (2003). The public health impact of milk contamination in Bamako, Mali: Risk factors for food-borne toxi-infections. MSc Thesis, University of Basel.59 p.
16. MENSAH, P. (1997) Fermentation - the key to food safety assurance in Africa? *Food Control* 8, 271-278.
17. MEYER M. E. (1985). Characterization of *Burcella abortus* strain 19 isolated from human and bovine tissue and fluids. *Am. J. Vet. Res.* 46: 902-904.
18. PEREZ-AVRAHAM G., YAGUPSKY P., SCHLAEFFER F., BORER A., CAISERMAN S., RIESENBERG K. (2001). Zoonotic infections as causes of hospitalization among febrile bedouin patients in southern Israël. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygien* 95 : 301-303.
19. PRADERE J.P. ET SIDIBE S. (1989). Etude du cheptel bovin malien. Evolution- Structure des troupeaux- Productivité. Direction Nationale de l'Elevage. Bamako, Mali.
20. STEINMANN P. (2003). Brucellosis and Q-fever in Mali: Case detection, role of milk contamination and other risk factors. Diploma Thesis. Biology I, University of Basel. 77 p.
21. TAMBOURA E.H. & SANGARE I. (2002) La transformation et l'industrie laitières au Mali. In Bonfoh B.. Hygiène et Qualité du lait et des produits laitiers au Mali : Implications en production laitière et en santé publique. Atelier de restitution projet << Lait sain pour le Sahel >>, LCV-INSAH/STI-ETH 59p.

22. TASEI, J.-P., RANQUE, P., BALIQUE H., TRAORE, A.M., QUILICI, M.C.(1992): La brucellose humaine au Mali. Résultats d'une enquête séroépidémiologique. *Acta Tropic.* 39 253–264
23. THIENTA.C.A.T (1996) Filières laitières au Mali-contribution à l'étude de la filière péri-urbaine à Bamako. Thèse de Doctorat Vétérinaire, présentée et soutenue publiquement devant l'université Paul Sabatier de Toulouse.
24. TOUNKARA, K., MAIGA, S., TRAORE, A., SECK, B.M., AKAKPO, A.J. (1994). Epidémiologie de la brucellose bovine au Mali : enquête sérologique et isolement des premières souches de *Brucella abortus*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*13 (3) 777–786.
25. WAELTI, P. (2002) Disponibilité, consommation, transformation et commercialisation du lait de petits ruminants dans la Commune rurale de Cinzana. Rapport de stage effectué à la station de Recherche Agronomique de Cinzana, pour le compte de la fondation Norvartis pour le développement durable et de l'Institut d'économie Rural du Mali, Haute Ecole Suisse d'Agronomie.
26. WAGENAAR K.T., DIALLO. A ET SAYERS A.R. (1988). Productivité des bovins Peuls transhumants dans le Delta interieur du Niger au Mali. Rapport de Recherche N°13 CIPEA, Addis Abeba, Ethiopie.
27. WILSON R.T.(1988). La production animale au Mali central : Etudes à long terme sur les bovins et les petits ruminants dans le système agropastoral. Rapport de recherche N°14,CIPEA. Addis Abeba, Ethiopie.

## ANNEXES

### I- SEROLOGIE

#### ELISA lait et sérum

##### Réactifs

- Plaque de microtitration CHEK-BRUCELLOTTEST mono cupule est sensibilisée avec de l'antigène lipo-poly-saccharidique de *Br. abortus*.
- Conjugué CHEKIT-Anti-IgG-Ruminant, monoclonal, marqué à la peroxydase.
- Témoin négatif CHEKIT-BRUCELLOTTEST.
- Témoin positif CHEKIT-BRUCELLOTTEST.
- Solution de dilution et de lavage CHEKIT-10x concentrée.
- Solution chromogène CHEKIT prête à l'emploi, à conserver à l'abri de la lumière.
- Solution d'arrêt CHEKIT prête à l'emploi.

##### Mode opératoire

Le volume nécessaire de solution de lavage et de dilution est préparé à partir du liquide CHEKIT-10x-concentré: Un volume de liquide de lavage et de dilution CHEKIT-10x-concentré est ajouté à 9 fois son volume d'eau distillée (1vol. dans 10 vol.). Cette solution doit être fraîchement préparée avant chaque utilisation. Lorsque la solution est préparée dans les conditions stériles (utilisation de pipettes stériles, d'eau distillée et de récipients stériles, prélèvement des volumes utilisés dans les conditions stériles) elle peut être conservée pendant 7 jours entre +4°C et +8°C.

##### Dilution, distribution et incubation des échantillons et des contrôles

Les échantillons de sérum et les contrôles sont dilués au 1:200 dans un tube à essais avec la solution de lavage et de dilution CHEKIT, 200µl d'échantillons et de contrôles sont distribués dans les cupules respectives. Les plaques sont agitées brièvement pour homogénéiser les solutions.

La micro plaque est couverte et incubée pendant 60 minutes ( $\pm$  5mn) en chambre humide à température ambiante. Des températures d'incubation plus basses nécessitent une durée d'incubation plus prolongée (Ex. Au réfrigérateur entre +2°C et +8°C) durant la nuit (entre 14 et 18 Heures). Après l'incubation la plaque est lavée trois fois avec la solution de lavage et de dilution CHEKIT (avec au moins 300µl). Les cupules de la micro plaque sont soigneusement vidées.

Le conjugué CHEKIT-Anti-IgG-Ruminant est dilué au 1:200 avec la solution de lavage et de dilution CHEKIT. Dans chaque cupule 200µl de solution de conjugué. La micro plaque est couverte et incubée pendant 30mn ( $\pm$  5 min) à la température ambiante (+18°C à +25°C) en chambre humide. Après l'incubation la plaque est lavée trois fois avec la solution de lavage et de dilution CHEKIT (avec au moins 300µl). Les cupules de la micro plaque sont soigneusement vidées.

Chaque cupule reçoit ensuite 200µl de solution chromogène-CHEKIT préalablement ramenée entre +20 et +25°C. L'ensemble est incubé pendant 10 min ( $\pm$  3 min).

### II- BACTERIOLOGIE

#### La culture des souches de brucelles

##### Préparation du milieu de culture

La gélose Columbia (Difco 0793-17-2+ Suppl. Oxoid (SR 83)) (BRUC) pour brucelles est dilué dans de l'eau distillée à raison de 30g/litre. Le tout est auto clavé à 121 pendant 15 minutes. Il est ensuite refroidi au bain marie à 56°C (tableau 2).



Tableau 1: Schéma de préparation du milieu de culture

	Selon les directives du fabricant
• Préparer les milieux	Bain marie
• Refroidir le milieu à 50°C	
• Diluer le Crystal violet au 1/1000	dans eau distillée stérile
• Ajouter 0,7 ml d'une solution de Crystal violet	par 500 ml de milieu
• 1 flacon de Brucella Selective Supplement (Oxoid SR 83) repris dans 5 ml de méthanol	Pour 500 ml de milieu
• Bien mélanger et couler les milieux	dans les boîtes de pétri
• On peut ajouter également 5-10% de sérum de cheval stérile,	mais ce n'est pas absolument nécessaire
• L'adjonction de Crystal violet n'est pas absolument nécessaire mais a l'avantage de produire des colonies bleuâtres faciles à reconnaître	surtout lorsqu'il y a une forte contamination.

Le contrôle de stérilité se fait par une incubation des boîtes pendant 24h. à 37°C. Si la surface des boîtes est humide, on les sèche à 37°C pendant 15 min. Les boîtes sont ouvertes, renversées et inclinées. Les milieux de culture stériles sont conservés pendant 2 semaines au réfrigérateur.

### Préparation de l'inoculum

Vingt (20 ml) millilitre de lait ou autre matériel biologique sont recueillis dans des tubes à vis stériles. Ces tubes sont centrifugés à 2000 tours pendant 15 minutes à +4°C. La crème et le sédiment sont recueillis puis mélangés après avoir transvasé le lait écrémé. Cette solution sert d'inoculum pour l'isolement des brucelles.

### Ensemencement

Avec une anse de platine stérile on prélève 0,1 à 0,2 ml d'inoculum qu'on étale à la surface du milieu de culture. Au moins des duplicatas de deux boîtes de milieu sélectif sont utilisées (une boîte contenant du milieu avec antibiotique et une boîte contenant du milieu avec antibiotique plus éthyle violet ou cristal violet).

### Incubation

Les boîtes de pétri ensemencés sont inversées et placées dans une jarre hermétique à CO<sub>2</sub> produit par des sachets de gas-pak. Becher contenant de l'eau y est placée pour minimiser la condensation de l'eau. Le tout est placé dans une étuve à 37°C pendant 5 jours au moins puis on observe les boîtes pour repérer les colonies ressemblant à celles des brucelles.

### Méthode de réparation des souches de brucelles

Deux souches de *Brucella abortus* de référence lyophilisées provenant de la bactériothèque de l'EISMV ont été utilisées (Mali N°96 et Togo N°248). La reconstitution de chaque souche est effectuée dans 1 ml d'eau distillée. Chaque solution est ensuite ensemencée sur le milieu de tryptose supplémenté (bouillon et gélose)

A l'aide de l'anse de platine stérilisée à la flamme d'un bec bunsen une goutte de la suspension de la souche est déposée dans un tube de bouillon et sur le milieu de culture contenu dans une boîte de pétri, puis étalée sous forme de stries. Les tubes inoculés et les boîtes ensemencées sont ensuite placés dans une jarre puis étuvés à 37°C pendant 4 à 15 jours pour maximiser le nombre de colonies.

Au bout de 5 jours d'incubation, les boîtes sont examinées pour déceler la présence de toute colonie ressemblant à celles des brucelles. Les souches obtenues ont subi des tests de caractérisation pour s'assurer de la fiabilité des souches pour la suite.

Avec les souches testées positives, l'on a constitué une suspension de *Br. abortus* au degré 1 de la gamme de dilution de McFarland, qui correspond à une suspension  $3 \times 10^8$  corps bactériens dans un

millilitre de la solution d'eau physiologique. Une solution de 10 ml a été préparée pour les tests. La conservation des souches se fait comme suit :

- Souches de contrôle: suspension dense dans les aliquotes de 0,5 ml à  $-20^{\circ}\text{C}$  sinon culture sur gélose inclinée à  $4^{\circ}\text{C}$  et repiquage tous les 15 jours.

Souches de brucelles: suspension très dense dans 1 ml de " sérum de veau fœtal ", puis congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Technique d'évaluation de l'effet de la fermentation sur les brucelles

L'étude de la survie des brucelles est effectuée dans les solutions tampons à différents pH (pH 3,5; 4,00; 4,5; 5,00; 5,5; 6,8), le lait cru de ferme provenant de vache négatives aux tests du Rose Bengale et l'ELISA-serum et du lait en poudre reconstitué et stérile. Deux souches *Brucella abortus* de référence lyophilisées provenant de la bactériothèque de l'EISMV ont été utilisées (Mali N°96 et Togo N°248) La reconstitution de chaque souche est effectuée dans 1 ml d'eau distillée, qui est ensuiteensemencée sur le milieu de tryptose supplémenté (bouillon et gélose) Nous avons mené notre étude avec la souche N°248 du Togo à cause de sa culture plus facile

A l'aide de l'anse de platine stérilisée à la flamme d'un bec bunsen une goutte de la suspension de la souche est déposée dans un tube de bouillon et sur le milieu de culture contenu dans une boîte de pétri, puis étalée sous forme de stries. Les tubes inoculés et les boîtesensemencées sont ensuite placés dans une jarre qui est étuvé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 4 à 5 jours pour maximiser le nombre de colonies.

Au bout de 5 jours d'incubation, les boîtes sont examinées pour déceler la présence de toute colonie ressemblant à celles des brucelles. Les souches obtenues ont subi des tests de caractérisation pour s'assurer de la fiabilité des souches pour la suite.

Avec les souches testées positives, l'on a constitué une suspension de *Brucella abortus* au degré 1 de la gamme de dilution de McFarland, qui correspond à une suspension  $3 \times 10^8$  corps bactériens dans un millilitre de la solution d'eau physiologique. Une solution de 10 ml a été préparée pour les tests. La conservation des souches se fait comme suit :

- Souches de contrôle: suspension dense dans les aliquotes de 0,5 ml à  $-20^{\circ}\text{C}$  sinon culture sur gélose inclinée à  $4^{\circ}\text{C}$  et repiquage tous les 15 jours.
- Souches de brucelles: suspension très dense de la souche est faite dans 1 ml de sérum fœtal de veau stérile, puis est congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Technique de fermentation du lait de ferme et du Rapilait® et culture des souches de brucelles

Le lait de ferme et le Rapilait® ont été soumis à un contrôle bactériologique (dénombrement) de germes en Bactériologie alimentaire. Un millilitre de ferment lactique est utilisé pour ensemencer chaque flacon contenant 100ml respectivement du Rapilait® et du lait de ferme. Les solutions tamponnées n'ont pas reçu de ferment (tableau 1).

Les trois milieux (Rapilait®+ferment, Lait de ferme+ferment, solutions tamponnées) ont étéensemencés avec 1 ml de la suspension de souche de *Brucella*. Une partie est placée à l'étude à  $37^{\circ}$  et l'autre dans le réfrigérateur ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) pendant 7 jours (J0 à J7).

Chaque jour 0,5 ml de chaque solution est prélevée, après homogénéisation et contrôle du pH, pour ensemencer le milieu Columbia. Pour chaque flacon deux boîtes de pétri sont utilisées.

Tableau 2: Schéma de fermentation et d'ensemencement des souches de Brucelles

Milieux	Quantité	Ambiance	Ferment	Brucella ensemencé	Incubation
Rapilait® reconstitué	100 ml	$37^{\circ}\text{C}$	1 ml	$3 \times 10^8$ bactéries	J0 à J7
	100 ml	$+4^{\circ}\text{C}$	1 ml	$3 \times 10^8$ bactéries	J0 à J7
Lait de ferme	100 ml	$37^{\circ}\text{C}$	1 ml	$3 \times 10^8$ bactéries	J0 à J7
	100 ml	$+4^{\circ}\text{C}$	1 ml	$3 \times 10^8$ bactéries	J0 à J7
Tampon à différent pH (n=6)	6x100 ml	$37^{\circ}\text{C}$	0 ml	$6 \times 3 \times 10^8$ bactéries	J0 à J7
	6x100 ml	$+4^{\circ}\text{C}$	0 ml	$6 \times 3 \times 10^8$ bactéries	J0 à J7

**Résumé :**

L'étude faite au Mali, a concerné 301 élevages identifiés sur une base participative ; 15 élevages sont choisis au hasard dans ce lot. Des prélèvements de lait frais ont été effectués au niveau de ces élevages. Les laits sérologiquement positifs aux tests de l'anneau et en l'ELISA (test immuno-enzymatique) ont été mis en culture.

Après 5 jours d'incubation à 37°C sous atmosphère CO<sub>2</sub>, les cultures sont négatives pour *Brucella abortus*. Le test de l'ELISA-lait a permis de détecter la présence des anticorps brucelliques dans du lait frais et ou fermenté.

Des cultures de lait frais et du lait reconstitué additionnées de souches de référence de *B. abortus* ont permis l'isolement de *Brucella abortus* sous un pH de 4,5. *Brucella abortus* ne pousse plus si le pH est inférieur à 4,00.

Les cultures en solution de tampons phosphate à différents pH + *Brucella abortus* ne révèlent aucune colonie de *brucella abortus* même aux premiers jours.

La croissance des *Brucella* subit donc l'influence négative de l'acidification du milieu résultant de la fermentation.

**Mots clés :** Lait de Bovin, Fermentation, *Brucella abortus*, Anticorps brucellique, Mali.

**Summary** The effect of milk fermentation on *Brucella abortus* and its antibodies in Mali  
This study took place in Mali, and concerned 30 herds identified on the participative basis ; 15 of them were chosen randomly. Raw milk samples were taken from those herds. Those milk samples serologically positive in ring test and ELISA test were put in culture. After five days incubation at 37°C in CO<sub>2</sub> atmosphere, the culture were negative for *B. abortus* growth. The ELISA milk test allowed detecting the presence of *B. abortus* antibodies in fresh and in fermented milk. Inoculation made with cow milk and with reconstituted milk, to which recorded strain of *B. abortus* was added, did not allowed the isolation of *B. abortus* under the pH 4.5. *B. abortus*, did not grow any more if the pH is lower than pH 4. Inoculation made with phosphate buffer, at different pH added with *B. abortus* did not revealed any colony of *B. abortus* even in the first days. *B. abortus* growth was under the negative influence of media acidification which resulted from the fermentation

**Key words :** Cow milk- Fermentation -*B. abortus* -antibodies- Mali.