

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES
(E.I.S.M.V.)



ANNEE: 2006

N°23

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA QUALITE
MICROBIOLOGIQUE DU LAIT DANS LA FILIERE ARTISANALE
AU SENEGAL**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le **21 juillet 2006** devant la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar pour obtenir le **Grade de**

DOCTEUR VETERINAIRE

(DIPLOME D'ETAT)

Par

Rodrigue Simonet POUEME NAMEGNI

Né le 03 Janvier 1977 à Nkongsamba (CAMEROUN)

JURY

- Président :** **M. Cheikh Saad-Bouh BOYE**
Professeur à la Faculté de Médecine de Dakar
- Directeur de Thèse :** **Mme Rianatou BADA ALAMBEDJI**
Et Rapporteur Maître de conférences agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar
- Membres**
- M. Ayayi Justin AKAKPO**
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar
- M. Ayao MISSOHOU**
Maître de conférences agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar
- Codirecteur de thèse:** **Dr Benoît GARIN**
Médecin Biologiste, responsable du Laboratoire de Biologie Médicale et du Laboratoire de Sécurité Alimentaire et Hygiène de l'environnement.
Institut Pasteur de Dakar

**ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES
ET MEDECINE VETERNAIRES DE DAKAR**

**BP 5077 – DAKAR (Sénégal)
Tél. (221) 865 10 08 – Télécopie (221) 825 42 83**



COMITE DE DIRECTION

LE DIRECTEUR

▫ Professeur Louis Joseph PANGUI

LES COORDONNATEURS

▫ Professeur Moussa ASSANE
Coordonnateur des Etudes

▫ Professeur Malang SEYDI
*Coordonnateur des Stages et
de la Formation Post-Universitaires*

▫ Professeur Justin Ayayi AKAKPO
Coordonnateur Recherches/Développement

Année Universitaire 2005-2006

PERSONNEL ENSEIGNANT

☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT EISMV**

☞ **PERSONNEL VACATAIRE (PREVU)**

☞ **PERSONNEL EN MISSION (PREVU)**

☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV**

☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT DEA - PA**

PERSONNEL ENSEIGNANT

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PRODUCTIONS ANIMALES

CHEF DE DEPARTEMENT : Ayao MISSOHOU, Maître de Conférences Agrégé

SERVICES

ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE

Serge Niangoran BAKOU	Maître - Assistant
Gualbert Simon NTEME ELLA	Assistant
Ismaël SY	Docteur Vétérinaire Vacataire
Camel LAGNIKA	Moniteur

CHIRURGIE – REPRODUCTION

Papa El Hassane DIOP	Professeur
Alain Richi KAMGA WALADJO	Assistant
Mlle Doris NKO SADI BIATCHO	Monitrice

ECONOMIE RURALE ET GESTION

Cheikh LY	Professeur
Kora Brice LAFIA	Docteur Vétérinaire Vacataire

PHYSIOLOGIE-PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE

Moussa ASSANE	Professeur
Rock Allister LAPO	Assistant
Gilles Landry HAKOU TCHAMNDA	Moniteur

PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur
Nongasida YAMEOGO	Attaché de Recherche
Justin KOUAMO	Moniteur

ZOOTECHE-ALIMENTATION

Ayao MISSOHOU	Maître de Conférences Agrégé
Arsène ROSSILET	Assistant
Serge Alain CIEWE CIAKE	Moniteur

DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENT

CHEF DE DEPARTEMENT : Rianatou BADA ALAMBEDJI, Maître de Conférences agrégé

SERVICES

HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE

ANIMALE (HIDAOA)

Malang SEYDI	Professeur
Bellancille MUSABYEMARIYA	Assistante
Serigne Khalifa Babacar SYLLA	Attaché de recherche
Sylvain Patrick ENKORO	Docteur Vétérinaire Vacataire

MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE INFECTIEUSE

Justin Ayayi AKAKPO	Professeur
Rianatou BADA ALAMBEDJI	Maître de Conférences Agrégé
Nadège DJOUPA MANFOUMBY	Docteur Vétérinaire Vacataire
NJONG	Moniteur

PARASITOLOGIE-MALADIES PARASITAIRES-ZOOLOGIE APPLIQUEE

Louis Joseph PANGUI	Professeur
Oubri Bassa GBATI	Maître -Assistant
Hervé Séna VITOLEY	Docteur Vétérinaire Vacataire

PATHOLOGIE MEDICALE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE-CLINIQUE AMBULANTE

Yalacé Yamba KABORET	Professeur
Yacouba KANE	Assistant
Mireille KADJA WONOU	Assistante
Gana PENE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Omar FALL	Docteur Vétérinaire Vacataire
Charles Benoît DIENG	Docteur Vétérinaire Vacataire
Aurélie BOUOPDA FOSTO	Monitrice
Marcel Ohoukou BOKA	Moniteur

PHARMACIE-TOXICOLOGIE

Félix Cyprien BIAOU	Maître- Assistant (<i>en disponibilité</i>)
Assiongbon TEKOU AGBO	Attaché de Recherche
Komlan AKODA	Docteur Vétérinaire Vacataire
Basile MIDINHOUEVI	Docteur Vétérinaire Vacataire

DEPARTEMENT COMMUNICATION

CHEF DE DEPARTEMENT : Professeur Yalacé Yamba KABORET

SERVICES

BIBLIOTHEQUE
Mariam DIOUF

Documentaliste

SERVICE AUDIO-VISUEL

Bouré SARR

Technicien

OBSERVATOIRE DES METIERS DE L'ELEVAGE (O.M.E)

Emile Ségbégnon Houssa

Moniteur

SCOLARITE

El Hadj Mamadou DIENG

Vacataire

Franckline ENEDE

Docteur Vétérinaire Vacataire

Sékindé, Lynette KINDJI

Monitrice

PERSONNEL VACATAIRE (Prévu)

BIOPHYSIQUE

Mme Sylvie SECK GASSAMA

Maître de Conférences Agrégé

Faculté de Médecine et de Pharmacie

UCAD

BOTANIQUE

Antoine NONGONIERMA

Professeur

IFAN – UCAD

AGRO-PEDOLOGIE

Modou SENE

Directeur de Recherche

Enseignant : ENSA - THIES

ZOOTECHNIE

Abdoulaye DIENG

Docteur Ingénieur : ENSA - THIES

Léonard Elie AKPO

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

Kalidou BA

Docteur Vétérinaire

(Ferme NIALCOULRAB)

H I D A O A

*NORMALISATION ET ASSURANCE QUALITE

Mame Sine MBODJ NDIAYE

Chef de la Division Agroalimentaire

de l'Association Sénégalaise de
Normalisation (A.A.S.N.)

*ASSURANCE QUALITE – ANALYSE DES RISQUES DANS LES REGLEMENTATIONS

Abdoulaye DIAWARA

Direction de l'Elevage

Ousseynou Niang DIALLO

du Sénégal

ECONOMIE

Oussouby TOURE

Sociologue

Adrien MANKOR

Docteur Vétérinaire- Economiste Chercheur à
l'I.S.R.A

PERSONNEL EN MISSION (Prévu)

ANATOMIE

Mohamed OUASSAT

Professeur

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II
(Rabat) Maroc

TOXICOLOGIE CLINIQUE

Abdoulaziz EL HRAIKI

Professeur

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II
(Rabat) Maroc

PATHOLOGIE MEDICALE

Marc T. KPODEKON

Maître de Conférences Agrégé

Université d'ABOMEY-CALAVI
(Bénin)

PARASITOLOGIE

Saïdou SALIFOU

Maître de Conférences Agrégé

Université d'ABOMEY-CALAVI (Bénin)

BIOCHIMIE

Georges Anicet OUEDRAOGO

Professeur

Université de BOBO-DIOULASSO
(Burkina Faso)

H.I.D.A.O.A

Youssouf KONE

Maître de Conférences

Université de NOUAKCHOTT
(Mauritanie)

REPRODUCTION

Hamidou BOLY

Professeur

Université de BOBO- DIOULASSO
(Burkina -Faso)

PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV (Prévu)

MATHEMATIQUES

Sada Sory THIAM

Lamine KONATE

Maître-Assistant

Assistant

Faculté des Sciences et Techniques UCAD

PHYSIQUE

Issakha YOUM

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

* Travaux Pratiques

André FICKOU

Maître-Assistant

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

CHIMIE ORGANIQUE

Abdoulaye SAMB

Professeur

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

CHIMIE PHYSIQUE

Abdoulaye DIOP

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

* Travaux Pratiques de CHIMIE

Rock Allister LAPO

Assistant

EISMV – DAKAR

* Travaux Dirigés de CHIMIE

Momar NDIAYE

Assistant

Faculté des Sciences et Techniques
UCAD

BIOLOGIE VEGETALE

Kandiroura NOBA

Maître-Assistant

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

BIOLOGIE CELLULAIRE

Serge Niangoran BAKOU

Maître - Assistant

EISMV - DAKAR

EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE

Karamoko DIARRA

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

PHYSIOLOGIE ANIMALE

Moussa ASSANE

Professeur

EISMV – DAKAR

ANATOMIE COMPAREE

DES VERTEBRES

Cheikh Tidiane BA

Professeur

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

BIOLOGIE ANIMALE (Travaux Pratiques)

Serge Niangoran BAKOU

Maître - Assistant

EISMV - DAKAR

Oubri Bassa GBATI

Maître – Assistant

EISMV – DAKAR

Gualbert Simon NTEME ELLA

Assistant

EISMV – DAKAR

GEOLOGIE

*** FORMATIONS SEDIMENTAIRES**

Raphaël SARR

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques UCAD

*** HYDROGEOLOGIE**

Abdoulaye FAYE

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

CPEV

*** Travaux Pratiques**

Franckline ENEDE
Sékindé Lynette KINDJI

Docteur Vétérinaire Vacataire
Monitrice

PERSONNEL ENSEIGNANT DU D.E.A – P.A

Coordination des stages et formation post – universitaires

Responsable du D.E.A.P.A : Professeur Malang SETDI

MODULES :

1. ZOOTECHNIE – ALIMENTATION

Responsable: Ayao MISSOHOU, Maître de Conférences Agrégé

Intervenants :

Moussa ASSANE	Professeur EISMV – Dakar
Alpha BA	Docteur vétérinaire (Ferme NIALCOULRAB)
Serge Niangaron BAKOU	Maître – Assistant EISMV - Dakar
Abdoulaye DIENG	Ingénieur : ENSA – THIES
Yalacé Yamba KABORET	Professeur EISMV – Dakar
Ayao MISSOHOU	Maître de Conférences Agrégé EISMV – Dakar
Gana PENE	Docteur Vétérinaire Vacataire
Arsène ROSSILET	Assistant EISMV – Dakar
Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur EISMV – Dakar

2. SYSTEME DE PRODUCTION - ENVIRONNEMENT

Responsable : Professeur Yalacé Yamba KABORET

Intervenants :

Moussa ASSANE	Professeur EISMV – Dakar
Abdoulaye DIENG	Ingénieur Enseignant à ENSA – THIES
Moussa FALL	Docteur Vétérinaire
Lamine GUEYE	Docteur Vétérinaire
Yalacé Yamba KABORET	Professeur EISMV – Dakar
Léonard Elie AKPO	Maître de Conférences Faculté des Sciences et Techniques – UCAD
Ayao MISSOHO	Maître de Conférences Agrégé EISMV – Dakar

3. REPRODUCTION – AMELIORATION GENETIQUE

Responsable : Professeur Papa El Hassan DIOP

Intervenants :

Moussa ASSANE	Professeur EISMV – Dakar
Serge Niangaron BAKOU	Maître – Assistant EISMV - Dakar
Papa El Hassan DIOP	Professeur EISMV - Dakar

Alain Richi KAMGA WALADJO

Assistant
EISMV - Dakar

Racine SOW

Chercheur à l'I.S.R.A

Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur
EISMV – Dakar

4. ECONOMIE – STATISTIQUES – EPIDEMIOLOGIE

Responsable : Professeur Cheikh LY

Intervenants :

Justin Ayayi AKAKPO

Professeur
EISMV – Dakar

Cheikh LY

Professeur
EISMV – Dakar

Adrien MANKOR

Docteur Vétérinaire Chercheur

5. HYGIENE ET INDUSTRIES DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE (H.I.D.A.O.A)

Responsable : Professeur Malang SEYDI

Intervenants :

Rianatou BADA ALAMBEDJI

Maître de Conférences Agrégé
EISMV – Dakar

Belancille MUSABYEMARIA

Assistante
EISMV – Dakar

Serigne Khalifa Babacar SYLLA

Docteur Vétérinaire
Attaché de Recherche
EISMV – Dakar

Malang SEYDI

Professeur
EISMV – Dakar

Issakha YOUM

Maître de Conférences
Faculté des Sciences et
Techniques – UCAD

Youssef KONE

Maître de Conférences
Université -NOUAKCHOTT
(MAURITANIE)

Ousseynou Niang DIALLO
Abdoulayé DIAWARA

Ingénieurs à la Direction de
l'Elevage du Sénégal

DEDICACES

A mon Seigneur et Sauveur JESUS CHRIST,
Seigneur, à qui d'autre pourrai-je confier ce document si ce n'est à toi ? Toi qui m'as toujours dit dans ta parole « Ne crains rien car je suis avec toi, ne promène pas des regards inquiets, car je suis ton Dieu, je te fortifie, je viens à ton secours, je te soutiens de ma droite triomphante. » Que ton nom soit élevé au plus haut des Cieux.

A mon Grand Père et Ma Grande Mère Monsieur et madame SOPBWE, c'est pour moi l'occasion de vous remercier pour tous les efforts et sacrifices consentis à l'endroit de ma personne depuis ma naissance jusqu'à ce jour. Santé et Longévité par la Grâce de DIEU.

A ma Grande Mère Veuve NZEUSSI, Merci pour tes Prières.

A mon Oncle, feu Tonton Maître Serges NOUBOSSIE, tu as orienté mes premiers pas vers cette formation, mais le Seigneur n'a pas permis que tu sois là pour la fin; je te dédie particulièrement ce travail.

A mon feu Grand Père Papa NZEUSSI, je ne t'oublierai jamais

A mon Père et ma Mère, Monsieur et Madame NAMEGNI A BAFOUSSAM, il m'a fallu me séparer de vous pour me rendre compte que vous êtes exceptionnels, je veux témoigner à travers ce travail tout l'amour et la reconnaissance que j'ai pour vous. Merci papa et maman.

A maman Monique et Papa FOGOUM, vous avez été toujours mes parents Je vous dis encore merci pour votre disponibilité, votre compréhension, et le soin que vous avez envers moi.

A Papa NDAMEGNI et tout sa famille, ce travail vous est également dédié.

.A TONTON VERLIN et TONTON COSTUME. Merci pour vos Conseils.

A Grande Mère TAMTCHOM « HEUHEU » à Bangangté Merci pour tes prières et conseils.

A mes frères : Achille, Trésor, Alain, Senghor, Patou, Nono, Didi ,Cynthia, Ariane Dalouane, Lesly, Mamy Niaga, Manuela, Pierrette, Duran, Auréole, BRITTA, Danielle, et toute la famille. Je vous aime tous.

A Tonton Jacques et Tata Esther, Merci pour tout l'estime que vous avez toujours eu à mon égard.

A Tonton Valère, Tata flore, Dr Alain, Serge NDAMEGNI.

A ma bien-aimée, Nitya DEGUE. Je ne sais pas si je saurai trouver les mots justes pour exprimer ma reconnaissance pour ce que tu as fait pour moi. Merci pour ton amour, ta patience, ta générosité et ta compréhension. Ce travail est aussi le tien. Avec DIEU nous ferons des exploits. Qu'il te bénisse encore.

A mes amis Hilaire, Bertrand Anicet, Doris SADI, Rachel BEND, NJONG, PENDA Rosé, Naomie, AFNABI, Gérard, Christelle, Mohamadou, AKREO, CIEWE, SAMY, STANLY, ZANGA, BELLO,Elie BADAÏ, Gilbert AWOUNAM, Jacques, j'en oubli certainement.

A Doris SADI, merci pour l'aide
A FON TEBUG (GASI MOVIES PRODUCTION)
A l'EED, au pasteur Timothé Diatta et à la jeunesse de l'EED.

A la 33^{ème} promotion, la promotion Oumou Khairy GUEYE, merci à tous mes camarades, ce fût un plaisir de vous rencontrer et de partager tous ces moments avec vous.

A mon collègue René KARIM

A Mme la Ministre de l'élevage, Mme Oumou Khairy GUEYE SECK notre marraine qui nous a permis d'effectuer notre stage en France.

Au Professeur Ayao MISSOHOU pour son dévouement et la confiance qu'il a placé dans notre promotion. Sincères reconnaissances.

Au Gouvernement camerounais, merci de m'avoir permis d'effectuer cette formation.

A la CAVESTAS

A L'EISMV, pour le cursus scolaire. Merci de nous avoir accueilli

Au SENEGAL, terre d'accueil, J'ai beaucoup appris du pays de la « Téranga »

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent,

-A Madame Rianatou BADA ALAMBEDJI,

Vous m'avez toujours soutenue dans tous mes projets et c'est grâce à vous que j'ai pu faire ce travail. Madame, tant que cela dépendra de moi, je ne vous décevrai jamais. Merci encore.

-A Madame Cécile BROUTIN du GRET, Comment ne pas vous dire merci pour tout ce que vous faites pour « la filière Lait » au Sénégal : COURAGE

-A Madame Coumba KEBE présidente du comité de suivi. Merci pour votre apport et votre participation dans l'amélioration de la qualité du lait au Sénégal.

- A monsieur ERIC LUNEL et le Ministère Français des affaires étrangère, Merci pour tout votre soutien

- A monsieur Philippe MAUCLERE, Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar. Merci de nous avoir accueilli dans votre Structure. Et surtout pour le soutien que vous portez à tous les étudiants au Sénégal.

- Au Docteur Benoît GARIN Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour ma Thèse. C'est encore une preuve de vos qualités humaine et intellectuelle. Soyez assuré de notre profonde reconnaissance.

-Au Docteur Sébastien BREUREC, Vous avez soutenue mes premiers pas dans la recherche en générale et la Biologie moléculaire en particulier, votre savoir faire, votre disponibilité et votre Amour pour la recherche force notre admiration. Profond respect.

- Au Docteur Youssouph DIEDHIOU. Pour tes conseils, pour a disponibilité, pour ton soutien, Que sais-je encore. Merci infiniment

-Au Docteur Papa Bakhary BATHILY, comme un Père tu t'es occupé de moi depuis ma première année à l'école vétérinaire jusqu'à ce jour, je te dis encore infiniment merci. Je ne t'oublierai jamais.

- A la fédération national des acteurs de la filière lait du Sénégal. C'est grâce à vous que ce travail été réalisé. Merci encore

- Au Docteur Mohamadou DIENG, Merci pour ta collaboration
- A la Famille DEGUE au Sénégal. Merci pour tout.
- A Madame Maram MBOW, votre amour du travail bien fait, et surtout votre sens de responsabilité, nous ont beaucoup marqué positivement. Que Dieu vous donne toujours sa force pour continuer à diriger cette modeste équipe du LSAHE
- A Babacar GNING, Merci pour toutes tes techniques et ta totale disponibilité à me venir en aide. Dieu seul sait tout ce que j'ai appris de toi.
- A Monsieur et Madame NDEME. Vous êtes un couple formidable, Merci pour votre soutien
- A Aïssatou FOFANA, Merci encore pour ta simplicité et ton apport en techniques de laboratoire. Que Dieu te soutienne toujours.
- A Colette GOMIS, merci également pour ta disponibilité et surtout pour l'assurance qualité.
- A Diabel GUEYE, Tu as été aussi pour beaucoup dans ce travail, Merci pour tout
- A Cathy BASS, merci pour l'accueil et le savoir être
- A Toute l'équipe de Biologie médicale (Dr J M SIRE, Dr BAHSOUN, Fatou KINE, Yamile, ROUGUI, Rokhaya, Fatou DIEYE, Armelle, Madame SANKARE)
- A Claude BETENE que j'appelle souvent EPHESIEN, Merci pour tes prières pour moi: Dieu les a toujours exaucé.
- Au Diagnostic Théâtre pour sa culture durant tout mon cursus à l' EISMV
- Alain Richi KAMGA WALADJO merci pour tes conseils et tes motivations
- A Doris SADI Rachel BEND, NJONG, AFNABI, STANLY FON, j'adore votre compagnie.
- A la famille NGOUYAMSA BICHOP à Dakar. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous serai toujours reconnaissant.
- A Eric DOMBOU, le patron de l'informatique, merci pour ton assistance.
- A Jean-Marc FEUSSOM et Edimon TCHOFFO, Merci pour votre présence.

- A toi encore Nitya Ayawavi pour tout ce que tu es.

A NOS MAITRES ET JUGES

A Monsieur Cheikh Saad Bouh BOYE,

Professeur à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar.

Nous avons réussi sans peine à vous désigner comme président de notre jury de thèse. Ceci est la preuve de vos immenses qualités humaines et intellectuelles. Soyez assuré de notre sincère reconnaissance et très haute considération.

A Madame Rianatou BADA ALAMBEDJI,

Maître de conférence agrégé à l'EISMV de Dakar.

Le choix de votre personne en tant que Directeur de thèse a été largement motivé dès nos premiers pas à l'école vétérinaire par votre réputation d'encadreur modèle. Plus qu'un directeur de thèse, vous avez été un parent pour nous à travers votre dévouement, vos sages et précieux conseils.

Madame, je n'ai ni Or, ni Argent pour vous donner en retour, mais ce que j'ai de plus précieux, je vous le donne : que DIEU vous bénisse abondamment.

A Monsieur Ayayi Justin AKAKPO

Professeur à l'EISMV de Dakar.

Votre grande rigueur scientifique et votre faculté de compréhension nous permettent de vous considérer comme une référence. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur Ayao MISSOHOU

Maître de conférences agrégé à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Votre constante disponibilité et votre pragmatisme font de vous un maître respectable et respecté.

Soyez assuré de notre sincère reconnaissance et très haute considération.

A notre Codirecteur de thèse Docteur Benoît GARIN,

Médecin-Biologiste, Responsable du laboratoire de Biologie Médicale, et du laboratoire de Sécurité Alimentaire, Hygiène et Environnement à l'institut Pasteur de Dakar.

Votre rigueur scientifique, votre ardeur au travail et votre sens de responsabilité nous ont permis de travailler dans une atmosphère de confiance et de sécurité. Veuillez recevoir ici nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance.

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR :	Agence Française de Normalisation
ALOA :	Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti
BCC :	Bouillon Cœur-Cervelle
BCG :	Bacille de Calmette et Guérin
CA-SFM :	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
GRET :	Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques
ISO :	International Standardisation Organisation
HTST :	High Temperature Short Time
LDC :	Lysine-Décarboxylase
MH :	Mueller-Hinton
MRLC :	Maladies Réputées Légalement Contagieuses
NF :	Norme Française
ONPG :	Orthonitrophenyl D.galacto-pyranoside.
PCA :	Plate Count Agar
pH :	Potentiel d'Hydrogène
PK :	Proteinase K
RV :	Rappaport Vassiliadis
SC :	Selenite Cystine
UHT :	Ultra Haute Température
VP :	Vosges-proskauer
VRBL :	Violet Red Bile Lactose

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Diagramme de fabrication du lait caillé.....	14
<u>Figure 2</u> : Diagramme de fabrication du yaourt nature industriel.....	18
<u>Figure 3</u> : Les petites unités de transformation du lait au Sénégal.....	36
<u>Figure 4</u> : Principales localités concernées par l'étude	54
<u>Figure 5</u> : Répartition des unités satisfaisantes au Sénégal.....	80
<u>Figure 6</u> : Fréquence de sensibilité aux antibiotiques chez 303 souches d' <i>Escherichia coli</i> testées selon les recommandations du CA-SFM.....	90
<u>Figure 7</u> : Fréquence de sensibilité des souches de staphylococcus aureus aux antibiotiques selon les recommandations du CA-SFM.....	91
<u>Figure 8</u> : séparation des produits de PCR sur gel.....	92
<u>Figure 9</u> : Résultats obtenus au niveau des unités de production et de transformation de lait cru testées pour <i>Coxiella burnetii</i> et anticorps anti- <i>Brucella</i> <i>abortus</i> au Sénégal.....	93

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
<u>Tableau I</u> : Caractéristiques des laits en poudre utilisés à l'échelle industrielle...	15
<u>Tableau II</u> : Multiplication de la flore aérobie mésophile en fonction de la température et de la durée de conservation.....	33
<u>Tableau III</u> : Critères microbiologiques des laits caillés.....	48
<u>Tableau IV</u> : Critères microbiologiques des laits fermentés (yaourt, kéfir, etc...)	49
<u>Tableau V</u> : Critères microbiologiques des laits en poudre.....	49
<u>Tableau VI</u> : Caractéristiques des Campylobacter thermotolérants.....	70
<u>Tableau VII</u> : Programme d'amplification pour la détection des Mycobactéries du complexe tuberculosis par PCR.....	77
<u>Tableau VIII</u> : Amorces pour la détection des Mycobactéries du complexe tuberculosis par PCR.....	77
<u>Tableau IX</u> : Facteurs de risque de qualité non satisfaisante des échantillons selon La Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 pour les laits crus de consommation de mise sur le marché.....	81
<u>Tableau X</u> : Qualité microbiologique de 41 échantillons de laits crus selon la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 30 mars 1994).....	83
<u>Tableau XI</u> : Qualité microbiologique des 41 échantillons de laits crus selon le Règlement CE 853-2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004...	84
<u>Tableau XII</u> . Qualité microbiologique des 44 échantillons de laits caillés selon la Norme Sénégalaise NS 03 002.....	85
<u>Tableau XIII</u> . Qualité microbiologique des 44 échantillons de laits caillés selon la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 21 décembre 1979).....	85
<u>Tableau XIV</u> : Qualité microbiologique des échantillons de lait caillés selon la Norme Sénégalaise NS 03-001.....	86

Tableau XV : Qualité microbiologique des échantillons de laits caillés selon la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 21 décembre 1979).....86

Tableau XVI : qualité microbiologique des 18 échantillons d'eaux du réseau de distribution selon le Décret n°89-3 du 3 janvier 1989 (Journal officiel de la République Française).....87

Tableau XVII : Fréquence des germes obtenus dans 41 échantillons de lait cru prélevés au Sénégal.....87

Tableau XVIII: Fréquence des germes obtenus dans 44 échantillons de lait caillé.....88

Tableau XIX : Fréquence des pathogènes dans 6 échantillons de lait caillé.....88

Tableau XX : Fréquence des pathogènes dans 18 échantillons d'eaux du réseau de distribution.....89

LISTE DES FICHES DE BONNES PRATIQUES D'HYGIENE

	Pages
Fiche 1 : Hygiène corporelle et vestimentaire.....	39
Fiche 2 : Etat sanitaire du manipulateur ou du personnel.....	40
Fiche 3 : Approvisionnement.....	40
Fiche 4 : Utilisation des matières premières.....	41
Fiche 5 : Stockage.....	41
Fiche 6 : Matériaux.....	42
Fiche 7 : Entretien du matériel.....	42
Fiche 8 : Locaux	43
Fiche 9 : Sols, surfaces de travail.....	44
Fiche 10 : Lutte contre les nuisibles (mouches, rats, souris, cafards).....	45
Fiche 11 : Santé du cheptel.....	45
Fiche 12 : Traite.....	46
Fiche 13 : Transport.....	46
Fiche 14 : Pasteurisation.....	47
Fiche 15 : Refroidissement après pasteurisation.....	48
Fiche 16 : Ensemencement– Fermentation.....	48

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE LAIT CRU.....	4
1. DEFINITION	4
2- CARACTERES ORGANOLEPTIQUES	4
2-1. La couleur	4
2-2. L'odeur.....	4
2-3. La saveur	4
2-5. Propreté physique.....	5
3-CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES.....	5
3-1. Définition du lait du point de vue physico-chimique.....	5
3-2. Densité : poids spécifique ou Masse Volumique.....	5
3-3. Indice de réfraction	6
3-4. Point d'ébullition	6
3-5. Point de congélation ou point cryoscopique	6
3-6. pH ou acidité actuelle.....	7
4-CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU LAIT.....	7
4-1. Les vitamines du lait	8
4-2. Les enzymes du lait.....	8
4-3. Les cellules du lait	8
5-LES DIFFERENTS TYPES DE LAIT ET PRODUITS LAITIERS.....	8
CHAPITRE II : GENERALITES SUR LE LAIT FERMENTE	10
1-DEFINITION.....	10
2- IMPORTANCE.....	10
2-1. Importance nutritionnelle.....	10
2-2. Importance hygiénique.....	11
3- TECHNOLOGIE DE LA FABRICATION DU LAIT CAILLE.....	11
3-1. Matières premières.....	11
3-2. Matériel de fabrication.....	11
3-3 Etapes de la transformation.....	11
4- TECHNOLOGIE DE LA FABRICATION DU YAOURT	15
4-1. Définition	15
4-2. Les matières premières	15
4-3. Procédé de fabrication du yaourt	17
CHAPITRE III : MICROFLORE DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS.....	19
1. MICROFLORE DU LAIT	19
1-1. Les bactéries.....	19
1-1-1. Les bactéries saprophytes	19
1-1-1-1. Flore lactique.....	19
1-1-1-2. Flore d'altération.....	20
1-1-2. Les bactéries pathogènes	21
1-1-2-1. Les staphylocoques	22
1-1-2-2. Les Entérobactéries	22
1-1-2-3. Les Campylobacter.....	25

1-1-2-4. <i>Listeria monocytogenes</i>	26
1-1-2-5. Les Mycobactéries.....	27
1-1-2-6. Les Rickettsies : <i>Coxiella burnetii</i>	28
1-1-2-7. Les Brucelles	29
1-2. Autres micro-organismes.....	30
1-2-1. Les levures et les moisissures	30
1-2-1-1. Les levures.....	30
1-2-1-2. Les moisissures.	31
1-2-2. Les virus et parasites.....	31
1-2-2-1. Les virus	31
1-2-2-2. Les parasites	32
2. ORIGINE DES CONTAMINATIONS ET DEVELOPPEMENT DES MICRO-ORGANISMES.....	32
2-1. Origine des contaminations.....	32
2-2. Développement des microorganismes	33
3- INTERET DE LA RECHERCHE DES MICRO-ORGANISMES	34
3-1. Intérêt hygiénique	34
3-2. Intérêt nutritionnel	34
3-3. Intérêt technologique	34
CHAPITRE IV : SYSTEME DE TRANSFORMATION DU LAIT AU SENEGAL ET GUIDE DE BONNES PRATIQUES D'HYGIENE	36
1-FILIERE LAIT AU SENEGAL.....	36
1-1. La transformation du lait naturel.....	36
1-1-1 Les micro entreprises artisanales : femmes d'éleveurs et transformatrices urbaines....	36
1-1-2. L'essor des petites entreprises de pasteurisation (mini laiteries)	36
1-2. La transformation du lait en poudre : des micro-entreprises artisanales	37
2- GUIDE DE BONNES PRATIQUES GENERALES	38
2-1. Hygiène du personnel	39
2-2. Gestion des matières (autre que le lait cru).....	40
2-3. Hygiène du matériel.....	42
2-4. Conception des locaux	43
2-5. Hygiène des locaux et environnement	44
3- GUIDE DE BONNES PRATIQUES PAR OPERATION UNITAIRE	45
3-1. Santé du cheptel	45
3-2. Traite	46
3-3. Transport	46
3-4. Pasteurisation	47
3-5. Refroidissement après pasteurisation.....	48
3-6. Ensemencement– Fermentation	48
4. NORMES MICROBIOLOGIQUES DES LAITS ET PRODUITS LAITIERS	49
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	52
CHAPITRE I : CADRE D'ETUDE	52
1. Les unités de production	52
2. Les unités de transformation	52
2-1. Approvisionnement en lait cru.....	53
2-2. Local de transformation	53
3. L'Institut Pasteur de Dakar (IPD)	53

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	54
1. SUR LE TERRAIN.....	54
1-1. Echantillonnage.....	54
1-2. Prélèvements.....	55
1-3. Questionnaire.....	56
2- AU LABORATOIRE.....	57
2-1. Appareillage et petit matériel.....	57
2-2. Milieux de cultures et réactifs.....	57
Leurs compositions sont données en annexe 4.....	57
3. Statistiques.....	59
4. Protocole d'analyses microbiologiques.....	60
4-1. Préparation de l'échantillon.....	60
4-2. Dénombrement de la flore totale (NF V 08-051).....	61
4-2-1. Mode opératoire.....	61
4-2-2. Expression des résultats.....	61
4-3. Dénombrement des staphylocoques (NF V 08-057-1).....	62
4-3-1. Mode opératoire.....	62
4-3-2. Expression des résultats.....	63
4-4. Dénombrement de <i>Escherichia coli</i> (NF V 08-050).....	63
4-4-1. Mode opératoire.....	63
4-4-2. Expression des résultats.....	64
4-5. Coliformes totaux et Coliformes thermotolérants.....	64
4-5-1. Mode opératoire.....	64
4-6. Recherche des salmonelles : (NF V 08-052).....	65
4-6-1. Mode opératoire.....	65
4-6-2. Expression des résultats.....	67
4-7. Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> (NF V 08-062).....	68
4-7-1. Mode opératoire.....	68
4-7-2. Révélation.....	68
4-8. Recherche de <i>Campylobacter</i> (NORME ISO 10272-1).....	69
4-8-1. Mode opératoire.....	69
4-8-2. Expression des résultats.....	72
4-9. Antibiogrammes.....	72
4-9-1. Méthode en diffusion pour les Enterobacteriaceae (<i>E. coli</i> et salmonelles).....	72
4-9-2. Méthode en diffusion pour les staphylocoques.....	72
5. AUTRES PROTOCOLES D'ANALYSE.....	73
5-1. Détection des Anticorps anti- <i>Brucella abortus</i> par ELISA.....	73
5-2. PCR.....	74
5-2-1. Détection de <i>Coxiella burnetii</i>	74
5-2-2. Recherche de Mycobactéries du complexe tuberculosis.....	77
CHAPITRE III : RESULTATS – DISCUSSION.....	81
1- RESULTATS.....	81
1-1. Résultats de l'enquête.....	81
1-2. Résultats des analyses bactériologiques.....	85
1-2-1. Qualité des échantillons.....	85
1-2-2. Fréquence et numération des germes.....	89
1-3. Sensibilité aux antibiotiques.....	92

1-4. Résultats des analyses de biologie moléculaire et du test ELISA	94
1-4-1. Mycobacterium bovis	94
2-DISCUSSION	96
2-1. Représentativité de l'échantillonnage	96
2-2. Facteurs de risques	96
2-3. Appréciation globale du niveau de contamination des laits et de l'eau	97
2-4. Appréciation du niveau de contamination en fonction des germes	99
2-5. Appréciation de la sensibilité aux antibiotiques des germes isolés	103
CHAPITRE IV : RECOMMANDATIONS	104
1. AUX AUTORITES PUBLIQUES	104
2. LES PROFESSIONNELS DE LA FILIERE LAIT (PRODUCTEURS ET TRANSFORMATEURS).....	105
2-1. Hygiène du personnel	105
2-2. Hygiène du matériel	105
2-3. Hygiène des locaux	105
2-4 Techniques de transformation.....	106
CONCLUSION	107

INTRODUCTION

S'il est un domaine où le contrôle de la " qualité " est une nécessité fondamentale, c'est bien celui des produits alimentaires en général, et du lait en particulier. A tous les stades, depuis la matière première jusqu'au produit fini, une attention toute particulière doit être portée à cet aspect.

Le lait constitue un précieux concentré protéique dont les vertus et qualités nutritionnelles reconnues ne sont plus à démontrer aussi bien chez le jeune que chez l'adulte.

Avec une production annuelle locale de lait estimée en 2004 à 114,2 millions de litres, dont 95,6 millions pour le lait de vache (84%) et 18,3 millions pour le lait de petits ruminants (16%) (40), le Sénégal est loin de couvrir ses besoins en lait et produits laitiers comme l'attestent les importations. Ces dernières ont atteint un volume de 34,794 tonnes, soit l'équivalent de 250 millions de litres, pour une valeur de 36,7 milliards de F CFA. 88% du tonnage sont constitués par le lait en poudre (40).

C'est ainsi que depuis quelques années, on assiste au Sénégal à l'émergence de nombreuses micro, petites et moyennes entreprises de transformation de lait. Ce secteur joue un rôle important en terme d'emplois, de revenus (direct et indirect pour les éleveurs et les acteurs de la distribution) et contribue de façon opérationnelle à la politique nationale de développement économique.

La transformation laitière, qu'elle porte sur le lait naturel sénégalais ou sur de la poudre de lait importée, requiert le respect d'une hygiène stricte tout au long de la chaîne, car le lait est un produit particulièrement nutritif, et favorable au développement rapide de microorganismes pouvant entraîner des toxi-infections alimentaires et des infections.

C'est pourquoi, dans le cadre du projet d'élaboration d'un Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène soutenu par le GRET (Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques) à l'attention des acteurs de la filière artisanale du Sénégal, nous avons mené une étude sur la qualité microbiologique du lait au Sénégal dans l'objectif général de pallier le déficit de données et de préciser les dangers ainsi que les risques sanitaires.

Quant aux objectifs spécifiques, ils consistent à :

- Réaliser un état des lieux de la qualité microbiologique du lait dans la filière artisanale au Sénégal
- Comparer la qualité de ce lait aux critères officiels en cours

-Identifier les facteurs de risque d'insalubrité.
Notre travail comprend deux parties :

-La première partie qui est une synthèse bibliographique, traite des généralités sur le lait, à savoir les caractères organoleptiques, physicochimiques, microbiologiques, les systèmes de transformation et le guide de bonnes pratiques en laiterie.

- La deuxième partie porte sur l'étude expérimentale que nous avons menée, où nous présentons les matériels et méthodes utilisés pour les analyses microbiologiques et de biologie moléculaire, la réalisation des antibiogrammes. Ensuite, nous présentons les résultats, leur discussion et les recommandations.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE LAIT CRU

1. DEFINITION

Selon le Congrès International pour la répression des fraudes alimentaires, tenu à Genève en 1908, « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement, et ne doit pas contenir de colostrum » (17).

Le décret sénégalais n° 69-891 relatif aux « lait et produits laitiers » (48) stipule que la dénomination « lait » sans qualificatif renvoie au lait de vache. S'il s'agit d'un lait d'une espèce autre que la vache, il faudra ajouter le qualificatif de l'espèce.

2- CARACTERES ORGANOLEPTIQUES

2-1. La couleur

Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause de micelles de caséinates, ou parfois bleuté ou jaunâtre du fait de la bêta carotène ou de la lactoflavine contenues dans la matière grasse.

2-2. L'odeur

Le lait a une odeur toujours faible *sui generis* (caractéristique de l'animal qui l'a produit), agréable et variable en fonction de l'alimentation.

2-3. La saveur

Le lait a une saveur douceâtre, faiblement sucrée en raison de sa richesse en lactose dont le pouvoir sucrant est inférieur à celui du saccharose (3).

2-4. La viscosité

La viscosité du lait est fonction de l'espèce, c'est ainsi qu'on distingue :

- Un lait visqueux chez les monogastriques (jument, ânesse, carnivores et femme) ;
- Un lait moins visqueux chez les herbivores (lait de brebis plus visqueux que celui de la vache).

2-5. Propreté physique

Un lait commercialisé doit être propre, donc dépourvu d'éléments physiques. Cette propreté s'apprécie par le test qualitatif réalisé de la façon suivante :

- On dispose d'un filtre sur un entonnoir ou un disque de papier ou de la ouate comprimée dans une seringue filtre de ½ litre ;
- On peut aussi utiliser un lactofiltreur ou pompe Van Doorn disposant d'une rondelle d'ouate comme filtre.
- Les papiers filtre sont ensuite enlevés et comparés à une gamme de papier témoins ou disques témoins ayant retenu des éléments figurés (saletés), chacun étant affecté d'une note. Les notes vont de 0 à 5 ou de 0 à 10. La côte ou la note la plus élevée est attribuée au lait le plus propre. Inclues dans les fiches, les rondelles témoins permettent de suivre l'évolution de la propreté d'un lait.

3-CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES

3-1. Définition du lait du point de vue physico-chimique

Le lait est une émulsion (dispersion grossière) de matière grasse dans une solution colloïdale de protéine dont le liquide intermicellaire est une solution vraie.

3-2. Densité : poids spécifique ou Masse Volumique

C'est le rapport de la masse d'un volume de lait sur la masse du même volume d'eau à 20°C. A cette température, la densité moyenne du lait de mélange est comprise entre 1,030 et 1,033. Pour un lait individuel, cette densité est de 1,028 à 1,038. La sensibilité varie en fonction de la température et de la richesse en matière sèche. La mesure de la densité se fait à l'aide d'un aréomètre spécial ou thermolactodensimètre.

3-3. Indice de réfraction

Il peut s'apprécier sur le lactosérum à l'aide d'un réfractomètre (oléo réfractomètre). Il varie de 38 à 40°C (3), il diminue s'il y a mouillage, augmente s'il y a écrémage. L'indice de réfraction varie entre 1,3440 et 1,3485.

3-4. Point d'ébullition

L'ébullition propre du lait a lieu à 100°C ; cependant, lorsqu'on porte le lait sur le feu, à une température voisine de 80 à 90°C, il y a une montée du lait, c'est à dire formation d'une membrane protéinocalcaire ou peau du lait (frangipane) qui gêne l'ébullition du lait (13).

Pour bouillir le lait, il faut donc éliminer cette peau de lait.

3-5. Point de congélation ou point cryoscopique

Il est de l'ordre de -0,555° C (- 0,54 à - 0,56° C ou -0,51 à -0,55° C).

C'est à ce point qu'apparaissent les premiers cristaux. Il est identique à celui du sérum et inférieur à 0° C.

Le point de congélation est spécifique du lait de chaque espèce animale, mais il est peu variable en fonction des conditions zootechniques. Il dépend surtout des éléments solubles contenus dans le lait, tels que le NaCl et le lactose. Le lait est isotonique au sang, donc de part et d'autre de la membrane mammaire, il y a le lait et le sérum. Les variations du lactose et du NaCl sont exprimées selon la loi de PORCHER par la constante moléculaire simplifiée de MATHIEU et FERRE, qui permet de mesurer les variations du point de congélation.

Par exemple, quand il y a mouillage avec de l'eau, la fraude est non seulement décelée par l'abaissement des taux respectifs de lactose et de chlorure, mais également par l'abaissement du point cryoscopique.

Par conséquent, la mesure du point cryoscopique permet d'apprécier la qualité d'eau frauduleusement ajoutée au lait (NF, V04-205 de janv. 1969 ; AFNOR, 1980 et FIL, 1983.) cité par NJASSAP (42). Il est de plus en plus utilisé pour déceler le mouillage. Le point cryoscopique se mesure soit avec un thermomètre haute précision (1/100^e de degré) ou avec des appareils plus précis du type osmomètre (1/1000^e de degré). Le mouillage élève le point cryoscopique en direction de zéro degré. La mesure du point cryoscopique s'applique aussi au lait écrémé, l'écrémage

ne modifiant pas le point de congélation. Par contre, l'acidification du lait ou l'addition des sels minéraux abaisse le point de congélation.

3-6.pH ou acidité actuelle

L'acidité actuelle s'apprécie par le pH qui correspond à la concentration en ions hydronium. Il renseigne sur l'état de fraîcheur du lait. A la traite, la valeur du pH du lait est comprise entre 6,6 et 6,8. Selon ALAIS (2), cette acidité faible est liée à la présence d'ions phosphate et de caséine.

3-7. Acidité de titration ou acidité Dornic

L'acidité de titration globale mesure à la fois le pH initial du lait normal et l'acidité développée après la traite par la fermentation lactique qui diminue le pH jusqu'à 5 ou 4.

L'acidité de titration indique donc le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait normal a une acidité de titration de 16 à 18°D, le degré Dornic étant le nombre de dixième de millilitre de soude utilisé pour titrer 10 millilitres de lait en présence de Phénophtaléine (3).

1°D = 1 millilitre d'acide lactique dans 10 millilitres de lait soit 0,1 gramme d'acide lactique par litre.

Deux laits peuvent avoir le même pH et des acidités titrables différentes et inversement. C'est dire qu'il n'y a pas de relation d'équivalence réelle entre le pH et l'acidité de titration (40).

Des variations supérieures de l'acidité Dornic, sont témoin d'une instabilité du lait aux traitements thermiques, ou d'une variabilité excessive du taux de protéines solubles ou du calcium.

4-CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU LAIT

Les caractéristiques biologiques du lait font référence à certains constituants que sont : les vitamines, les enzymes et les cellules.

4-1. Les vitamines du lait

Les vitamines sont les substances qui, à l'état de trace, permettent la croissance, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme.

Le lait contient la plus grande variété des vitamines classées suivant leur solubilité dans l'eau ou dans les matières. Ainsi les vitamines liposolubles (A, D, E, K) se retrouvent intégralement dans la crème et le beurre, alors que les hydrosolubles (B et C) restent dans le lait écrémé. De nombreux facteurs peuvent faire varier la teneur du lait en vitamines. Il s'agit de la période de lactation, de l'alimentation et des traitements subis par le lait.

4-2. Les enzymes du lait

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques d'origine lactée, microbienne ou fongique dont les propriétés sont utilisées en technologie laitière et en inspection du lait et des produits laitiers. Les principales enzymes sont :

- Les hydrolases : lipases, phosphatases alcalines (PAL), protéases
- Les oxydo-réductases : Xanthine oxydase, lactopéroxydase.

4-3. Les cellules du lait

Comme tout liquide biologique, le lait contient des cellules somatiques. Ces cellules proviennent de la mamelle ou du sang. Nous pouvons distinguer :

- des lymphocytes (B ou T) 17 à 27%
- des macrophages qui, avec les cellules épithéliales représentent plus des 2 tiers des cellules ;
- des leucocytes polynucléaires neutrophiles (0 à 11%). Le nombre de ces cellules augmente lors des inflammations de la mamelle.

5-LES DIFFERENTS TYPES DE LAIT ET PRODUITS LAITIERS

Les progrès accomplis dans les domaines microbiologiques et technologiques ont permis l'amélioration de la qualité et la durée de conservation du lait en lui faisant subir certaines transformations.

Les principaux produits laitiers sont (2) :

-les laits de consommation :

lait cru

lait pasteurisé

lait stérilisé

lait concentré sucré (LCS)

lait concentré non sucré (LCNS)

lait en poudre obtenu par procédé « Hatmaker » et « Spray »

laits médicaux ou maternisés

lait aromatisé

lait aigri ou fermenté

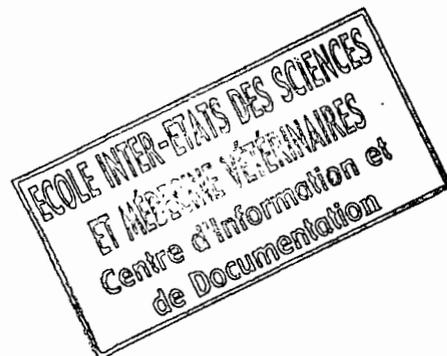
lait reconstitué.

-les produits laitiers :

crèmes (crèmes naturelles, crèmes glacées)

beurre, huile de beurre

fromages



CHAPITRE II : GENERALITES SUR LE LAIT FERMENTE

1-DEFINITION

La dénomination de lait fermenté est réservée aux produits laitiers préparés avec des laits écrémés ou non, des laits concentrés et des laits en poudre écrémés ou entiers, ayant subi la pasteurisation, la stérilisation ou l'ébullition homogénéisée ou non,ensemencés avec des bactéries lactiques appartenant à l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit, associées éventuellement dans le cas du kéfir par exemple, à des levures.

Les laits fermentés ne doivent être privés d'aucun élément constitutif et l'addition de tout produit étranger est prohibée, à l'exception :

- du saccharose ;
- des matières grasses aromatiques naturelles ;
- des pulpes ou jus de fruits ;
- de miel ;
- de confiture (34).

2- IMPORTANCE

La transformation de certains aliments en aliments fermentés répond à plusieurs besoins (34), à savoir :

- Assurer la conservation d'aliments dans le temps
- Augmenter la digestibilité des aliments
- Eliminer si possible les micro-organismes responsables de la biodégradation et surtout les pathogènes.

2-1. Importance nutritionnelle

La fermentation du lait entraîne son acidification suite à la production d'acides organiques, notamment d'acide lactique.

L'utilisation et l'action des enzymes hydrolytiques facilitent l'assimilation du lactose. C'est pourquoi les laits fermentés sont recommandés après une antibiothérapie. Les laits fermentés préviennent l'obésité et l'hyperlipoprotéinémie quand ils ont une faible teneur en matière grasse.

2-2. Importance hygiénique

Les laits fermentés préviennent la croissance de la plupart des germes pathogènes et assurent, par des moyens simples, la conservation du lait. Si les laits contaminés sont utilisés, il y a des risques pour le consommateur.

Un lait caillé fabriqué dans de bonnes conditions hygiéniques, ne présente aucun risque pour le consommateur.

3- TECHNOLOGIE DE LA FABRICATION DU LAIT CAILLÉ

3-1. Matières premières

Les procédés de fabrication du lait caillé font appel à un certain nombre de matières premières :

- Lait cru ou lait en poudre et eau.
- Ferment (lait caillé acheté la veille ou ferment lyophilisé).
- Sucre en poudre.
- Arômes.

3-2. Matériel de fabrication

- Filtre pour recueillir les impuretés du lait (paille, poils, grains de sable, etc.).
- Petit matériel pour les tests.
- Marmites, bouteilles de gaz (ou autre énergie) pour la pasteurisation
- Bassine en plastique ou autres contenants pour le refroidissement du lait.
- Sachets en polyéthylène pour le conditionnement.
- Thermomètre, chronomètre.

3-3 Etapes de la transformation

Ces différentes matières premières sont mélangées selon une méthodologie cohérente qui s'appuie généralement sur un diagramme de fabrication des laits caillés (fig.1 et 2 page 14 et 18).

- Dans le cas du lait cru, il y a d'abord un préchauffage du lait avant l'ajustement de la matière grasse à un taux correct. Ensuite le lait est pasteurisé à une température de 85°C pendant 20 minutes (26), puis refroidi avant d'être ensemencé.
- A partir du lait en poudre, les différentes phases de fabrication sont :
 - La reconstitution : Elle consiste en un mélange de différentes matières premières de façon à obtenir un lait de matière grasse égale à 30-40 g par litre de lait. L'utilisation de l'eau déchlorée comme eau de reconstitution a pour but d'éviter l'inhibition des ferments lactiques utilisés.
 - L'homogénéisation : qui permet le fractionnement mécanique des globules gras du lait afin de réduire leur diamètre. Une telle opération vise à éviter l'écémage et à assurer une stabilité physique du lait.
 - La pasteurisation : c'est un traitement thermique qui consiste à chauffer le lait jusqu'à une température définie et à la maintenir pendant un temps donné. En procédant à la pasteurisation du lait, la plupart des bactéries du lait non sporulées sont détruites. L'efficacité de la pasteurisation est étroitement liée au respect rigoureux du couple temps/température choisi et de la charge microbienne initiale (que le transformateur ne peut cependant pas connaître et qui peut être très variable). Pour cela, les unités doivent se munir d'un chronomètre et d'un thermomètre afin de respecter ce couple. Par précaution, au vu des données disponibles sur la charge microbienne du lait cru (qui est souvent élevée), des travaux réalisés au Sénégal et des recommandations de la FAO, Le Groupe de Recherche et d'Encadrement Technologique (GRET) dans le « Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène » recommande le couple « 85°C pendant 20 minutes » ou le couple « 90°C pendant 10 minutes », car ils sont favorables pour la sécurité des consommateurs (26).
 - Le refroidissement : Comme nous l'avons souligné, la pasteurisation ne détruit pas totalement les micro-organismes qui restent à l'état de spores. Plus la température est élevée, plus les risques de développement microbien sont importants. De plus, une température d'inoculation trop élevée inactive, affaiblit le ferment ou ne favorise pas les bactéries souhaitées. Lorsque le refroidissement est lent, les spores (dont la température optimale de croissance est voisine de la température ambiante) ont le temps de germer, puis de proliférer dans le lait. En se développant, ces germes prendront le dessus sur l'action des bactéries lactiques empêchant ainsi une bonne fermentation du lait. Il faut donc refroidir rapidement le lait dans des bassines fermées, placées dans un bain-marie d'eau fraîche (ajout de glace).

▪ L'ensemencement: il s'agit de mélanger le lait pasteurisé à cailler avec des ferments lactiques. Dans le cas du lait reconstitué, ces ferments subissent d'abord une revivification préalable. Les souches utilisées sont lyophilisées et correspondent en général à des germes mésophiles.

-Pour le lait caillé, la culture fermentaire est composée de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus mesophilus*, et on choisit une température proche de la température optimale de développement des streptocoques mésophiles, soit 31°C. L'objectif recherché est de favoriser le développement de ces bactéries qui sont responsables de la production d'arôme. La température optimale de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* se situe entre 47 et 50°C, mais elle favorise aussi la production d'une grande quantité d'acide lactique. À 31°C, leur pouvoir acidifiant est considérablement réduit, ce qui permet d'obtenir au bout de 18 heures, un lait caillé aromatisé avec une acidité limitée d'environ 70°Dornic.

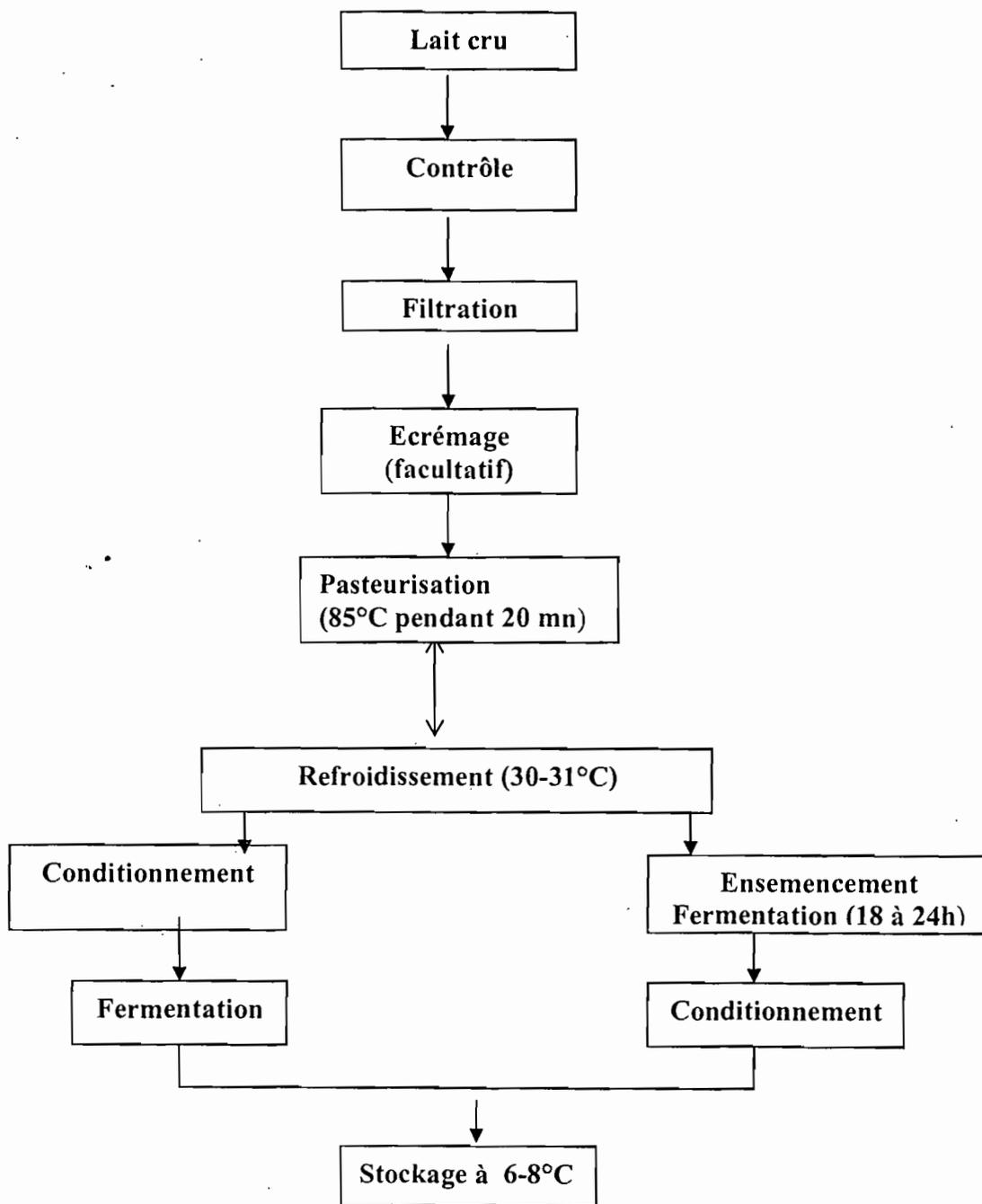
-Le yaourt doit préférentiellement être élaboré par deux souches bactériennes *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Les deux souches doivent être ensemencées simultanément et rester vivantes jusqu'à la consommation du produit. L'ensemencement doit se faire à une température la plus proche possible de 45°C pour assurer un démarrage possible de la fermentation. Il faut, autant que possible, utiliser une étuve ou une armoire isotherme pour la fermentation (18).

Les levains lactiques mésophiles confèrent au produit des caractéristiques organoleptiques propres en particulier, la consistance et la saveur acide complétées par un arôme plaisant à base de diacétyl (17).

Le développement de l'acidité est arrêté par refroidissement à des températures inhibitrices inférieures à +4°C.

▪ Le conditionnement

Le conditionnement se fait à l'aide de conditionneuses automatiques dans des sachets souples en matière plastique de 0,125 litre à 1 litre par unité. Il peut également se faire manuellement dans des bidons et des pots. Enfin, le lait est maintenu sous régime froid afin de garantir une stabilité physico-chimique et organoleptique.



Source : (18)

Figure 1 : Diagramme de fabrication du lait caillé

4- TECHNOLOGIE DE LA FABRICATION DU YAOURT

4-1. Définition

Le yaourt est un lait fermenté frais obtenu à l'échelle industrielle par le développement des bactéries lactiques : *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, qui doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme à la date limite de consommation. L'acidité doit être de 75 à 100°D pour un yaourt ferme et 100 à 120°D pour un yaourt brassé.

4-2. Les matières premières

☞ Le lait en poudre

C'est généralement la matière première utilisée dans la préparation du yaourt à l'échelle industrielle. Il est obtenu par déshydratation du lait jusqu'à une teneur en eau de 3 à 4%.

Les principaux laits utilisés sont le lait entier à 26% de matière grasse et le lait écrémé à 0% de matière grasse. Ces deux types de lait diffèrent par leur aspect, leur durée de conservation et leur composition centésimale en protéines, glucides, lipides, sels minéraux et humidité comme l'atteste le tableau suivant.

TABLEAU I: Caractéristiques des laits en poudre utilisés à l'échelle industrielle

Nature du lait	Durée de conservation	Composition		Aspect
Lait entier en poudre	12 mois	Lactose	40,00%	Jaune
		Protéines	22,5 + ou -1%	
		Matière grasse	26 -28 %	
		Minéraux	6,5%	
		Humidité	3 – 4%	
Lait écrémé en poudre	18 mois	Lactose	54,00%	Blanc
		Protéines	34%	
		Matière grasse	1,5%	
		Minéraux	8,5%	
		Humidité	4%	

Source : DEFFO Cité par NJASSAP (42).

☞ Le sucre

Les industries laitières utilisent généralement le sucre granulé d'aspect blanchâtre. La composition et la qualité de cette matière première peuvent avoir un impact sur la qualité organoleptique et microbiologique du produit fini.

☞ L'eau

Il s'agit de l'eau potable. Certaines industries disposent d'un équipement de filtration muni d'un préfiltre qui retient les particules grossières, et d'un filtre à bougie qui retient la boue ou les colloïdes et les micro-organismes.

☞ Les ferments lactiques

• Définition

Les ferments lactiques sont un groupe de micro-organismes procaryotes, hétérotrophes et chimioorganotrophes, relativement hétérogènes du point de vue morphologique et physiologique et dont l'une des principales caractéristiques est de produire de l'acide lactique en grande quantité à partir de substances hydrocarbonées.

Selon ORLAJENSEN (1924) cité par ALAIS (2), les germes lactiques peuvent être divisés en deux groupes :

- les homofermentaires qui rassemblent les bactéries produisant des traces de substances accessoires à côté de l'acide lactique (90 à 97% du lactose fermenté) ;
- les hétérofermentaires qui produisent peu d'acide lactique. Deux familles sont couramment citées comme bactéries lactiques, ce sont les Streptococcaceae et les Lactobacillaceae.

• Mode d'action de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*

Ces deux germes sont microaérophiles et supportent très bien les milieux acides (pH 4 – 4,5). Dans le yaourt, ils vivent en symbiose étroite et produisent davantage d'acide lactique que lorsqu'ils sont cultivés seuls.

Au début de la fabrication, le pH du lait est favorable aux streptocoques qui prédominent et assurent le départ de la fermentation lactique. L'action caséolytique des lactobacilles stimule le développement des streptocoques par libération de certains aminosides comme la valine qui les activent. Toutefois, l'acidité se développant, le pH du lait devient défavorable aux streptocoques qui,

progressivement, sont remplacés par les lactobacilles (DEFFO Cité par NJASSAP) (42).

• Préparation du « levain »

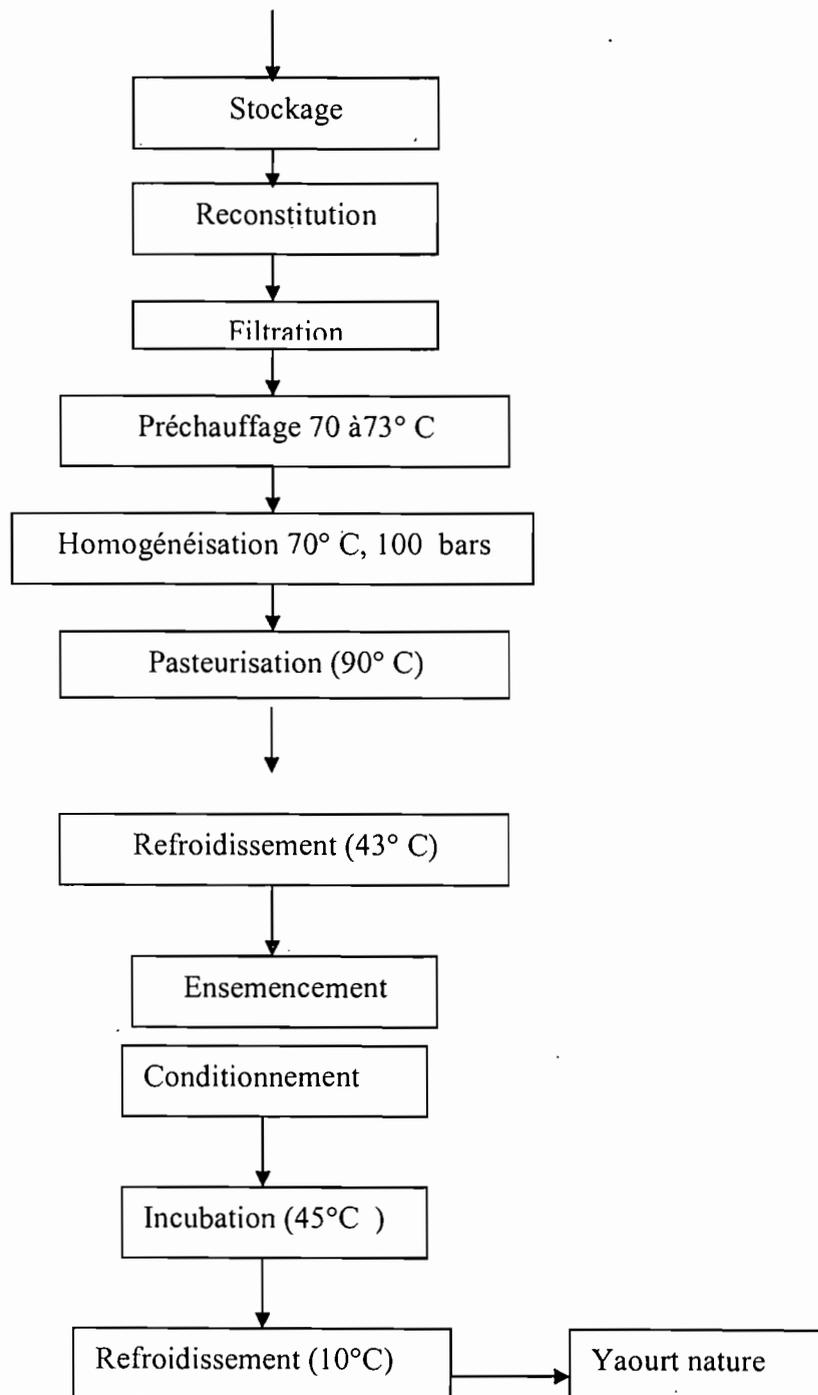
Cent litres de lait pasteurisé à 90°C et refroidi entre 43 et 45° C sontensemencés avec 10 g de culture mixte de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* associés en quantité égale. Après 10 à 15 minutes d'agitation, le mélange est soutiré dans des casseroles et acheminé dans la chambre chaude où l'incubation se passe à 45° C. Après 5 à 6 heures (lorsque la coagulation a eu lieu), le levain ainsi obtenu est refroidi et utilisé après environ 24 heures pour la fabrication (DEFFO Cité par NJASSAP) (42).

4-3. Procédé de fabrication du yaourt

La fabrication de différents types de yaourt (naturel, sucré, aromatisé, fruité) suit le même cheminement de base décrit précédemment (3-3). Le lait en poudre et le sucre réceptionnés sont stockés et utilisés pour la reconstitution du lait dans des cuves suivant des proportions bien définies. Le lait ainsi reconstitué est filtré, puis préchauffé entre 70 à 73°C avant d'être homogénéisé à une pression de 100 bars. Ensuite, il passe dans un pasteurisateur à 90°C.

Le lait est refroidi à 43 et 45°C, propice à l'ensemencement avec les levains dans les cuves prévues à cet effet. Après 10 minutes d'agitation, le lait est conditionné et incubé dans la chambre chaude jusqu'à l'obtention d'une acidité comprise entre 80 et 100° D. Les yaourts sont alors immédiatement refroidis entre 4 et 10°C et prêts à être consommés.

Réception du lait



Source : (18)

FIGURE 2 : Diagramme de fabrication du yaourt nature industriel

CHAPITRE III : MICROFLORE DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS

1. MICROFLORE DU LAIT

1-1. Les bactéries

En raison de la grande diversité des bactéries présentes dans le lait, et en se basant sur un certain nombre de propriétés importantes qu'elles ont en commun, on les divise en deux catégories : les bactéries saprophytes et les bactéries pathogènes.

1-1-1. Les bactéries saprophytes

Les végétaux ou les organismes qui vivent sur les sols riches en matières organiques mortes et en voie de décomposition (sapromasse) dont ils tirent leurs nutriments sont appelés saprophytes. La grande majorité des bactéries et certains champignons sont saprophytes.

1-1-1-1. Flore lactique

Les bactéries lactiques ont une grande importance en laiterie. Leur principale propriété est de produire de l'acide lactique par fermentation du lactose; certains produisent en outre du gaz carbonique et divers composés, dont certains contribuent à l'arôme des produits laitiers.

Par leur production d'enzymes protéolytiques, elles contribuent à l'affinage des fromages. Dans du lait non réfrigéré, elles tendent à prédominer, donnant à celui-ci une certaine protection vis-à-vis de germes indésirables. Cependant, la production d'acide lactique, en faisant baisser le pH, provoque une déstabilisation progressive de la dispersion micellaire, ce qui rend le lait de moins en moins stable aux traitements thermiques et peut entraîner sa coagulation, même à température ambiante.

La flore acidifiante du lait n'est pas uniquement constituée de bactéries lactiques. Des bifidobactéries et des entérobactéries interviennent aussi dans l'acidification (42).

1-1-1-2. Flore d'altération

Ce sont des bactéries et champignons indésirables apportés par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychrotropes.

☞ Flore thermorésistante

Un certain nombre de bactéries sont capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes. Leur développement ultérieur peut provoquer la protéolyse et le caillage non acide du lait pasteurisé (19).

On distingue :

- La flore thermorésistante totale, définie comme la flore résiduelle après un traitement à 63° C pendant 30 minutes ou un traitement équivalent tel que la pasteurisation HTST à 72° C pendant 15 secondes.
- La flore moyennement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 75° C pendant 12 secondes.
- La flore fortement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 80° C pendant 10 minutes. Elle comprend notamment les spores bactériennes, qui nécessitent des températures supérieures à 100° C (25).

Les composantes de cette flore thermorésistante sont : *Micrococcus*, *Microbacterium* et *Bacillus* dont l'espèce *cereus* produit une entérotoxine stable après pasteurisation. Les bactéries sporulées rencontrées en laiterie appartiennent aux genres ci-après :

- Bacillus*, dont les activités enzymatiques peuvent être responsables de l'acidification, la coagulation, ou la protéolyse des laits de longue conservation.
- Clostridium*, qui peut provoquer de graves altérations des fromages à pâte dure, mi-dure et fondue. Ces altérations provoquent à leur tour, le gonflement des fromages et contribuent à leur donner un goût rance et piquant très désagréable. *Clostridium perfringens* est l'une des causes de toxi-infection alimentaire. Après incubation de 8 à 22 heures, des troubles légers et passagers apparaissent : diarrhée profuse, aqueuse, ballonnement, douleurs abdominales (22).

☞ Les coliformes

Presque toujours présents dans le lait cru, ils ont une grande importance en laiterie. Du point de vue technologique, ils assurent la fermentation du lactose, produisant, outre des acides, des gaz (hydrogène et gaz carbonique) qui font gonfler les fromages. De plus, les coliformes élaborent diverses substances conférant aux produits des goûts et des odeurs très désagréables. Du point de vue hygiénique, un grand nombre d'entre eux étant les hôtes de l'intestin des mammifères, leur présence dans le lait (comme dans l'eau) est l'indice d'une contamination fécale. Cet indice est mis à profit dans l'examen de la qualité sanitaire des produits. Certaines espèces (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*...) peuvent être responsables d'infections gastro-intestinales (25).

☞ La flore psychrotrophe

On désigne par psychrotrophe, les micro-organismes qui ont la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7 °C, indépendamment de leur température optimale de croissance (en général, dans le lait, c'est le genre *Pseudomonas* qui domine). Dans des laits refroidis, cette flore peut devenir la flore dominante, notamment quand ceux-ci ne sont pas récoltés dans d'excellentes conditions hygiéniques et qu'ils sont maintenus plus de 24 à 48 heures dans les conditions habituelles de réfrigération (+3 à +4 °C). Si l'on tient compte de leurs temps de génération, la population des psychrotrophes peut être multipliée par 10 en 24 heures à 4°C et par 4 à 1°C. Ces genres peuvent produire des lipases et des protéases thermorésistantes ayant pour conséquence l'apparition de goûts très désagréables dans les produits laitiers : goût amer, rance, putride, etc. La protéolyse peut aussi entraîner une déstabilisation progressive de la dispersion micellaire des laits UHT aboutissant à leur gélification avec altération du goût.

1-1-2. Les bactéries pathogènes

Les produits laitiers et le lait cru avec lequel ils sont fabriqués, de même que ceux ayant subi un traitement d'assainissement peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme. L'animal, l'environnement et l'homme peuvent être à l'origine de cette contamination. C'est ainsi que l'on peut citer :

1-1-2-1. Les staphylocoques

Pasteur a observé, en 1879, dans des pus de furoncle et d'ostéomyélites « un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associé en petit amas ». Les staphylocoques, qu'il venait de décrire, sont des Cocci à Gram positif. Actuellement, on distingue 44 espèces. L'espèce *S. aureus*, (plus communément appelé staphylocoque doré) se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulase négative (SCN) par la présence d'une coagulase. *S. aureus* est un germe qui occupe une place importante aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales.

Les Staphylocoques survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions hostiles de l'environnement, telles que : la chaleur (ils résistent 1 heure à 60° C), la sécheresse (ils survivent plusieurs mois dans les produits pathologiques desséchés) ou la salinité de l'eau.

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement.

Le site de colonisation préférentielle de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale. En effet, 30% des adultes hébergent *S. aureus* de façon permanente, 50% de façon intermittente et 20% ne sont jamais porteurs. La transmission intra ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux).

Pour ce qui est des intoxications alimentaires, elles sont provoquées par l'ingestion d'entérotoxines. Ces toxines thermostables sont produites par les souches de *S. aureus* contaminant l'aliment. Les aliments le plus souvent incriminés sont les produits laitiers et la viande. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures après ingestion), des crampes abdominales douloureuses, des diarrhées, des vomissements et l'absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement mais la survenue de choc toxique staphylococcique est possible lors d'une intoxication massive. En fonction des études, les intoxications alimentaires à *S. aureus* représenteraient 15 à 30% des toxi-infections alimentaires. (51)

1-1-2-2. Les Entérobactéries

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif, de dimensions moyennes (0,5µm sur 3µm), présentant les caractéristiques suivantes :

- immobiles ou mobiles, mais dans ce cas, toujours grâce à une ciliature péritriche (sauf *Tatumella*)
- pouvant posséder une capsule, mais jamais de spore
- se développent aisément sur milieu ordinaire
- anaérobie facultatif
- font fermenter le glucose avec ou sans gaz
- ne possèdent pas d'oxydase
- réduisent les nitrates en nitrites (quelques exceptions parmi *Erwinia*)
- possèdent une catalase à l'exception de *Shigella dysenteriae* (20).

Le chef de file de cette famille est le genre *Escherichia* avec comme espèce principale *Escherichia coli*.

☞ *Escherichia coli*

Escherichia coli est une entérobactérie fermentant le glucose et le lactose avec production de gaz. Elle est l'une des espèces bactériennes le plus souvent rencontrées en pathologie humaine. Les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques des infections à *E.coli* ont très rapidement progressé, mettant en lumière la très grande diversité des facteurs de virulence de cette espèce.

Les bactéries appartenant à l'espèce *E.coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et des animaux. Certaines souches de *E.coli* sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néonatales.

D'autres souches appartiennent à la flore commensale et peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies. Les souches bactériennes responsables d'entérites sont transmises par ingestion à partir de l'environnement (eau, aliments) contaminé par les selles des malades ou des porteurs. Les *E. coli* entéro-pathogènes dits EPEC, responsables d'épidémies meurtrières de gastro-entérites infantiles entre 1950 et 1970, ont pratiquement disparu actuellement des pays occidentaux où l'on ne signale que quelques cas sporadiques. Cependant, il existe actuellement des épidémies meurtrières à souches EPEC dans le tiers-

monde (Brésil), où ces bactéries sont un problème important de santé publique. Les souches entéro-toxinogènes dites ETEC sont répandues dans le tiers-monde. *E. coli* est l'un des agents le plus souvent responsable de diarrhées du petit enfant, de diarrhée du voyageur, ou d'épidémie de toxi-infections alimentaires dans les pays occidentaux.

On estime que 10 à 20% des femmes sont susceptibles de développer une infection urinaire pendant leur vie. Les pyélonéphrites seraient causées dans 60 à 80% des cas par des souches de *E. coli* uro-pathogènes cela donne l'ampleur du problème posé par ce type d'infection. De plus, 40% des méningites et septicémies néo-natales sont dues à des *E. coli* K1.

Les infections urinaires, néo-natales et aussi nosocomiales trouvent surtout leur origine dans la flore endogène du tube digestif ou du tractus génital, mais peuvent également être transmises d'un sujet à l'autre à partir du matériel contaminé (8).

☞ Les Salmonelles

Les salmonelles sont des Entérobactéries, fermentant le glucose avec production de gaz (sauf *S. Typhi*), mais ne fermentent pas le lactose. Elles ont aussi un tropisme digestif et sont pathogènes pour l'homme et de nombreux animaux vertébrés.

Certains sérotypes sont très virulents et apparaissent pathogènes seulement pour une espèce animale donnée. Tel est le cas des salmonelles responsables chez l'homme des fièvres typhoïdes (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B, C) (6), et celles pathogènes pour les ovins (*S. Abortus-ovis*) ou les volailles (*S. Gallinarum-Pullorum*). D'autres salmonelles ont un pouvoir pathogène ubiquitaire et peuvent déterminer des infections chez de nombreuses espèces animales. Ces sérotypes sont responsables de zoonoses et de toxi-infections alimentaires chez l'homme.

De très nombreux sérotypes de salmonelles (*S. Typhi*, *S. Gallinarum-Pullorum*, *S. Enteritidis*, *S. Wien*, *S. Havana*, parmi les plus fréquents) sont responsables de ces toxi-infections qui restent habituellement localisées au niveau du tube digestif. L'incubation est courte, de 12 à 24 heures après l'ingestion de l'eau ou des aliments contaminés. Il s'agit d'une gastro-entérite aigue avec fièvre (38-39°C), vomissements et diarrhée banale. La gravité de cette infection est surtout liée à l'importance de la déshydratation qu'elle peut entraîner, en particulier chez le nourrisson et le vieillard. La dissémination sanguine de ces salmonelles reste une éventualité rare. Elle se voit surtout chez des sujets aux défenses amoindries : dénutrition, cancer ou maladie hématologique maligne (leucémie lymphoïde chronique), déficit immunitaire congénital ou acquis, drépanocytose.

Les salmonelles sont capables de survivre et de se multiplier dans le cytoplasme des macrophages. Le mécanisme bactérien de cette virulence reste totalement inconnu, de même que la nature exacte des antigènes responsables de l'immunité. Le déterminisme génétique serait plasmidique pour certains sérotypes responsables des toxi-infections alimentaires (*S. Typhimurium*) (9).

☞ Les Shigelles

Les shigelles sont des entérobactéries immobiles extrêmement proches de *Escherichia Coli* mais ne produisent pas de gaz. Elles sont classées en quatre espèces, elles mêmes différentes par leur caractère antigénique.

- Groupe A : *S.dysenteriae* avec 10 sérotypes différents
 - Groupe B : *S.flexneri* avec 6 sérotypes responsables de 20% de shigellose.
 - Groupe C : *S. boydii* avec 15 sérotypes très répandus en Afrique.
 - Groupe D : *S. sonnei*. Il existe un seul type responsable de 20% de shigelloses.
- Les shigelles entraînent chez l'homme, une colique infectieuse endémo-épidémique, la dysenterie. Le traitement préventif est très important car la dysenterie bacillaire est par excellence une maladie féco-orale : (« maladie des mains sales »). Il faudrait donc assurer une bonne hygiène corporelle, contrôler l'eau potable, isoler les malades et désinfecter des excréta (12).

☞ *Yersinia*

Les *Yersinia* sont aussi des entérobactéries et l'espèce principale est *Yersinia pestis*, isolée en 1894 à Hong-Kong par Alexandre Yersin. Cependant, depuis cette date, de nombreuses autres espèces proches ont été reconnues, certaines isolées de l'environnement et non pathogènes (*Yersinia intermedia*, *Yersinia frederiksenii*, et *Yersinia kristensenii*), d'autres responsables de zoonoses à tropisme digestif pouvant sporadiquement atteindre l'homme (*Yersinia pseudotuberculosis* ou bacille de Malassez et Vignal, *Yersinia enterocolitica*).

La peste est aujourd'hui confinée à quelques régions déshéritées, et cette maladie peut être guérie par une antibiothérapie précoce (49).

1-1-2-3. Les *Campylobacter*.

Les *Campylobacter* vivent habituellement en commensaux dans le tube digestif de nombreux animaux : bovins, ovins, porcs, volailles, oiseaux sauvages et plus rarement chiens et chats.

Ce sont des bactéries qui ne fermentent et n'acidifient jamais les glucides ; leur métabolisme est de type respiratoire. Toutes les espèces de *Campylobacter* possèdent une oxydase mais seules certaines d'entre elles produisent une catalase (*Campylobacter jejuni*) (23).

La sensibilité des sujets semble très variable. Une ingestion de 500 germes est suffisante pour provoquer une diarrhée chez certaines personnes, tandis qu'une dose inférieure à 10^4 est inopérante dans la majorité des cas. La contamination est généralement indirecte, par consommation de viandes mal cuites (volailles), de lait non pasteurisé ou d'eau polluée.

Les *Campylobacter* peuvent survivre plusieurs semaines dans le lait ou l'eau conservé à $+4^{\circ}$ C. En revanche, un traitement rigoureux du lait par pasteurisation, ou de l'eau par chloration suffit à éliminer ces germes. Le lait pourrait favoriser l'infection par *C. jejuni* en élevant le pH gastrique, car cette bactérie est rapidement tuée par l'acide chlorhydrique à pH 2,3. Un contact direct de l'homme avec un animal infecté, d'élevage ou de compagnie (chien, chat) est un risque supplémentaire de contamination (28).

1-1-2-4. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif très répandu dans la nature et capable de provoquer des infections sévères chez l'homme et chez l'animal, apparaissant sporadiquement ou par petites épidémies.

Ainsi, cette bactérie est-elle tenue responsable d'infection chez 37 espèces de mammifères, 18 espèces d'oiseaux, des poissons, des crustacés et même des insectes. La listériose peut atteindre n'importe quel animal.

Chez les mammifères monogastriques et les oiseaux, la maladie est proche de ce que l'on observe chez l'homme (septicémie et méningo-encéphalite).

Chez les ruminants, en revanche, il s'agit surtout d'encéphalites sans atteinte méningée ou d'atteintes génitales avec avortement (10).

1-1-2-5. Les Mycobactéries

Classiquement, l'inclusion dans le genre *Mycobacterium* repose sur des propriétés morphologiques et tinctoriales. Les mycobactéries se présentent comme des bacilles droits ou légèrement incurvés, de 1 à 10 μm de long et de 0,2 à 0,6 μm de large, immobiles, incapables de former des spores, conidies et capsules. La croissance parfois filamenteuse ou en forme de mycélium, donne lieu à la formation d'éléments bacillaires ou coccoïdes.

La composition particulière de la paroi, leur confère une acido-alcoolo-résistance mise en évidence par des techniques de coloration spécialement développées, dérivées de la méthode originale de Ziehl-Neelsen (33).

La famille des *Mycobacteriaceae* de l'ordre des Actinomycetales ne comprend que le genre *Mycobacterium* dans lequel on distingue les espèces suivantes :

- groupe "tuberculosis"
 - *Mycobacterium tuberculosis*
 - *Mycobacterium africanum*
 - *Mycobacterium bovis*
- les "atypiques"
 - *Mycobacterium kansasii*
 - *Mycobacterium marinum*
 - *Mycobacterium gordonae*
 - *Mycobacterium xenopi*
 - *Mycobacterium avium-intracellulare*
 - *Mycobacterium scrofulaceum*
 - *Mycobacterium ulcerans*
 - *Mycobacterium fortuitum*
 - *Mycobacterium malmoense*
- et *Mycobacterium leprae*

☞ *Mycobacterium tuberculosis*

Agent principal de la tuberculose humaine, *M. tuberculosis* ne se trouve pas dans la nature en dehors de produits provenant de l'homme infecté. Certains animaux vivant au contact de l'homme peuvent toutefois être contaminés (singes, chiens, chats, canaris, perruches...).

☞ *Mycobacterium africanum*

En 1966, à Dakar, au cours d'une enquête thérapeutique menée par l'Union Internationale Contre la Tuberculose, ont été isolées de nombreuses souches de bacilles de la tuberculose qui ne ressemblaient ni à *M.tuberculosis* ni à *M.bovis* mais qui étaient intermédiaires à ces deux espèces. En raison de leur origine, ces souches ont été appelées *M.africanum*. *M.africanum* représente 20 à 40% des souches isolées au Sénégal et en Mauritanie. A l'examen microscopique, son aspect est identique à celui de *M.tuberculosis*.

☞ *Mycobacterium bovis*

Son rôle est actuellement très limité comme agent de la tuberculose humaine en France, mais peut être important dans les pays où la tuberculose bovine est fréquente et le lait consommé cru.

Le bacille se transmet à l'homme soit par voie respiratoire en raison des lésions pulmonaires des bovidés, soit par voie digestive en raison des lésions mammaires qui entraînent le passage de bacilles dans le lait. Dans ce cas, l'infection de l'homme se fait par la consommation de lait ou de beurre ;

La primo-infection par *M. bovis* étant souvent digestive, les localisations humaines extra-pulmonaires sont plus fréquentes qu'avec *M.tuberculosis* (21).

La tuberculose fait partie de la liste des maladies réputées légalement contagieuses (MRLC) ; donc à déclaration obligatoire. La maladie cause des lésions caractéristiques, les tubercules, petites masses arrondies localisées le plus souvent au niveau du poumon, mais il peut exister d'autres formes de tuberculose. Le vaccin BCG protège l'homme de la tuberculose.

1-1-2-6. Les Rickettsies : *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii, agent de la fièvre Q est une zoonose (maladie transmissible d'un animal vertébré à l'homme).

La fièvre Q a été décrite pour la première fois en 1935 chez des employés d'un abattoir de Brisbane en Australie. L'infection a dans un premier temps été appelée fièvre des abattoirs puis « Query fever », query signifiant « question » pour souligner les incertitudes concernant son étiologie et son épidémiologie.

La maladie est caractérisée par la grande variabilité de sa présentation clinique : la fièvre Q aiguë est la primo-infection, généralement bénigne sauf chez certains

Les plus connues sont :

Brucella abortus : associée à la brucellose bovine ;

Brucella melitensis : associée à la brucellose des petits ruminants ;

Brucella suis : associée à la brucellose porcine.

Les trois espèces sont pathogènes pour l'homme. La présence de *Brucella* n'est pas exceptionnelle. Il faut donc rester vigilant. La brucellose serait présente dans toutes les régions du Sénégal et plus particulièrement dans les zones de Tambacounda, Kolda, Ziguinchor, Diourbel, Louga, Kaolack.

Au Sénégal, l'infection brucellique revêt un caractère plus sournois.

L'avortement existe, mais semble rare et demeure souvent non identifié (Diop, 1975, Konté, 1981, Akakpo, 1986 cité par Dieng) (22). En conséquence, les transformateurs qui achètent du lait aux éleveurs n'ont généralement pas l'assurance qu'il soit indemne de contaminations par ces bactéries. Ceci conduit à recommander la pasteurisation systématique des laits à transformer afin d'éliminer les brucelles. Chez l'animal, la brucellose se manifeste par une atteinte de l'appareil génital entraînant un avortement, surtout pendant le dernier tiers de gestation. Chez l'homme, les signes cliniques sont les maux de tête, les douleurs musculaires, la transpiration avec une fièvre ondulatoire pouvant atteindre 40°C. Elle est souvent confondue avec le paludisme. Chez les femmes enceintes, des avortements se produisent. La contamination humaine s'opère après consommation des produits laitiers ou carnés contaminés ou par contact avec les animaux infectés.

1-2. Autres micro-organismes

1-2-1. Les levures et les moisissures

1-2-1-1. Les levures

Bien que souvent présentes dans le lait, elles s'y manifestent rarement. Peu d'entre elles sont capables de fermenter le lactose. Certaines sont utilisées dans la production de laits fermentés. Par leurs enzymes protéolytiques, elles jouent un rôle dans la formation de l'arôme.

Les levures peuvent aussi être néfastes. Des levures du genre *Torulopsis*, productrices de gaz à partir du lactose, supportent des pressions osmotiques élevées et sont capables de faire gonfler des boîtes de lait concentré sucré. Certaines sont responsables de fermentations gazeuses dans les crèmes fermières et les laits caillés frais. La présence de levures à la surface des yaourts, fromages

à pâte fraîche, crème et beurre sont l'indice d'une pollution qui déprécie l'aspect et le goût des produits. Les levures peuvent aussi participer à la désacidification de la pâte de divers fromages en début d'affinage.

1-2-1-2. Les moisissures.

Sans importance dans le lait liquide, elles intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers. Elles se développent en surface ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases. Des pénicilliums sont utilisés pour recouvrir la croûte des fromages à pâte molle d'une « fleur » blanche et pour former des veines de couleur bleue dans les fromages à pâte persillée (25).

D'autres moisissures, souvent colorées, peuvent se développer sur divers produits (crème, beurre, fromage, yaourt, poudre de lait). Elles diminuent leur qualité organoleptique. Bien que très généralement sans danger du fait de l'absence de mycotoxines, les produits sur lesquels elles prolifèrent sont le plus souvent considérés comme impropres à la consommation.

1-2-2. Les virus et parasites

1-2-2-1. Les virus

Les principaux virus associés au secteur laitier sont ceux de l'hépatite A et les bactériophages.

Ces bactériophages ou phages, attaquent de jeunes bactéries ou les ferments en pleine phase de multiplication dite phase logarithmique. Il serait également possible de retrouver le virus de la peste bovine et celui de la fièvre aphteuse dans le lait. L'excrétion de ce dernier se fait avant et après l'expression clinique de la maladie. Celui de la peste bovine est détruit par la pasteurisation.

Selon Boivert, cité par Seydi (48), les virus de l'Encéphalite à tiques, para influenza, syncytial bovin et poliovirus seraient isolés du lait.

SEYDI (48) a également rapporté la présence dans le lait des adénovirus et des poxvirus.

1-2-2-2. Les parasites

La consommation du lait peut provoquer certaines parasitoses. Seydi, cité par MONOTE (37), a répertorié la balantidiose, la dysenterie amibienne, la toxoplasmose, etc.

Dans d'autres circonstances, le lait est souillé par des œufs de métazoaires qui provoquent chez le consommateur l'ascaridiose et l'oxyurose.

Au vu de la présence réelle dans notre environnement de ces germes ci-dessus décrits, en plus des effets néfastes qu'ils provoquent dans nos élevages et même chez l'homme, il importe de comprendre l'origine des contaminations par ces germes, ainsi que leur prolifération au sein de leur hôte

2. ORIGINE DES CONTAMINATIONS ET DEVELOPPEMENT DES MICRO-ORGANISMES

2-1. Origine des contaminations

Le lait d'un animal parfaitement sain, traité de façon aseptique est normalement dépourvu de micro-organismes.

A la sortie de la mamelle, le nombre de germes est très faible, généralement inférieur à 5000/millilitre. Ils proviennent de l'extérieur et pénètrent dans la mamelle par le canal du trayon.

Dans le cas d'infections de la mamelle, le nombre de germes augmente peu (sauf dans le cas de mammites cliniques), mais ils sont en majorité constitués de bactéries pathogènes notamment staphylocoques et streptocoques (25).

Ainsi hormis les infections de la mamelle, la contamination se fait pour l'essentiel au cours des diverses manipulations de l'amont (l'homme, préparation de la vache, technique de traite) jusqu'en aval (commercialisation). Le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (bidons, cuves, tanks), ainsi que l'homme qui est également une source de contamination du lait lors des manipulations.

2-2. Développement des microorganismes

Trois facteurs principaux conditionnent la croissance microbienne : le nombre initial de germes, la température et la durée de conservation.

A la sortie de la mamelle, le lait est à la température de l'animal (37°C) chez la vache. Malgré cette condition favorable à la multiplication de nombreux germes, celle-ci est inexistante pendant les quelques heures qui suivent la traite, en raison du pouvoir bactériostatique du lait frais. Dans la mesure où l'on dispose des moyens nécessaires, il est hautement souhaitable de profiter de cette période pour refroidir le lait afin de ralentir la prolifération des micro-organismes dès la phase bactériostatique passée.

Le tableau II ci dessous montre l'influence des facteurs précités sur la croissance des bactéries aérobies mésophiles (improprement appelées « flore totale ») à différentes températures. En prenant, par exemple, les valeurs de ce tableau, et si l'on admet qu'un lait de qualité moyenne ne doit pas contenir plus d'un million de germes par millilitre au moment de son traitement, on voit que lorsque sa population initiale est faible, il peut se conserver 4 jours à 4,5°C, un peu plus de 3 jours à 10°C, et moins de 24 heures à 15,5°C et à 25°C.

Tableau II : Multiplication de la flore aérobie mésophile en fonction de la température et de la durée de conservation

Température de conservation °C	Nombre de bactéries Par ml	Facteurs de multiplication			
		24 heures	48 heures	72 heures	96 heures
4,5	4200	1	1,1	2	4,7
10	4200	30	33	136	9400
15,5	4200	380	7860	77800	229000
25	4200	7000	15600	88500	240000

Source : (25)

3- INTERET DE LA RECHERCHE DES MICRO-ORGANISMES

3-1. Intérêt hygiénique

L'examen microbiologique permet d'évaluer le niveau de contamination des denrées alimentaires et de la nature de leur microflore. Il est d'un très grand intérêt dans le cadre du contrôle officiel ainsi que des autocontrôles mis en œuvre par les industriels pour garantir la salubrité des denrées qu'ils commercialisent. Il est donc indispensable d'analyser le produit afin d'en déterminer le contenu et mettre le consommateur à l'abri de toute éventualité pouvant porter préjudice à sa santé.

3-2. Intérêt nutritionnel

Lorsque les laits ou les produits laitiers sont contaminés par certains germes protéolytiques ou lipolytiques, cela entraîne une perte de leurs valeurs nutritionnelles, due à la dénaturation des protéines, et des vitamines. D'où l'intérêt de cette étude des micro-organismes, ce qui permettrait de les éviter au maximum afin de conserver au lait de consommation toutes ses vertus nutritionnelles.

3-3. Intérêt technologique

Toute denrée, à la fabrication et à la conservation, est conditionnée par la qualité microbiologique de la matière première.

Pour le cas du lait, on préconise une utilisation précoce du froid, car un lait placé à basse température se caractérise par un accroissement de la stabilité du lait, un ralentissement du développement microbien pour la flore de contamination, et une inhibition de la flore pathogène. Cependant, certaines bactéries (Gram +) sont généralement plus résistantes à ce stress que d'autres (Gram -). Le froid n'est pas bactéricide, donc, un lait mauvais d'avance ne saurait être transformé en bon lait.

Les microorganismes sont normalement détruits par la chaleur, à des températures supérieures à 60°C. Cependant, certains microorganismes produisent des spores qui les protègent de la chaleur. Dans l'ordre, les microorganismes sporulants les plus résistants sont : *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, et *Bacillus cereus* (29).

L'acidification permettrait l'élimination de certains micro-organismes dont les salmonelles et les coliformes. Son efficacité, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de ses toxines n'est pas prouvée (39).

Il est donc indispensable de limiter au maximum, dès la production, le nombre de ces germes par une excellente hygiène.

Le souci de maîtriser et de gérer les risques de contamination lors des opérations de fabrication des produits laitiers au Sénégal, a entraîné en 2005 au sein de la filière lait, l'élaboration d'un système de transformation. Pour être efficace, ce système doit prendre en compte les bonnes pratiques d'hygiène afin de dégager les facteurs de risque d'insalubrité.

CHAPITRE IV : SYSTEME DE TRANSFORMATION DU LAIT AU SENEGAL ET GUIDE DE BONNES PRATIQUES D'HYGIENE

1-FILIERE LAIT AU SENEGAL

Le secteur laitier au Sénégal est marqué depuis ces dix dernières années par deux types d'évolutions : la reprise des importations de produits laitiers, notamment de la poudre de lait, évoluant vers la reconstitution puis la transformation de ce lait en poudre d'une part, et différentes dynamiques de développement de la production laitière locale d'autre part.

1-1. La transformation du lait naturel

1-1-1 Les micro entreprises artisanales : femmes d'éleveurs et transformatrices urbaines

Une grande partie de la production locale passe par ce système de transformation individuel en milieu urbain et rural. Les principaux produits proposés sont le *lait caillé*, le *beurre* et « *l'huile de beurre* » (*diwu nior*).

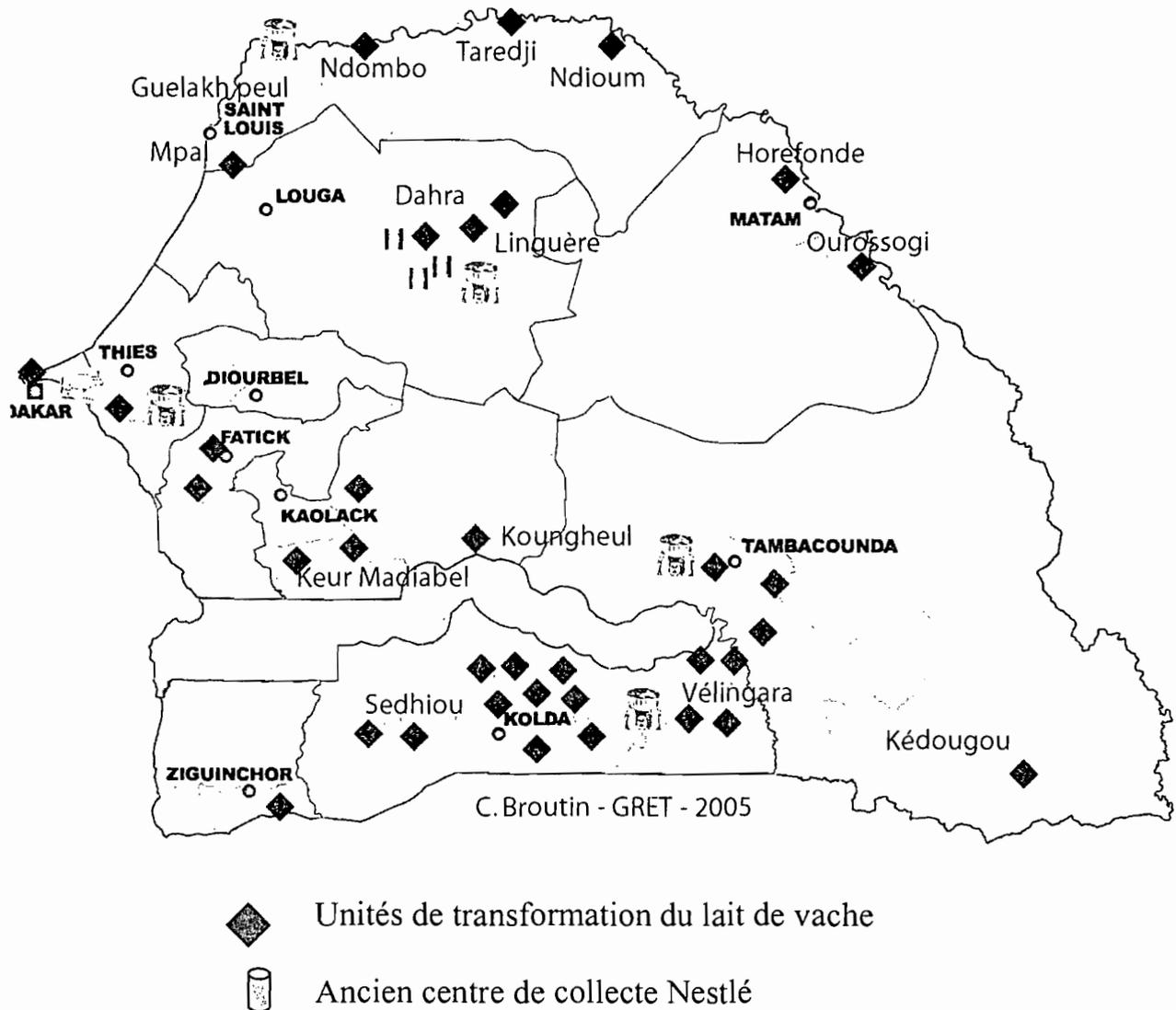
Le lait caillé (principale forme de vente en milieu urbain et rural) se vend sur le marché à l'aide d'une petitealebasse en forme de louche ou d'un pot en plastique dont la contenance est proportionnelle au prix ou au poids.

1-1-2. L'essor des petites entreprises de pasteurisation (mini laiteries)

Ces unités se caractérisent par un aménagement du lieu de production et des volumes transformés plus importants, mêmes s'ils demeurent modestes (20 à 400 l/j et jusqu'à 700 l/j).

Le niveau d'équipement est faible (marmites en inox, réchaud à gaz, soudeuses sachets, réfrigérateur et glacière). La production demeure encore relativement faible et irrégulière (cessation temporaire d'activités). Un nombre croissant d'unités a été identifié (environ 40 en 2005 contre une dizaine en 2000) ; celles-ci ont généralement bénéficié d'appui de projet (PAPEL) ou de structures vétérinaires

Sans Frontière). Elles sont pratiquement toutes implantées dans des villes secondaires, dans des zones de production (Figure 3)



Source : 18

Figure 3 : Les petites unités de transformation du lait au Sénégal

1-2. La transformation du lait en poudre : des micro-entreprises artisanales

Il s'agit d'activités individuelles de production de lait caillé, généralement exercées par des hommes. Ces transformateurs possèdent des places au niveau des marchés

(boutiques en bois ou en dur) où ils vendent leur produit, généralement le soir, dans la rue au niveau des quartiers. Ils produisent également sur commande pour les cérémonies familiales et religieuses.

La majorité des transformateurs s'approvisionnent en lait en poudre auprès des importateurs et des grossistes. On note cependant que certains transformateurs sont des adhérents des coopératives laitières qui importent du lait en poudre. La transformation se fait sur le lieu de vente. Les transformateurs utilisent de grandes bassines en plastique et des petits batteurs artisanaux en bois pour battre et homogénéiser le lait caillé.

Pour accélérer la fermentation, ils utilisent fréquemment des comprimés « caille-lait » (enzymes) achetés dans les pharmacies ou chez des détaillants et ajoutent un peu de lait caillé de la veille. Les clients consomment sur place ou à domicile. Certaines vendeuses de *thiacry* et *fondé* (bouillies de mil) s'approvisionnent également auprès de ces vendeurs. D'autres préparent le lait caillé à domicile.

L'étude de ce système de transformation du lait nous permet de constater que dans les deux cas de figure (transformation du lait naturel et lait en poudre), le matériel utilisé est traditionnel (calebasse, louche,...), ce qui n'augure d'aucune garantie sur la maîtrise des contaminations. Il était donc très important de mettre à la disposition de ces transformateurs un Guide de bonnes pratiques d'hygiène.

2- GUIDE DE BONNES PRATIQUES GENERALES

Il s'agit en fait des fiches de bonnes pratiques qui synthétisent les moyens de maîtrise proposés par les professionnels pour chaque risque majeur identifié et les éléments de surveillance de l'efficacité des moyens mis en œuvre (18).

2-1. Hygiène du personnel

☞ Fiche1 : Hygiène corporelle et vestimentaire

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Contamination par les mains souillées ou mal lavées. ▪ Contamination du produit par les manipulations avec une tenue inadaptée, ou par contact du produit avec les cheveux, bijoux. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Formation du responsable de la laiterie aux BPH, sensibilisation du personnel et suivi de leur application ▪ Se laver les mains de manière efficace avant et après toute manipulation des produits et après tout passage aux toilettes ou sortie de la salle. ▪ Installer des lavabos si possible à commande non manuelle avec du savon et du désinfectant ▪ Limiter les déplacements du personnel (notamment entre les différentes pièces). ▪ Retirer les bijoux, attacher et couvrir les cheveux longs avec une coiffe/charlotte ou un foulard, couper les ongles à ras. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contrôle visuel : ▪ des installations sanitaires et lieux de lavage des mains, ▪ hygiène corporelle des opérateurs, ▪ propreté des tenues spécifiques et des torchons, ▪ application des bonnes pratiques d'hygiène (BPH) et des bonnes pratiques de fabrication (BPF)

☞ Fiche 2 : Etat sanitaire du manipulateur ou du personnel.

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Contamination du produit par des manipulateurs malades (affections respiratoires et cutanées) ou par des porteurs sains 	<ul style="list-style-type: none"> Visite médicale tous les 6 mois et en cas de suspicion, mise en congés des personnes malades. Désinfecter et protéger toute blessure par des pansements étanches. Limiter, voire interdire, l'accès à la salle de transformation aux visiteurs, qui dans tous les cas devront revêtir des vêtements propres fournis par l'entreprise. 	<ul style="list-style-type: none"> Contrôle du carnet de santé. Contrôle visuel de la protection des blessures et de l'état de santé du personnel.

2-2. Gestion des matières (autre que le lait cru).

☞ Fiche 3 : Approvisionnement

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques et physiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Les matières premières (lait en poudre, sucre, arômes, eau...) peuvent véhiculer des micro-organismes, ainsi que divers débris, (notamment quand le reconditionnement est fait par le distributeur) 	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier les conditions de stockage des matières premières chez le fournisseur (local fermé, aéré, propre...). Autant que possible, pour les produits importés, demander au fournisseur le certificat sanitaire et l'autorisation de mise en vente délivrés par les autorités compétentes Vérifier les indications de l'étiquette (DLC, caractéristiques du produit) et que son utilisation est autorisée (additifs) avant tout achat. Acheter de préférence les produits dans leur emballage d'origine (lait en poudre). Pour le lait cru, se reporter aux fiches par opération unitaire 	<ul style="list-style-type: none"> Contrôle visuel chez le fournisseur.

☞ Fiche 4 : Utilisation des matières premières

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Les matières premières (lait en poudre, sucre, arômes, eau...) et les ustensiles peuvent véhiculer des micro-organismes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utiliser de l'eau potable. ▪ Autant que possible utiliser l'eau provenant directement des robinets et si nécessaire vérifier sa potabilité. ▪ Laver et désinfecter les ustensiles nécessaires au prélèvement. ▪ Mettre de préférence le sucre pendant la pasteurisation du lait. ▪ Respecter la DLC et le dosage préconisé par le fabricant. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contrôle visuel de l'hygiène du personnel et des ustensiles ▪ Vérification de la DLC ▪ Analyse de l'eau.

☞ Fiche 5 : Stockage

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Les micro-organismes peuvent être apportés par un local sale, trop humide, mal rangé 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Refermer soigneusement les sacs ouverts avant de les stocker. ▪ Stocker les matières premières (sacs de sucre, de poudre de lait...) sur des palettes dans un endroit propre, sec et aéré et à l'écart du lieu de transformation. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contrôle visuel de la propreté du lieu de stockage

2-3. Hygiène du matériel

☞ Fiche 6 : Matériaux

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Danger microbiologique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ L'usage des ustensiles en matériaux inadaptés (bois), contamine le produit par un apport en micro-organismes ou en débris physiques. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Éviter l'usage de matériel en bois et préférer plutôt du matériel en aluminium ou en plastique alimentaire, facilement lavable (changement fréquent). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contrôle visuel

☞ Fiche 7 : Entretien du matériel

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Danger microbiologique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ L'utilisation de matériels mal lavés, mal désinfectés ou abîmés est une source potentielle de contamination. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Respecter le plan de nettoyage et de désinfection. ▪ Utiliser le matériel uniquement pour la transformation du lait. ▪ Laver et désinfecter le matériel avant et après chaque utilisation. <p>Désinfection chimique (eau de Javel rincer à l'eau chaude,</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ sécher les ustensiles. <p>Désinfection thermique (plonger les ustensiles pendant 5 minutes dans l'eau bouillante,)</p> <p>sécher les ustensiles.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Faire sécher le matériel dans un local fermé. ▪ Ranger le matériel à l'abri d'éventuelles contaminations (placard fermé). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vérification du suivi du plan de nettoyage ▪ Application des prescriptions décrites par le constructeur de l'appareil ▪ Vérifier la qualité du désinfectant utilisé.

2-4. Conception des locaux

☞ Fiche 8 : Locaux

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Danger microbiologique</u></p> <p>▪ Risques de contamination microbienne du lait par le contact entre produits «sales» et «propres» (danger de contaminations croisées), par le défaut d'hygiène des sols, murs, plafonds et autres surfaces de contact (voir nettoyage et désinfection).</p>	<ul style="list-style-type: none">▪ Effectuer la transformation dans une enceinte close à l'abri de la poussière et des animaux nuisibles.▪ Respecter le principe de la «marche en avant» dans l'espace ou dans le temps qui suppose que les flux des produits «propres» et «sales» ne se croisent pas.▪ Respecter le principe de séparation des secteurs sains et souillés et éviter une trop grande proximité entre la porte d'entrée et la porte de sortie.▪ Prévoir les systèmes d'évacuation des eaux usées, des eaux de nettoyage et des déchets.▪ Prévoir des locaux, matériaux et surfaces facilement lavables et désinfectables.	<ul style="list-style-type: none">▪ Examen des plans avant construction

2-5. Hygiène des locaux et environnement

☞ Fiche 9 : Sols, surfaces de travail

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Contamination par la poussière qui abrite de nombreux germes ▪ Les murs dégradés et les plafonds percés peuvent abriter des moisissures et des levures. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Élaborer et respecter un plan de nettoyage des locaux et du matériel qui comprend : la fréquence à laquelle les différentes opérations de nettoyage sont effectuées, le mode opératoire à suivre (produit rinçage...), les responsables des opérations de nettoyage. ▪ Effectuer un nettoyage général de l'unité (murs, plafonds, fenêtres, abords de l'unité) chaque fois que nécessaire et au minimum une fois par an. Désinfection chimique (eau de Javel le plus souvent, respecter les doses prescrites (en fonction du degré chlorométrique) respecter le temps de contact avec la surface à désinfecter (15 minutes au minimum), 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vérification du respect du plan de nettoyage. ▪ Vérifier la qualité du désinfectant (eau de Javel par exemple) :

☞ Fiche 10 : Lutte contre les nuisibles (mouches, rats, souris, cafards)

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Les insectes et les rongeurs véhiculent de nombreux germes pathogènes (salmonelles, staphylocoques, germes responsables d'anthropozoonoses), susceptibles de contaminer le lait. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disposer d'une aire de stockage fermée et séparée du lieu de transformation (ou placard fermé). ▪ Installer des moustiquaires aux fenêtres et des pièges mécaniques pour les rongeurs. ▪ Désinsectiser et dératiser 1 fois par an (se renseigner auprès du service d'hygiène sur les produits recommandés et les modalités d'utilisation). 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vérification de la présence des nuisibles (présence d'excréments) pour les rongeurs. ▪ État des protections.

3- GUIDE DE BONNES PRATIQUES PAR OPERATION UNITAIRE

☞ Fiche 11 : Santé du cheptel

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Danger microbiologique</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Les animaux atteints de la tuberculose ou de brucellose par exemple peuvent transmettre ces germes par le biais du lait. <p><u>Danger chimique</u> (résidus dans le lait)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pasteuriser systématiquement le lait avant la transformation ▪ Zoonoses : suivre les recommandations des autorités ▪ Mammites : autant que possible, ne pas traire tout animal présentant des signes de maladie. Ne pas donner à la consommation le lait de tout animal présentant des signes de mammites. ▪ Produits zoo sanitaires : respecter les délais d'attente préconisés par le spécialiste traitant ou sur la notice. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sensibiliser les éleveurs sur les questions de santé animale. tuberculose ou de brucellose ▪ Zoonoses : recommandations à élaborer en relation avec les autorités, les vétérinaires, les projets et structures d'appui présents sur la zone de collecte. ▪ Observer les mamelles pour détecter d'éventuelles mammites et réaliser régulièrement le test au Teepol ▪ Réaliser autant que possible les tests d'antibiotiques dans les centres de collectes ou les laiteries

☞ Fiche 12 : Traite

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Contamination due au manque ou au non-respect des bonnes pratiques d'hygiène pendant la traite. <p><u>Dangers physiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Paille, poils... dans le lait. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Effectuer la traite sur une aire propre ▪ Attacher la queue de la vache. ▪ Nettoyer et désinfecter les mains. ▪ Nettoyer les pis avec un tissu propre. ▪ Ne pas conserver les trois premiers jets (au cas où il n'y a pas de stimulation par le veau) ▪ Nettoyer et désinfecter les ustensiles de traite 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Surveillance visuelle de la propreté du lieu de traite, des pis, des mains et vêtements du trayeur, des ustensiles de traite.

☞ Fiche 13 : Transport

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Contamination par des bactéries provenant de l'environnement ou des matériels de transport. ▪ La température élevée pendant le transport et la durée favorisent la multiplication des germes. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acheminer rapidement le lait au centre de collecte ou à la laiterie (de préférence trois heures au maximum après la traite si le lait n'est pas réfrigéré). ▪ Nettoyer, désinfecter et sécher les récipients de transport et, si possible, les laver et les désinfecter à la laiterie. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ S'assurer que les bidons sont désinfectés à la laiterie. ▪ Contrôle visuel de la propreté des bidons.

☞ Fiche 14 : Pasteurisation

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Risques liés au lait cru contaminé, à l'eau et au lait en poudre contaminés. ▪ Mauvaise maîtrise du couple température-temps. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pasteuriser le lait cru et le lait reconstitué avant transformation dans une bassine au bain-marie (ou dans un pasteurisateur). ▪ Surveiller le couple température-temps de pasteurisation (85°C/20 min) ; pour cela, il faut : désinfecter la tige du thermomètre, homogénéiser le lait, plonger le thermomètre dans le lait, au centre de la marmite, lire la valeur sur le cadran jusqu'à la stabilisation (qui dure entre 1 et 3 minutes), si la température souhaitée est atteinte, mettre le chronomètre en marche jusqu'au temps recommandé. <i>NB : c'est la température du lait qui doit être mesurée et non celle de l'eau.</i> ▪ Sensibiliser les opérateurs sur l'importance du respect du couple température-temps. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ S'assurer du bon fonctionnement des thermomètres et des chronomètres en vérifiant régulièrement l'état des piles et en les comparant avec d'autres appareils. homogénéiser le lait, ▪ S'assurer du bon déroulement de la pasteurisation en vérifiant régulièrement le niveau d'eau du bain-marie, la température du lait et le temps du traitement thermique.

☞ Fiche 15 : Refroidissement après pasteurisation

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporulation possible ou contamination due aux micro-organismes de l'environnement. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Après la pasteurisation, refroidir rapidement le lait (bain-marie d'eau fraîche ou ajout de sachets de glace) jusqu'à 4°C pour le lait pasteurisé ou jusqu'à la température d'ensemencement pour les laits fermentés. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vérifier le niveau d'eau pendant le processus de refroidissement et renouveler l'eau fraîche.

☞ Fiche 16 : Ensemencement- Fermentation

Nature du risque	Moyens de maîtrise	Éléments de surveillance
<p><u>Dangers microbiologiques (et technologiques)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Utilisation de ferment de mauvaise qualité ou de produits de la fabrication précédente qui peut entraîner un défaut de fabrication, l'apport des germes pathogènes, de germes hétéro fermentaires et bactériophages. ▪ Non-respect de la température de fermentation qui favorise la prolifération des germes indésirables. ▪ Dégradation des ferments lyophilisés avec diminution de l'activité fermentaire due aux mauvaises conditions de stockage. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Choisir un bon ferment si on utilise des ferments (liquide ou lyophilisé), les maintenir stockés dans un endroit frais et sec à l'abri de la lumière. ▪ si on utilise un yaourt ou lait caillé du commerce comme ferment, choisir un produit dont la DLC est éloignée, qui a été stocké dans de bonnes conditions. ▪ Respecter les températures idéales d'ensemencement : 31-37°C pour le lait caillé, 40-45°C pour le yaourt à fermentation rapide, 37°C pour le yaourt à fermentation lente. ▪ Autant que possible, utiliser une étuve ou une armoire isotherme pour la fermentation. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Surveiller la température de stockage des ferments. ▪ Contrôle de la DLUO, DLV ou DLC. ▪ Vérifier les différentes températures à l'aide d'un thermomètre ▪ Vérifier la propreté du matériel ▪ Surveillance visuelle et sensorielle (aspect, goût du produit). ▪ Vérifier périodiquement l'acidité Dornic à la fin de la fermentation (une fois par mois et après un accident de fabrication)

Lorsqu'elles sont bien appliquées ces mesures d'hygiène permettent d'obtenir des produits de bonne qualité répondant aux normes établies.

4. NORMES MICROBIOLOGIQUES DES LAITS ET PRODUITS LAITIERS

L'établissement des normes microbiologiques répond à un souci de prévention et de protection de la santé du consommateur et de garantir au produit une meilleure compétitivité sur le marché.

Ces normes servent aussi d'appui au contrôle et à l'analyse microbiologique des aliments. Elles sont également utiles pour l'application des lois et règlements relatifs au contrôle des aliments et lors des transactions commerciales entre pays.

Les normes internes s'avèrent plus rigoureuses et plus sévères que les normes internationales. Elles imposent aux industriels une dure contrainte mais constituent le seul gage d'assurance de la qualité hygiénique et commerciale des produits à exporter.

L'institut Sénégalais de Normalisation (ISN) a pour sa part, «élaboré des normes pour les denrées alimentaires dont les laits et produits laitiers (tableau III).

Tableau III: Critères microbiologiques des laits caillés

Micro-organismes	Nombre de micro-organismes par gramme
Flore totale	$\leq 10^4$
Coliformes	≤ 5
<i>Escherichia coli</i>	Absence
Levures et moisissures	Absence
Bactéries pathogènes	Absence dans 25 g

Source : (44)

Dans un cadre beaucoup plus général, des normes sur les laits fermentés ont été définies.

TABLEAU IV: Critères microbiologiques des laits fermentés (yaourt, kéfir, etc.)

Micro-organismes	Nombre de micro-organismes par gramme
Flore mésophile aérobie totale à 30°C	Non défini
Coliformes totaux (30°C)	≤ 10
Coliformes fécaux (44°C)	≤ 1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence
Salmonelles	Absence dans 25 g
Acidité (en acide lactique)	≤ 2,5

Source : (43)

Il importe aussi de définir au préalable, les critères microbiologiques des matières premières mises en oeuvre et de l'eau servant à la reconstitution.

L'eau est à la base de la préparation des laits caillés. Elle intervient soit dans la reconstitution, soit dans l'entretien du matériel et de ce fait, elle constitue un véhicule pour les germes apportés par le manipulateur et l'air.

Le lait en poudre utilisé pour préparer le lait caillé doit être également analysé et les résultats de ces analyses sont comparés aux critères microbiologiques des laits en poudre (Tableau V).

Tableau V: Critères microbiologiques des laits en poudre

Dénomination de la flore	Seuils de conformité
Flore totale (par g)	≤ 50 000
Coliformes totaux (par g)	≤ 5
Coliformes fécaux (par g)	absence
Salmonelles - Shigella	Absence dans un gramme
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence dans un gramme
<i>Escherichia coli</i> (par g)	Absence dans un gramme
Streptocoques fécaux	Absence dans un gramme
Bactéries anaérobies sulfite-réductrices	10 germes par gramme
<i>Clostridium perfringens</i>	Absence dans un gramme
Spores de clostridium mésophiles gazéfiants	10 germes par gramme
Levures moisissures (par g)	10 germes par gramme
Autres germes pathogènes et toxigènes	Absence dans 100 grammes

Source : (45)

Au terme de cette première partie consacrée aux généralités sur le lait, nous retenons que c'est un produit particulièrement nutritif pour l'Homme, mais aussi pour de nombreux micro-organismes qui prolifèrent rapidement lorsqu'il y a une défaillance hygiénique ou technique. Pour donc avoir un lait de bonne qualité, il faut être vigilant à tous les stades de sa transformation.

Qu'en est-il de la qualité de ce produit au Sénégal ?

C'est pour répondre à cette question que nous nous proposons de mener cette deuxième partie essentiellement expérimentale.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : CADRE D'ETUDE

Des échantillons de lait ont été prélevés dans des unités artisanales de production et de transformation du lait cru et du lait en poudre dans 9 régions du Sénégal : Dakar, Louga, Fatick, Kaolack, Matam, Saint Louis, Kolda, Tambacounda, Thiès. Ils ont été analysés à l'Institut Pasteur de Dakar.

1. Les unités de production

Dans la région de Dakar, les unités de production sont situées en périphérie et représentées par de grandes fermes laitières (Keur Massar, Wayembam, Nialcoulrab, Mbouss). Ces unités se caractérisent par la présence de vaches exotiques spécialisées dans la production laitière, à savoir : Holstein, et Jerseyaises, l'effectif moyen étant compris entre 800 et 1000 vaches pour Wayembam, et beaucoup moins de 500 vaches pour d'autres structures. Certaines de ces unités se chargent de transformer une partie de leur production de lait sur place tandis que d'autres vendent la totalité de leur production aux particuliers ou aux petites unités de transformation. Par contre, pour les autres régions, les unités sont constituées de petits élevages d'une cinquantaine de vache au maximum, de race locale, à statut familial ou individuel, appartenant à des GIE de femmes. Dans ces petites unités, l'étable se trouve dans des concessions familiales, juste à proximité de la salle de collecte et de vente du lait. La traite est manuelle et se fait très tôt le matin ainsi que le soir autour de 19 heures après le retour des vaches du pâturage. Le suivi médical est laissé aux Services de l'Élevage lors des différentes campagnes de vaccination et d'insémination artificielle.

Certaines de ces unités sont soucieuses de la qualité de leur production, proposant des produits sains élaborés dans des conditions d'hygiène satisfaisantes. Mais à côté de ce type d'unité, on retrouve d'autres unités moins exigeantes, ne maîtrisant pas les techniques ou les règles d'hygiène en transformation laitière.

2. Les unités de transformation

Il s'agit en fait des lieux de collecte de lait cru, de reconstitution de lait en poudre et de transformation (pasteurisation...) de ces laits en lait caillé.

Ces unités de transformation appartiennent en grande majorité aux GIE de femmes, qui à travers de nombreuses activités génératrices de revenus, s'impliquent dans la valorisation du lait par la collecte, la pasteurisation et la transformation.

2-1. Approvisionnement en lait cru

Le marché d'approvisionnement est garanti par les éleveurs qui viennent livrer directement le lait. Il faut signaler également que certaines unités possèdent leur propre étable.

Les éleveurs qui fournissent le lait à ces unités se trouvent dans des villages situés à environ 10 à 25 kilomètres de l'unité elle-même, et le transport du lait se fait dans des bidons plastiques de 10 à 50 litres, sur des bicyclettes ou des charrettes.

2-2. Local de transformation

Les dimensions et la taille sont variables en fonction des unités, et sont généralement des locaux construits pour d'autres utilisations et non adaptés pour la transformation de lait.

Ces locaux sont quelques rares fois équipés de matériel de froid (congélateur, réfrigérateur, et chambre froide pour les plus grandes structures). En plus du matériel froid, on retrouve des réchauds à gaz pour pasteuriser le lait, des marmites, des thermomètres, des tamis pour filtrer, des thermocalleuses pour coller les sachets.

3. L'Institut Pasteur de Dakar (IPD)

A l'Institut Pasteur de Dakar, les analyses ont été effectuées dans les laboratoires suivants:

- le Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène de l'Environnement (LSAHE) pour les analyses bactériologiques et moléculaires.
- le Laboratoire de Biologie Médicale pour les antibiogrammes, le sérotypage des salmonelles et *Escherichia coli*, et l'identification de *Staphylococcus aureus*.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. SUR LE TERRAIN

1-1. Echantillonnage

Notre étude a porté sur une analyse bactériologique, et moléculaire.

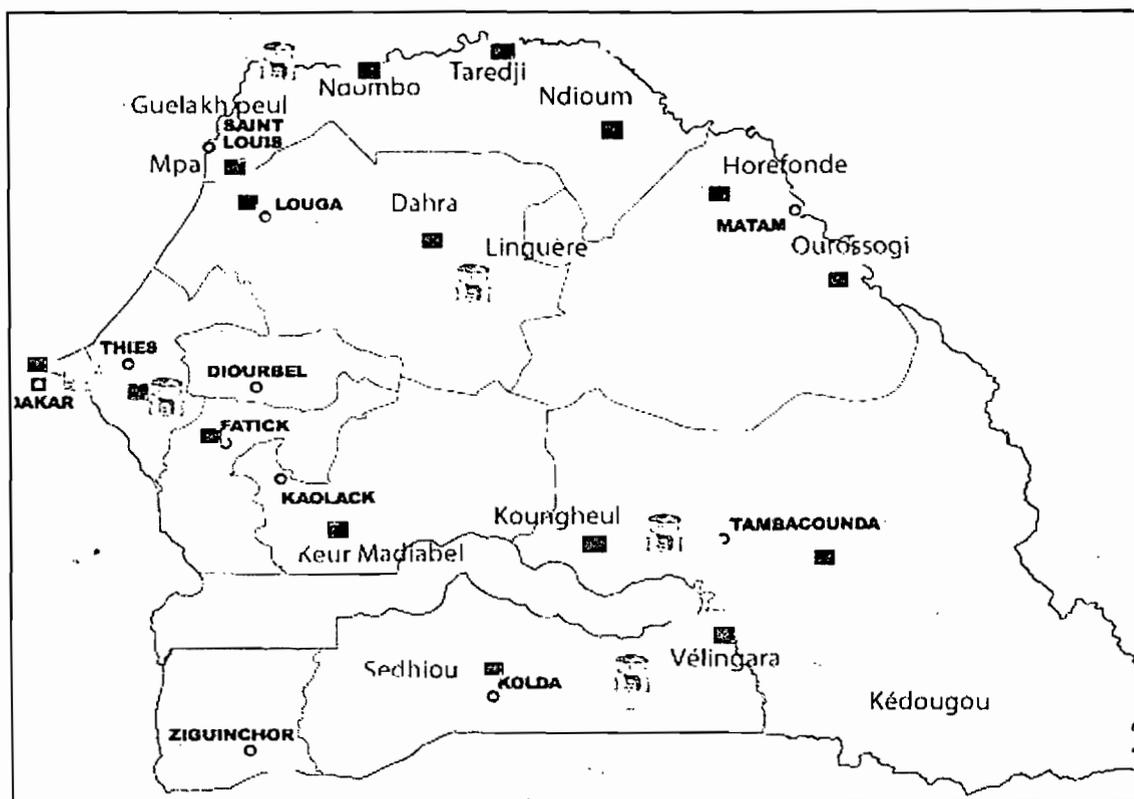
Les prélèvements sont constitués : de lait cru (41 échantillons), lait fermenté (44 échantillons), lait en poudre (6 échantillons), et d'eau (18 échantillons). Ils ont été immédiatement transportés au laboratoire à une température inférieure à 8°C.

La population cible est constituée par l'ensemble des unités de production et de transformation du lait au Sénégal, à l'exception des unités industrielles (Starlait, Jaboot, Daral).

Ces unités ont été recensées au Sénégal par le Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques lors d'une mission préalable.

Au total, nous avons effectué des prélèvements dans 68 unités réparties dans 9 régions du Sénégal (carte n°2) durant la période allant de Novembre 2005 à Février 2006.

Dans chaque unité, pour ce qui est des laits crus, nous avons prélevé des laits de mélange, c'est-à-dire les laits venant de plusieurs vaches et de plusieurs élevages.



■ Localités

NB : Chaque localité est constituée d'un ensemble de Sites de prélèvement
Figure 4 : Principales localités concernées par notre étude

1-2. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués dans des conditions aseptiques.

Au total, nous avons prélevé 85 échantillons de lait dont 41 laits crus, 44 laits caillés et 6 échantillons de lait en poudre. 5 unités à Dakar ont été prélevées 2 fois à 2 mois d'intervalle.

17 échantillons d'eau au niveau des unités de transformation de lait en poudre et de lait cru lorsque la densité du lait était inférieure à 1,026, ont été également prélevés.

Les prélèvements ont été acheminés dans les plus brefs délais dans une glacière munie de carboglaces au laboratoire où ils ont été traités immédiatement. Cette

glacière est également munie d'un thermomètre à sonde qui permet de contrôler la température intérieure au cours du transport. Elle doit être inférieure à +8°C.

Lorsque l'analyse n'a pu être réalisée immédiatement, les prélèvements ont été mis dans un réfrigérateur et traités le lendemain.

Le matériel utilisé pour les opérations de prélèvement est composé de :

- Une glacière dans laquelle sont placés les échantillons.
- Des carboglaces, qui sont des outres congelées servant au transport des échantillons sous régime froid
- Un thermomètre muni d'une sonde permettant de contrôler la température de transport à l'intérieur de la glacière lors du transport
- Des pots stériles de prélèvements de 500ml
- Un lactodensimètre, qui permet de déterminer la densité du lait cru au moment du prélèvement.
- des sachets plastiques stériles pour le prélèvement du lait en poudre.

1-3. Questionnaire

Une enquête a été réalisée chez les producteurs et transformateurs de lait de l'unité prélevée. Pour cela, nous avons utilisé une fiche d'enquête comprenant 3 types de questionnaires :

- un questionnaire transformateur de lait cru.
- un questionnaire transformateur de lait en poudre
- un questionnaire collecteur

Ces questionnaires (voir annexe I) nous ont permis d'avoir au sein de chaque unité, plusieurs informations sur : la nature des installations et équipements, les fréquences de nettoyage et désinfection, les procédés de transformation, et même la nature du conditionnement utilisé.

Le dépouillement de ces questionnaires nous a permis de ressortir 3 groupes de facteurs de risques à savoir :

- Les facteurs de risque liés au manipulateur (Absence de nettoyage des mains, Absence de port des gants,...etc)
- Les facteurs de risque liés au lieu (Locaux utilisés pour d'autres usages, Sol non cimenté, Mur non cimenté,...etc)
- Les facteurs de risque liés au Matériel (Réservoir de mélange en plastique, Absence de matériel de conservation du lait à froid,...etc)

Nous avons par la suite établi une relation entre ces facteurs de risque et la qualité satisfaisante ou non satisfaisante des unités. Ce qui nous a permis après calcul des K_{hi}^2 de déterminer les facteurs de risque à prendre réellement en compte.

2- AU LABORATOIRE

2-1. Appareillage et petit matériel

Il s'agit ici des éléments habituellement utilisés dans les laboratoires de microbiologie alimentaire ainsi que ceux utilisés dans les laboratoires de biologie moléculaire. Pour notre étude, nous avons utilisé :

► Appareillage

- Matériel de stérilisation : (bec bunsen, autoclaves, four Pasteur).
- Matériel d'incubation : étuves de température différentes (30°C, 37°C, 44°C ...).
- Un réfrigérateur.
- Deux hottes (une à flux laminaire vertical et l'autre à flux laminaire horizontal).
- Matériel de pesée : balance de précision.
- Matériel de broyage, d'homogénéisation : « StomacherND »
- Un bain-marie pour la régénération des milieux.
- Un vortex ou agitateur de tubes.
- Une centrifugeuse
- Un thermocycleur et accessoires

► Petit matériel

- tubes,
- Erlenmeyer,
- flacons de 500ml,
- boîtes de pétri, pipettes, étaleurs, béchers, spatules, ciseaux, porte-tubes
- Des tubes à essais.
- Tubes eppendorf de 2ml

2-2. Milieux de cultures et réactifs

► Milieux de cultures et réactifs en Bactériologie

Leurs compositions sont données en annexe 4.

- Eau Peptonée Tamponnée (EPT).

- Phosphate de potassium (KH_2PO_4)
- Tryptone sel
- Gélose pour numération ou Plate Count Agar (PCA)
- Gélose Baird parker
- Gélose Columbia au Sang GCS
- Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre VRBL
- Gélose Blanche
- Plasma de Lapin
- Hektoen
- Gélose nutritive
- Rapid Coli
- Hajna,
- ALOA (Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti)
- Bouillon Preston
- Fraser ½
- CCDA
- Karmali
- Gélose Mueller-Hinton MH
- API 20E
- BCC : Bouillon Cœur-cervelle
- LDC : Lysine-Décarboxylase
- VP : Vosges-proskauer :
- Kit Elisa Brucellose Bovine Lait Bicupule. (Version P04220/03b du 02/03/2005)
- ONPG : Orthonitrophenyl D.galacto-pyranoside.

► Réactifs pour PCR

- Amorces
- dNTP 100mM
- Tampon 10 X
- MgCl₂
- Hot Start Qiagen (5UI/μl)
- Eau qualité biologie moléculaire

► Réactifs pour électrophorèse

- Eau distillée stérile
- Trizma base
- Acide borique
- EDTA

- Tampon TBE 10 X
- Tampon TBE 0,5 X
- Agarose
- Tampon de charge
- Bromure d'éthidium (BET)
- Marqueur de poids moléculaire

► Liste des antibiotiques utilisés

Amoxicilline (AMX)	Pénicilline G (P)
Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC)	Oxacilline (OX)
Ticarcilline (TI)	
Cefalotine (CF)	Kanamycine (K)
Cefoxitine (FOX)	Erythromycine (E)
Cefotaxime (CTX)	Spiramycine (SP)
Ceftazidime (CAZ)	Lincomycine (L)
Gentamicine (GM)	Pristinamycine (PT)
Tobramycine (TM)	Minocycline (MNO)
Amikacine (AN)	Acide fusidique (FA)
Acide nalidixique (NA)	Rifampicine (RA)
Péfloxacine (PEF)	Vancomycine (VA)
Norfloxacin (NOR)	
Ciprofloxacine (CIP)	
Tétracycline (TE)	
Cotrimoxazole (SXT)	
Chloramphenicol (C)	
Fosfomycine (FOS)	
Furanes (FT)	

3. Statistiques

Les données recueillies par questionnaire ont fait l'objet d'une étude des facteurs de risques d'insalubrité d'une part, et d'une analyse descriptive d'autre part. L'analyse descriptive comporte une étude bactériologique et de biologie moléculaire.

L'ensemble de ces études nous a permis de déterminer :

- la fréquence des laits de qualité satisfaisante et non satisfaisante, avec moyennes géométriques des germes.

- la fréquence des laits comportant des germes pathogènes, avec moyennes géométriques des germes.
- la fréquence de chaque pathogène.
- la sensibilité aux antibiotiques des pathogènes trouvés.

Pour cela nous avons utilisé une base de données Access avec analyse sur Epi info.

4. Protocole d'analyses microbiologiques

4-1. Préparation de l'échantillon

→ *Suspension mère*

C'est la solution obtenue après qu'une quantité pesée de l'échantillon à analyser soit mélangée avec une quantité 9 fois égale de diluant et homogénéisée

→ *Dilutions décimales*

Ce sont des solutions obtenues en mélangeant un volume déterminé de la suspension mère avec un volume 9 fois égal de diluant et en répétant l'opération sur chaque dilution ainsi préparée jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

► *Prise d'essai et suspension mère*

Dans un sachet stomacher stérile peser une masse $m \pm 2\%$ représentative de l'échantillon à analyser (25g pour les salmonelles, 25g pour *Campylobacter*, 10g pour *Listeria*) Ajouter une quantité égale à 9 fois la masse d'Eau Peptonée Tamponnée (EPT). Homogénéiser à l'aide du stomacher pendant un temps variable (entre 30 secondes et 1 minute 30 secondes suivant la nature de l'échantillon et le type de germe recherché.

La suspension mère constitue la dilution 10^{-1} .

► *dilutions décimales :*

C'est le tryptone sel qui est utilisé comme diluant pour le lait cru, et le Phosphate de potassium (KH_2PO_4) pour le lait caillé.

Transvaser 1ml de la suspension mère dans un tube contenant 9ml de diluant. A l'aide du vortex homogénéiser la solution. Ainsi la dilution 10^{-2} est obtenue. A partir de cette dilution, renouveler l'opération pour obtenir les dilutions suivantes.

4-2. Dénombrement de la flore totale (NF V 08-051)

4-2-1. Mode opératoire

► Ensemencement et incubation

-Prélever 1 millilitre de la dilution demandée et placer l'inoculum dans la boîte de pétri stérile. Renouveler l'opération avec les dilutions décimales suivantes.

-Ajouter 15 ml de PCA

-Homogénéiser par mouvements rotatifs

-laisser refroidir et après solidification ajouter une couche de gélose blanche

-laisser refroidir puis incuber à 37°C pendant 72 heures \pm 3 heures

► Comptage de colonies :

A l'aide du compteur de colonies, dénombrer les colonies sur 2 dilutions successives : une boîte est comptable si elle contient au minimum 15 colonies et au maximum 300 colonies.

4-2-2 Expression des résultats

$$N = \frac{\sum c}{V (n_1 + 0.1n_2) d}$$

$\sum c$ = Somme des colonies sur les boîtes comptées

V = Volume de l'inoculum appliquée à chaque boîte

n_1 = Nombre de boîtes de la première dilution

n_2 = Nombre de boîtes de la deuxième dilution

d = Dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont effectués

Si une boîte est comptable, alors on a :

$$N = \frac{C}{d}$$

Si $C = 0$, $N < 1/d$

4-3. Dénombrement des staphylocoques (NF V 08-057-1)

4-3-1. Mode opératoire

► Ensemencement et incubation

Transférer 0.1 ml de la suspension mère dans la boîte de pétri contenant le milieu gélosé Baird parker. Renouveler l'opération avec les dilutions décimales suivantes. Procéder à l'étalement de l'inoculum à l'aide d'un étaleur en verre ou en plastique. Incuber à 37°C.

► Comptage des colonies

Compter les colonies caractéristiques puis ré-incuber les boîtes à 37°C.

Après 24h, compter les colonies caractéristiques et non caractéristiques. Les colonies caractéristiques de staphylocoques sont noires, grises, brillantes ou convexes, entourées d'une auréole d'éclaircissement. Les colonies non caractéristiques sont grises dépourvues de zone claire, ou noires et brillantes à zone claire absente ou peu visible.

► Confirmation

➤ *culture en bouillon*

-Prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et l'ensemencer dans 10ml de bouillon cœur cerveau (BCC). Incuber à 37°C pendant 24h

➤ *recherche de la coagulase libre*

-Mettre dans un tube à hémolyse 0.1 ml de la culture en BCC + 0.3 ml de plasma de lapin

-Incuber à 37°C et examiner la coagulation après 24h.

Résultats :

coagulation du plasma de lapin → coagulase +

absence de coagulation → coagulase –

4-3-2. Expression des résultats

Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive identifiés pour chaque boîte retenue :

$$a_1 = \frac{b^c}{A^c} c^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} c^{nc}$$

b^c = Colonies caractéristiques exploitées positives

A^c = Colonies caractéristiques exploitées

c^c = Colonies caractéristiques

b^{nc} = Colonies non caractéristiques exploitées positives

A^{nc} = Colonies non caractéristiques exploitées

c^{nc} = Colonies non caractéristiques

Calcul du nombre de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans la prise d'essai

$N = \frac{\sum a}{V * 1.1d}$

$\sum a$ = Somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les deux boîtes retenues

v= Volume étalé sur chaque boîte

d= taux de dilution correspondant à la première dilution

4-4. Dénombrement de Escherichia coli (NF V 08-050)

4-4-1. Mode opératoire

► **Inoculation et incubation**

- Prélever 1ml de la suspension mère et placer l'inoculum dans la boîte de pétri stérile. Renouveler l'opération avec les dilutions décimales suivantes.
- Ajouter 15ml de Rapid Coli
- homogénéiser par mouvements rotatifs.
- incuber à 44°C après solidification et pendant 24h.

► **Comptage des colonies**

A l'aide du compteur de colonies, dénombrer les colonies violettes sur 2 dilutions successives : 150 au maximum et une boîte contient au moins 15 colonies.

4-4-2. Expression des résultats

$\sum c$ = Somme des colonies sur les boîtes comptées

V = Volume de l'inoculum appliquée à chaque boîte

n_1 = Nombre de boîtes de la première dilution

n_2 = Nombre de boîtes de la deuxième dilution

d = Dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont effectués

Si une boîte est comptable, alors on a :

$$N = \frac{C}{d}$$

Si C = 0, $N < 1/d$

4-5. Coliformes totaux et Coliformes thermotolérants

4-5-1. Mode opératoire

► **Inoculation et incubation**

- Transférer 1ml de la suspension mère dans une boîte de pétri stérile. Renouveler l'opération avec les dilutions suivantes
- ajouter 15ml de VRBL

-Homogénéiser par mouvements rotatifs.

-Après solidification, ajouter une deuxième couche de VRBL

-Incuber les coliformes totaux à 30°C et les coliformes thermotolérants à 44°C et pendant 24h

► Comptage des colonies

A l'aide du compteur de colonies, compter les boîtes sur deux dilutions successives : 150 au maximum et 15 au minimum.

4-5-2. Expression des résultats

$$N = \frac{\sum c}{V (n_1 + 0.1n_2) d}$$

$\sum c$ = Somme des colonies sur les boîtes comptées

V = Volume de l'inoculum appliquée à chaque boîte

n_1 = Nombre de boîtes de la première dilution

n_2 = Nombre de boîtes de la deuxième dilution

d = Dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont effectués

Si une boîte est comptable, alors on a :

$$N = \frac{C}{d}$$

Si C = 0, N < 1/d

4-6. Recherche des salmonelles : (NF V 08-052)

4-6-1. Mode opératoire

► pré-enrichissement

-Incuber la suspension mère à 37°C pendant 18h

► Enrichissement

-Ensemencer à partir du pré-enrichissement un tube de RV (0.1 ml pour 10ml de RV) et un tube de SC (2ml pour 20 ml de SC). Les tubes sont incubés à 37°C pour le SC et 42°C pour le RV.

► Isolement :

-A partir d'un tube de RV, prélever une goutte à l'aide de l'anse Pasteur et procéder à l'isolement par stries sur une boîte de pétri contenant le milieu gélosé Hektoën.

-Faire le même procédé pour le tube de SC.

-Incuber les boîtes à 37°C

► Purification

S'il y'a présence de colonies caractéristiques c'est à dire bleues à centre noir poursuivre, l'identification comme suit :

Prélever une colonie caractéristique et procéder à une purification sur gélose nutritive.

Incuber à 37°C pendant 24h

► Identification par galerie classique :

Après purification sur GN, retenir les boîtes présentant des colonies dépourvues de pigmentation. Prélever une colonie, l'émulsionner dans 0.5ml d'eau physiologique et procéder à l'ensemencement des milieux suivants :

● *Gélose Hajna-kligler* :

-Ensemencer la pente du milieu par une strie et le culot par piqûre profonde. Ne pas fermer les tubes hermétiquement.

-Incuber à 37°C pendant 24h.

Les colonies typiques de salmonelles correspondent à une pente alcaline (rouge) et un culot acide (jaune) avec formation de gaz et formation de sulfure d'hydrogène (gélose noire).

● *Urée-indole*

-Transférer une goutte de la suspension bactérienne dans 0.5 ml de milieu urée-indole. Incuber à 37°C pendant 24h.

- Recherche de l'uréase :

présence d'uréase : milieu rouge violacée

absence d'uréase : milieu inchangé

- Recherche de production d'indole :

Verser 4 à 5 gouttes de réactif de Kovacs dans le tube ensemencé. Une coloration rouge en forme d'anneau à la partie supérieure du milieu indique la présence d'indole.

Les salmonelles sont caractérisées par l'absence d'uréase et d'indole.

- *Lysine-Décarboxylase*

Transférer une goutte de la solution dans un tube contenant le milieu LDC, homogénéiser et incuber à 37°C pendant 24h.

Résultats : coloration violette → LDC+

coloration jaune → LDC-

Les salmonelles sont LDC négative.

- *Voges-proskauer* :

Transférer une goutte de la solution dans 5ml de VP. Incuber à 37°C pendant 24h. Après incubation, ajouter 2 gouttes de la solution de VP1 et 2 gouttes de la solution de VP2 en agitant après avoir ajouté chaque réactif.

Résultat :

Une coloration rose à rouge dans un délai de 15 minutes indique une réaction positive.

- Test ONPG

Continuer l'identification en émulsionnant une colonie de la souche isolée sur GN dans 0.5 ml d'eau physiologique contenue dans un tube à hémolyse. Déposer-y un disque d'ONPG et incuber à 37°C pendant 15 minutes.

Résultat :

Une couleur inchangée indique une réaction négative.

Les salmonelles sont ONPG (-) ; VP (-).

4-6-2. Expression des résultats

Ainsi sur la base de l'ensemble de ces résultats, on conclut que la souche isolée est une salmonelle.

4-7. Recherche de *Listeria monocytogenes* (NF V 08-062)

4-7-1. Mode opératoire

- ▶ Enrichissement primaire.

Incuber la solution mère pendant 24h à 30°C

- ▶ Isolement

Etaler 0,1 ml de cette solution mère sur une boîte de gélose ALOA et incuber 24h à 37°C

- ▶ Comptage des colonies caractéristiques et non caractéristiques.

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* sont des colonies bleues à vert entourées d'un halo opaque.

Réincuber à 37°C pendant 12 à 24h supplémentaires en cas d'absence de colonies typiques ou de halo douteux.

- ▶ Comptage des colonies caractéristiques et non caractéristiques.

Pour ce nouveau comptage :

- en cas d'absence de colonies caractéristiques, on conclut à l'absence de *Listeria monocytogenes*

- en cas de présence de colonies caractéristiques, il faut poursuivre la recherche par un test de différenciation.

- ▶ Test de différenciation : Dans un tube à hémolyse, mettre 0,2 ml d'eau physiologique stérile plus un disque L.MonodiskND. Prélever 3 à 4 colonies typiques et bien isolées, puis ensemercer. Agiter au vortex. Incuber à 37° C au moins 2h à 24h.

4-7-2. Révélation

Ajouter 2 gouttes de diméthylamino benzaldéhyde dans le tube à hémolyse de l'étape précédente.

- une coloration jaune indique la présence de *Listeria spp* et absence de *Listeria Monocytogenes*

- L'absence de coloration ou une coloration légèrement rosée traduit l'absence d'une aminopeptidase et confirme l'appartenance à l'espèce *L.monocytogenes*.

4-8. Recherche de *Campylobacter* (NORME ISO 10272-1)

4-8-1. Mode opératoire

► Enrichissement sélectif

Réalisé dans le bouillon Preston et incubé à 42°C ±1°C pendant 18 heures en atmosphère microaérophile..

► Isolement

- Isoler à l'aide d'une anse bouclée à partir du bouillon Preston, sur les boîtes de gélose Karmali et CCDA.

- Incuber les boîtes à 42°C ±1°C en atmosphère microaérophile.

- Faire la lecture des boîtes après 24h ou plus généralement après 48h et même 3 à 5 jours d'incubation en examinant les colonies sur les boîtes.

Sur gélose Karmali, les colonies caractéristiques sont grises, humides et plates avec une tendance à l'étalement.

Sur gélose CCDA, les colonies sont grises, plates avec tendance à l'étalement d'où une certaine difficulté à les prélever avec l'anse de platine ou la pipette Pasteur.

► Identification

Elle est réalisée sur un total de 5 colonies typiques et/ou suspectes sur l'ensemble des boîtesensemencées, s'il y en a moins de 5, retenir toutes les colonies.

Comme les germes ne survivent qu'en atmosphère microaérophile, les tests de confirmation suivants doivent être réalisés sans délai.

Etude de la morphologie et de la mobilité des cultures

- Faire une petite suspension à partir de chacune des 5 colonies dans 1 ml de bouillon Brucella et faire un état frais et une coloration de Gram.

Retenir, pour les observations ultérieures, toutes les suspensions dans lesquelles on observe des bacilles incurvés Gram négatif, dont le mouvement de déplacement en vrille est caractéristique.

- Faire à partir des suspensions en bouillon Brucella, un isolement sur gélose Columbia, incubé les boîtesensemencées à 42°C en atmosphère microaérophile pendant 24 h et utiliser les cultures pures pour les essais biochimiques.

- A partir des cultures obtenues sur gélose Columbia, ensemencer un bouillon Brucella que l'on incube à 25°C en atmosphère microaéroophile pendant 2 à 5 jours. Examiner s'il y a croissance ou pas.

Essais biochimiques

Recherche de l'oxydase

Recherche de la catalase : Attention à partir d'un milieu contenant du sang, la catalase peut être faussement positive.

● Culture en gélose Hajna kligler

Les Campylobacter sont glucose négatif, lactose négatif, ne produisent pas de gaz et de sulfure d'hydrogène, sauf chez *C. coli* où il y a une faible production de (H₂S) dans l'eau de condensation au bout de 5 jours.

Recherche de la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céphalotine

- Ensemencer à l'aide d'une anse bouclée les colonies isolées sur gélose Columbia dans une suspension de densité 0,5 sur l'échelle de Mac Farland dans un bouillon Brucella.
- Diluer cette suspension au 1/10ème dans le même bouillon
- Inonder la surface d'une boîte de gélose Mueller Hinton à 5% de sang avec la suspension.
- Laisser en contact 5 mn, puis rejeter l'excès de suspension.
- Sécher les boîtes à l'étuve 37°C pendant 10 mn.
- Placer à la surface de la gélose un disque d'acide nalidixique et un disque de céphalotine.
- Incuber à 37°C en atmosphère microaéroophile pendant 24h.
- Interpréter la croissance bactérienne comme suit :
 - Une bactérie qui croît au contact du disque est classée comme résistante.
 - La présence d'une zone d'inhibition de la croissance indique une bactérie sensible.

Recherche de l'hydrolyse de l'hippurate

Dans un tube à hémolyse contenant 0,4 ml de solution d'hippurate de sodium, ensemencer à l'aide d'une anse bouclée, les colonies isolées sur gélose Columbia au

sang, en prenant soin de ne pas incorporer de la gélose. Agiter pour homogénéiser et incubé 2 h dans un bain d'eau réglé à 37°C.

Ajouter avec précaution 0,2 ml de la solution de ninhydrine au dessus de la solution d'hippurate de sodium, ne pas agiter.

Interpréter après une nouvelle incubation de 10 mn dans un bain d'eau réglé à 37°C. Une couleur violet foncé indique une réaction positive et une couleur violet pâle ou l'absence de changement de couleur, indique une réaction négative.

Interprétation des résultats

Les Campylobacter thermotolérants donnent les réactions suivantes : ce sont des petits bacilles Gram négatif, incurvés, mobiles, oxydase positif, glucose, lactose, saccharose, et gaz négatifs.

Conclure à la présence de Campylobacter spp si une colonie au moins présente ces caractéristiques.

Parmi les Campylobacter spp présentant une croissance à 42°C, certaines espèces constituent le groupe des thermotolérants tels que *C.jejuni*, *C.coli* et moins fréquemment isolés, *C.lari* et *C.upsaliensis*. Les caractéristiques données dans le tableau VI permettent de les différencier.

Tableau VI : Caractéristiques des Campylobacter thermotolérants

Caractéristiques	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>
Croissance à 25°C	-	-	-	-
H ₂ S (TSI) ¹	-	(+)	-	-
Acide nalidixique	S	S	S	S
Céphalotine	R	R	R	S
Hydrolyse de l'hippurate	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	- ou faible
Légende : + : positif ; - : négatif ; (+) : faiblement positif ; S : sensible ; R : résistant				
1 : faible développement d'H ₂ S dans l'eau de condensation au bout de 5 jours.				

4-8-2. Expression des résultats

Indiquer la présence ou l'absence de *Campylobacter thermotolérant* dans une prise d'essai de 25g.

4-9. Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés selon les Recommandations du CA-SFM (2004) et la lecture sur le logiciel l'OSIRIS.

4-9-1. Méthode en diffusion pour les Enterobacteriaceae (E. coli et salmonelles)

- A partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieu gélosé non sélectif, préparer une suspension en solution saline (NaCl 0,9%) équivalente au standard Mac Farland 0,5 ($\approx 10^8$ UFC/mL),
- Diluer cette suspension au 1/100^{ème} ($\approx 10^6$ UFC/mL),
- Inonder deux boîtes de pétri (boîte carré de 140 et boîte de 90) gélose Mueller Hinton, enlever l'excès.
- Disposer les disques imprégnés d'antibiotique sur ces deux boîtes de gélose.
- Incuber à 37°C durant 18 à 24 heures,
- Mesurer les diamètres d'inhibition, en déduire la sensibilité de la souche à l'antibiotique testé en fonction des critères du CA-SFM.

4-9-2. Méthode en diffusion pour les staphylocoques

A partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieu gélosé non sélectif, préparer une suspension en solution saline (NaCl 0,9%) équivalente au standard Mac Farland 0,5 ($\approx 10^8$ UFC/mL) (solution 1)

- Diluer cette suspension au 1/100^{ème} ($\approx 10^6$ UFC/mL), (solution 2)
- Inonder une boîte Mueller Hinton (boîte de 90) avec la solution 1
- Inonder deux boîtes Mueller Hinton (boîte de 90 et boîte carrée) avec la solution 2
- Disposer les disques d'antibiotique sur les boîtes.

NB : sur la boîte de pétri contenant la solution 1, placer uniquement le disque « Oxaciline » et Incuber à 30°C durant 18 à 24 heures en microaérobiose,
-Incuber les autres boîtes à 37°C durant 18 à 24 heures en microaérobiose,
- Mesurer les diamètres d'inhibition, en déduire la sensibilité de la souche à l'antibiotique testé en fonction des critères du CA-SFM.

5. AUTRES PROTOCOLES D'ANALYSE

5-1. Détection des Anticorps anti-*Brucella abortus* par ELISA

Le dépistage de la brucellose se fait principalement par des épreuves sérologiques, parmi lesquelles le ring- test a été la plus utilisée dans les élevages laitiers. La méthode ELISA qui associe réaction immunologique et enzymatique est l'application la plus récente. Cette technique permet l'analyse des laits et se prête particulièrement bien à l'automatisation. Elle offre une très bonne sensibilité et le plus souvent une meilleure spécificité que la méthode de l'anneau (Ring-test).

☞ Description et principe

Le LPS de *Brucella abortus* est fixé sur les parois des puits des microplaques en polystyrène, (Seuls les puits de colonnes paires sont sensibilisés avec le LPS.) Les laits à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits. S'il existe des anticorps spécifiques de *Brucella* dans le lait, il se forme des complexes LPS-anticorps par lesquels les anticorps bovins se trouvent fixés sur les parois des puits. Après lavage, une immunoglobuline anti-anticorps de bovins couplée à une enzyme est mise à incuber. Ce conjugué se fixe sur l'immun complexe. Après lavage, le substrat de l'enzyme Tétraméthyl-benzidine (TMB) est mis en présence de l'enzyme qui assure sa transformation en un composé bleu devenant jaune après blocage. L'intensité de la coloration est une mesure du taux d'anticorps dans le lait à tester.

☞ **Mode opératoire et critères de validation**

(cf. annexe 3)

5-2. PCR

5-2-1. Détection de *Coxiella burnetii*

☞ **Description et principe du test**

Ce test utilise des amorces et une sonde Taq Man marqué FAM (quencher non fluorescent) spécifiques de *Coxiella burnetii*. L'extraction de l'ADN se fait au moyen de réactifs mis au point et commercialisés par la société QIAGEN. Un ADN témoin synthétique appelé « contrôle interne » est présent dans chaque réaction.

En effet c'est une PCR quantitative qui utilise une sonde spécifique oligonucléotidique marquée par deux fluorophores (FAM, VIC) dont l'un est masqué par l'autre dit « Reporter ».

Par ailleurs, l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq Polymérase lors de son passage, permettra la dégradation de cette sonde accompagnée d'une augmentation de la fluorescence du Reporter, qui sera mesurée au cours de chaque cycle PCR.

L'évolution de notre amplification peut alors être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une Sigmoidale et divisée en 2 phases (une phase exponentielle et une phase de plateau).

Par la suite, on définit un seuil (threshold) correspondant à un niveau de fluorescence suffisant pour que les courbes soient en phase exponentielle, et suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond.

Nous obtenons alors les courbes correspondantes aux amplifications de chaque échantillon de lait, ceci à partir de l'appareil ABI PRISM® 7000 SDS.

☞ **Extraction d'ADN et PCR temps réel avec le kit Adiavet®COX (ADIAGENE)**

▶ **Test performance**

Ce test a été évalué sur 20 espèces et souches de bactéries. La spécificité est de 100 %. Le seuil de détection a été évalué à 25 à 100 bactéries par ml de lait bovin.

▶ **Extraction de l'ADN**

L'extraction utilise le kit QIAamp. DNA mini kit.

Pour réaliser cette extraction, nous avons Prélever 400 μ l de lait avec une micropipette P100 et placer dans un microtube Eppendorf préalablement identifié. Ensuite, nous avons ajouter 200 μ l de tampon ATL et 20 μ l de protéinase K QIAGEN, incubé 30 min à 70°C après avoir vortexer. Puis, ajouter 200 μ l de tampon AL, vortexer puis incubé 10 mn à 70°C.

Ensuite, nous avons ajouté 200 μ l d'éthanol absolu, vortexer fortement et introduit la solution dans la mini colonne (attention de bien introduire le précipité blanc qui a pu se former à l'étape précédente).

Après une nouvelle centrifugation de 10 000 g pendant une minute, nous avons placé la colonne sur un nouveau tube « collection » (fourni dans le kit). Si tout le liquide n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger l'ensemble à 10000 g durant 1 minute. Ajouter 500 μ l de tampon AW 1 puis centrifuger 1 min à 10 000 g.

Placer chaque colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter celui contenant l'éluât. Ajouter 500 μ l de tampon e lavage AW2, centrifuger 3 min à 10 000 g. jeter le tube collecteur contenant l'éluât.

Par la suite, placer la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml propre, déposer 200 μ l de tampon AE. Incuber 1 min à température ambiante et centrifuger 1 min à 10 000 g. jeter la colonne et conserver l'extrait d'ADN.

L'ADN est stocker l'ADN à -20° C.

► Préparation du kit

Après avoir déterminé le nombre de tubes PCR nécessaires, nous avons prévu n tubes pour n échantillons et un tube supplémentaire pour le témoin négatif.

Enfin, répartir 20 μ l de mélange A5 dans chacun des tubes PCR. Pour chaque essai, ajouter 2 μ l d'échantillon dans le tube contrôle négatif sur l'ABI PRISM® 7000.

☞ Amplification

Dès que tous les tubes ont été préparés, nous avons réalisé l'amplification par PCR Temps réel. La cible Coxiella est lue en FAM et le contrôle interne en VIC. L'amplification et la lecture se fait sur ABI PRISM® 7000 SDS

1er cycle : 50°C pendant 2 minutes ; 95°C pendant 10 minutes
43 cycles : 95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute

☞ Lecture et interpretation

Le terme « **bruit de fond** » qualifie la partie non caractéristique des courbes observées pendant les 10 à 15 premiers cycles.

Le terme « **amplification** » qualifie la présence d'une courbe avec une partie linéaire croissante suivie d'un plateau. Toute courbe ne présentant pas cet aspect sera considérée comme une absence d'amplification, comme par exemple une courbe aplatie ou en dents de scie.

Le **seuil ou threshold** doit être placé au-dessus du bruit de fond, de préférence au milieu de la partie linéaire commune à l'ensemble des courbes d'amplification

De la position du seuil ou threshold dépend la valeur de Ct exprimé par l'appareil pour chaque puits.

Cependant, ne seront considérés comme positifs en FAM ou VIC que les échantillons dont le Ct est inférieur à 40 et dont la courbe présente une amplification caractéristique.

Le test est considéré comme valide si une amplification est observée en VIC sans qu'il y ait d'amplification en FAM (exemple C).

L'échantillon est considéré comme négatif si une amplification est observée en VIC sans qu'il y ait d'amplification en FAM (exemple C).

Afficher ensuite l'ensemble des courbes de la plaque en FAM en mode exponentiel et procéder de la même façon pour la position du threshold. L'échantillon est considéré positif si une amplification est observée en FAM (exemple A). le contrôle interne peut être co-amplifié en VIC (exemple B).

Un échantillon est considéré inhibé si aucune amplification n'apparaît ni en FAM ni en VIC (exemple D).

Exemple	A	B	C	D
Amplification VIC	non	oui	oui	non
Amplification FAM	oui	oui	non	non
Echantillon considéré	Positif	Positif	Négatif	Non déterminé A refaire

5-2-2. Recherche de Mycobactéries du complexe tuberculosis

☞ Description et principe

Le but de cette procédure est d'expliciter les différentes étapes de la détection par amplification génique (« touch down »-PCR) de la séquence d'insertion IS6110 présente chez les mycobactéries du complexe tuberculosis (*M. bovis*, *M. tuberculosis*).

Les amorces utilisées sont spécifiques d'un élément génétique mobile, la séquence d'insertion IS6110. De nombreux travaux ont montré qu'habituellement, plus de 5 copies de IS6110 sont présentes dans le génome de *M. tuberculosis* et moins de 5 copies dans celui de *M. bovis*.

Cette spécificité des amorces a été validée par de nombreuses études, de même que la sensibilité, et a été estimée entre 0 à 10 mycobactéries par ml (52).

☞ Extraction d'ADN

► Lyse des bactéries

La lyse des bactéries a consisté dans un premier temps à incuber 850 μ l de lait avec 8,5 μ l de PK (10mg /ml) et 85 μ l de SDS 10 % dans un tube Eppendorf de 2 ml pendant 40 minutes à 65°C. Ensuite, Porter le tube Eppendorf de 2 ml à ébullition 10 minutes après l'avoir percé pour éviter que le tube ne s'ouvre. Transvaser dans des tubes de 2ml.

► Extraction proprement dite

Pour l'extraction, nous avons ajouté 952 μ l du mélange Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24 :24 :1), et vortexer. Après centrifugation à 15 000g pendant 15 min à la température de +4°C, nous avons récupéré le surnageant pour le transférer dans un nouveau tube Eppendorf de 2ml.

Ensuite nous avons ajouté 900 μ l du mélange Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24 :24 :1), vortexer pendant 15 sec et centrifuger à 15 000g pendant 15 min à +4°C. Une fois centrifugé le surnageant a été récupéré dans un tube Eppendorf de 1.5 ml dans lequel nous avons encore ajouté 700 μ l du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1 vol/vol). Ce mélange a été vortexer et centrifuger à 15 000g pendant 15 min à +4°C.

Nous avons récupéré la phase aqueuse dans un tube Eppendorf de 2 ml et Ajouter 85 μ l de Na Cl 5 M.

la précipitation de l'ADN à été effectuée par de l'éthanol absolu réfrigéré (mélanger délicatement par retournement jusqu'à l'apparition d'une pelote d'ADN).

Pour finir de précipiter l'ADN nous avons mis les tubes à -20°C au minimum une nuit avant de continuer la manipulation (ils peuvent attendre plusieurs jours à ce stade).

Le lendemain, avant de passer à la PCR, nous avons centrifuger les extraits à $15\ 000\text{g}$ pendant 15 min à $+4^{\circ}\text{C}$ éliminer le surnageant sur le côté du tube opposé au culot et laver le culot avec $800\mu\text{l}$ d'éthanol 70%. Une nouvelle centrifugation à $15\ 000\text{g}$ pendant 15 min à $+4^{\circ}\text{C}$ a été effectuée.

Enfin nous avons retirer l'éthanol à 70% et laisser sécher environ 30 min à température ambiante ou à l'étuve.

► Dilution des ADN pour la PCR.

Pour la PCR nous avons repris le culot dans $100\ \mu\text{l}$ d'eau distillée stérile et laisser dissoudre au moins 30 min à l'étuve à 37°C et diluer cette solution au 1/40 avec de l'eau distillée : $1500\ \mu\text{l}$ d'eau + $100\ \mu\text{l}$ d'ADN pur.

Enfin, la dilution au 1/40 à été utilisée pour réaliser les PCR.

► Conservation des ADN

Les ADN sont conservés à -80°C dans des boîtes identifiées et numérotées.

☞ Amplification proprement dite

Dans le(s) tube(s) PCR contenant le "MIX PCR" (à l'exception des témoins négatifs et positifs), ajouter $2\ \mu\text{L}$ d'ADN pur à tester. Pour le témoin d'inhibition, nous avons ajouté $2\ \mu\text{l}$ d'ADN de *M. tuberculosis* dilué à 10^{-4} et $2\ \mu\text{L}$ d'ADN pur à tester. Pour le témoin négatif, l'ADN à été remplacé par de l'eau distillée stérile.

Pour le témoin positif, ajouter l'ADN de la souche de référence de *M. tuberculosis* dilué à 10^{-1} .

Enfin nous avons sélectionné le programme d'amplification adéquat ((Tableau VIII) dans le thermocycleur.

Les amorces utilisées pour amplifier la séquence cible IS6110 des Mycobactéries du complexe tuberculosis sont indiquées dans le tableau VII.

☞ Amorces

Tableau VII : Amorces utilisées pour amplification des Mycobactéries du complexe tuberculosis par PCR

PCR	Séquence nucléotidique cible	Nom amorce	Séquence (5'-3')	taille amorce
IS 6110	<i>IS 6110</i>	INS1	CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	20n
		INS2	GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA	20n

Tableau VIII : Programme d'amplification PCR pour la Détection des Mycobactéries du complexe tuberculosis

Nbre de cycles	Température °C	Durée
1	96	3 mn
2	94	1 mn
	*	1 mn
	72	1 mn
25	94	1 mn
	63	1 mn
	72	1 mn
1	72	8 mn

* Diminution de 2°C tous les 2 cycles (72°C à 64°C)

Ce programme traduit :

- une Dénaturation initiale à 96°C pendant 3 mn
 - 2 cycles comprenant une dénaturation à 94°C, avec diminution de 2°C tous les 2 cycles.
 - 25 cycles avec Dénaturation à 94°C, Hybridation à 63°C, élongation finale à 72°C
- Lorsque le programme est terminé, les amplifiats peuvent être testés immédiatement ou conservés à 4°C pendant 24 heures avant l'électrophorèse permettant la séparation et la révélation des fragments amplifiés.

☞ **Séparation et révélation des produits d'amplification**

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en champ continu. La concentration du gel d'agarose est de 1.5%. Les modalités pour la préparation du gel et la révélation sont présentées en annexes 2

☞ **Interprétation des résultats et contrôle de qualité**

Le témoin négatif (tube sans ADN) ne doit montrer aucune amplification.

Le témoin positif doit présenter une bande de taille égale à 245 pb.

Le témoin d'inhibition doit présenter une bande de taille égale à 245 pb.

Les laits dont les amplifiats présentent une bande de taille identique à celle du témoin seront considérés positifs pour la recherche d'ADN de mycobactéries du complexe tuberculosis.

Les laits présentant une absence d'amplification ou l'amplification d'un fragment de taille différente à celle du témoin seront considérés négatifs.

Les laits dont le témoin d'inhibition présente une absence d'amplification ou l'amplification d'un fragment de taille différente à celle du témoin seront considérés ininterprétables.

CHAPITRE III : RESULTATS – DISCUSSION

1- RESULTATS

1-1. Résultats de l'enquête

Ils constituent un résumé des renseignements fournis par les producteurs et les transformateurs d'une part, et nos propres observations d'autre part.

Au total, sur les 68 unités de production et de transformation ainsi visitées, les renseignements ont été analysés en fonction de la qualité de chaque prélèvement afin d'en dégager les facteurs de risque d'insalubrité.

Une unité a été considérée de qualité non satisfaisante si au moins un échantillon de lait (cru, caillé, en poudre) ou d'eau a été déclaré de qualité microbiologique non satisfaisante selon les normes citées au dessus du Tableau IX.

61 unités ont présenté des résultats non satisfaisants et 7 unités ont présenté des résultats satisfaisants (Figure 5). Ces 7 unités sont réparties comme suit :

- 1 unité à Dakar
- 1 unité dans la région de Saint Louis
- 2 unités dans la région de Matam
- 3 unités dans la région de Kolda

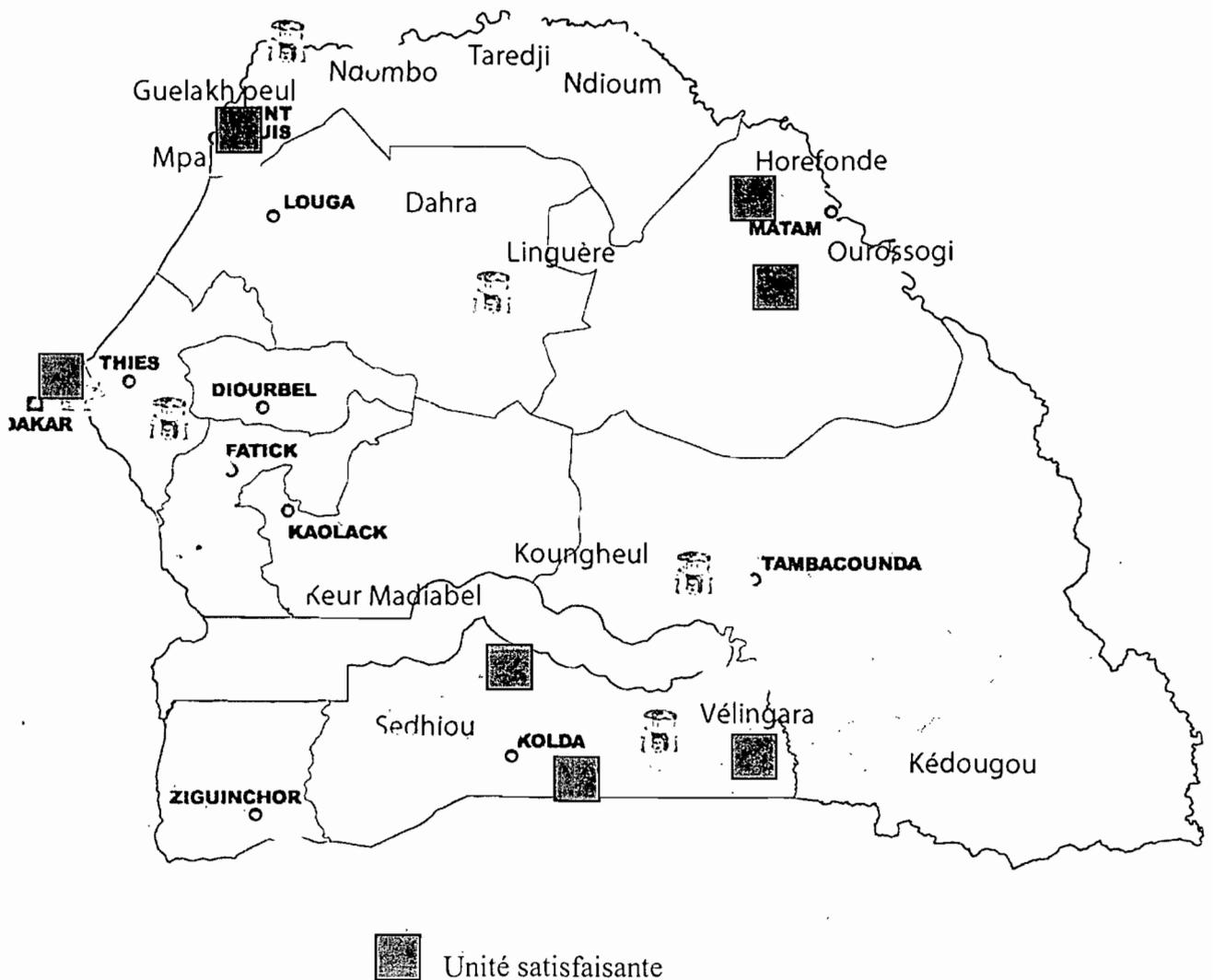


Figure 5 : Répartition des unités satisfaisantes au Sénégal

Les unités satisfaisantes sont réparties dans presque toutes les régions du Sénégal. Il n'y a donc pas d'influence du lieu sur la qualité microbiologique du lait.

Tableau IX : Facteurs de risque de qualité non satisfaisante des échantillons selon : - La Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 pour les laits crus de consommation de mise sur le marché

	Fréquence selon la qualité microbiologique		
	Satisfaisante (n=7)	Non satisfaisante (n=61)	P (<0.05)
Facteurs de risque liés au manipulateur			
Absence de nettoyage des mains	1 (14.3%)	1 (1.6%)	NS
Absence de port des gants	6 (85.7%)	53 (86.9%)	NS
Absence de changement de gants	6 (85.7%)	54 (88.5%)	NS
Absence de port de masque	6 (85.7%)	59 (96.7%)	NS
Absence de port de coiffe	5 (71.4%)	58 (95.1%)	NS
Port de bague (s)	6 (85.7%)	36 (59.0%)	NS
Tenue de travail sale	1 (14.3%)	5 (8.2%)	NS
Absence de formation à l'hygiène	3 (42.8%)	23 (37.7%)	NS
Total	34/ 56 (60,7%)	289/488 (59,2%)	NS
Facteurs de risque liés au lieu			
Locaux utilisés pour d'autres usages	3 (42.8%)	46(74.4%)	NS
Sol non cimenté	0 (0%)	8 (13.1%)	NS
Mur non cimenté	1 (14.3%)	14 (22.9%)	NS
Eau non désinfectée	2 (28.6%)	22 (36%)	NS
Absence de nettoyage des murs	5 (71.4%)	25 (41%)	NS
Alentours de l'unité sale	2 (28.6%)	14 (22.9%)	NS
Total	13/42 (31%)	129/366 (35,2%)	NS
Facteurs de risque liés au Matériel			
Réservoir de mélange en plastique	2 (28.6%)	50 (82%)	0.008

Absence de matériel de conservation du lait à froid	1 (14.3%)	33 (54%)	NS
Absence de nettoyage du matériel	0 (0%)	19 (31%)	NS
Total	3/21 (14%)	102/183 (55,7%)	0.00099

NS= Non significatif

N= Significatif

P= Précision

Comme l'indique ce tableau, nous avons obtenu 7 unités satisfaisantes et 61 unités non satisfaisantes. Les facteurs de risque qui ressortent de ce tableau, après le calcul des χ^2 sur Epi info, sont les facteurs de risque liés au matériel avec l'utilisation d'un réservoir en plastique.

L'analyse comparant la totalité des laits de qualité satisfaisante et de qualité non satisfaisante pour des paramètres liés au matériel donnent un χ^2 de 10.85 (intervalle de confiance à 95%) et un p de 0,00099, ce qui est significatif. L'analyse de chacun des paramètres pris isolément ne fait apparaître que la nature du contenant comme un facteur de risque avec $p=0,008$. Tous les autres paramètres sont non significatifs.

1-2. Résultats des analyses bactériologiques

1-2-1. Qualité des échantillons

☞ Lait cru

Tableau X : Qualité microbiologique des 41 échantillons de laits crus selon la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 30 mars 1994)

	Critères microbiologiques lait matière première	Nombre de laits de qualité satisfaisante par critère	Critères microbiologiques laits de consommation de mise sur le marché	Nombre de laits de qualité satisfaisante par critère
Cellules somatiques (par ml)	$\leq 4.10^5$	Non réalisé	-	-
Flore mésophile totale à 30°C (par ml)	$\leq 10^6$	14	$\leq 5 \cdot 10^4$ *	7
Coliformes à 30°C	-	-	m=100 M=1000	8
Streptocoques hémolytiques (pour 0.1 ml)	-	-	absence	41
<i>Staphylococcus</i> coagulase positive (par ml)	m=500 M=2000	36	m=100 M=500	32
Salmonelles (pour 25 g)	-	-	absence	40
<i>Listeria monocytogenes</i> (pour 25 g)	-	-	absence	41
Nombre et pourcentage de laits satisfaisants aux critères	-	13 (31.7%)	-	4 (9.8%)

* Moyenne géométrique constatée sur une période de 2 mois avec deux prélèvements par mois.

Comme le montre ce tableau, un seul échantillon de lait cru contenait les Salmonelles.

Tableau XI : Qualité microbiologique des 41 échantillons de lait crus selon Règlement CE 853-2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004

	Critères microbiologiques lait matière première	Nombre et pourcentage de laits satisfaisants aux critères
Cellules somatiques (par ml)	$\leq 4.10^5$ *	Non réalisé
Flore mésophile totale à 30°C (par ml)	$\leq 10^5$ **	7 (17.1)

* Moyenne géométrique variable constatée sur une période de deux mois, avec au moins deux prélèvements par mois.

** Moyenne géométrique variable constatée sur une période de trois mois, avec au moins un prélèvement par mois, sauf si l'autorité compétente définit une autre méthodologie pour tenir compte des variations saisonnières des niveaux de production.

Seul 17.1% des laits était de qualité satisfaisante. La recherche de cellules somatiques et la répétition des prélèvements telle que définie par la norme n'ont pas été réalisées.

☞ **Lait caillé**

Tableau N°XII. Qualité microbiologique des 44 échantillons de lait caillé selon la Norme Sénégalaise NS 03-002

	Critères microbiologiques	Nombre et pourcentage de laits satisfaisants par critères
Coliformes à 30°C	≤10 bactéries par g	11 (25%)
Coliformes Fécaux	Absence par g	36 (81.8%)
Staphylocoques à coagulase positive	Absence par g	36(81.8%)
Salmonelles*	Absence dans 25 g	44 (100%)
<i>Escherichia coli</i>	Absence par g	12 (27.3%)
Streptocoques fécaux	Absence par g	Non réalisé
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 25 g	44(100%)
<i>Campylobacter</i>	Absence dans 25 g	44 (100%)
Nombre et pourcentage de laits satisfaisants aux critères		8 (18.2%)

On note dans ce tableau une absence totale de germes comme *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter*. Les Streptocoques fécaux n'ont pas été recherchés.

Tableau N°XIII. Qualité microbiologique des 44 échantillons de lait caillé selon la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 21 décembre 1979)

	Critères microbiologiques	Nombre et pourcentage de laits satisfaisants par critères
Coliformes à 30°C (par g)	≤10	11 (25%)
Coliformes Fécaux (par g)	≤1	36 (81.8%)
Salmonelles (pour 25 g)	0	44 (100%)
Nombre et pourcentage de laits satisfaisants aux critères		8 (18.2%)

Les pourcentages de laits satisfaisants sont identiques (18.2%) pour les 2 critères ci-dessus cités.

☞ Lait en poudre

Tableau XIV : Qualité microbiologique des échantillons de lait en poudre selon la Norme Sénégalaise NS 03-001

Germes	Critères microbiologiques	Nombre et pourcentage de laits satisfaisants par critères
Flore total 30°C (par g)	≤50 000	-
Coliformes à 30°C (par g)	≤5	6 (100%)
Staphylocoques à coagulase positive (par g)	absence	6 (100%)
Salmonelles (pour 25 g)	absence	6 (100%)
<i>Escherichia coli</i> (par g)	absence	6 (100%)
Bactéries anaérobies sulfito-réductrices	≤10	3 (50%)
Coliformes fécaux (par gr)	absence	Non réalisé
Shigella (pour 25 g)	absence	Non réalisé
Levures moisissures (par g)	≤10	Non réalisé
Nombre et pourcentage de laits satisfaisants aux critères		3 (50%)

Nous obtenons 50% de lait en poudre impropre à la consommation.

Les Coliformes fécaux, Shigella, les levures et moisissures n'ont pas été recherchés.

Tableau XV : Qualité microbiologique des échantillons de lait caillés selon la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 21 décembre 1979)

Germes	Critères microbiologiques	Nombre et pourcentage de laits satisfaisants par critères
Coliformes à 30°C (par g)	m=0 M=10	6 (100%)
Staphylocoques à coagulase positive (par g)	m=10 M=100	6 (100%)
Salmonelles (pour 25 g)	absence	6 (100%)
Nombre et pourcentage de laits satisfaisants aux critères		6 (100%)

Par rapport à la Norme Sénégalaise NS 03-001, ici nous obtenons 100% de laits satisfaisants. Cette norme est donc plus rigoureuse que la norme DGAL 2001 en matière de qualité du lait en poudre.

☞ Eaux

Tableau XVI : qualité microbiologique des 18 échantillons d'eaux du réseau de distribution selon le Décret n°89-3 du 3 janvier 1989 (Journal officiel de la République Française).

Germes	Critères microbiologiques	Nombre et pourcentage d'eau satisfaisants par critère
Flore totale à 22°C	≤100/ml	6 (33.33%)
Flore totale à 37°C	≤10/ml	4 (22.22%)
Coliformes à 30°C	0/100ml	Non réalisé
Coliformes thermotolérants	0/100ml	8 (44.44%)
Enterocoques (Streptocoques fécaux)	0/100/ml	11(61.11%)
Spores d'ASR	≤ 1/20ml	8 (44.44%)
Nombre et pourcentage d'eaux satisfaisants aux critères		6 (33%)

Comme le montre ce tableau, nous avons obtenu 33% d'échantillons satisfaisants. Les Coliformes à 30°C n'ont pas été recherchés.

1-2-2. Fréquence et numération des germes

☞ Lait cru

Tableau XVII : Fréquence des germes obtenus dans 41 échantillons de lait cru prélevés au Sénégal

	Nombre d'échantillons positifs	% d'échantillons positifs	Nombre de colonies par g		
			moyenne	médiane	Valeur maximale
Flore mésophile totale à 30°C	41	100	2,4.10 ⁸	1,8.10 ⁶	4,1.10 ⁹
Streptocoques Hémolytiques	0	0	0	0	0
Staphylocoques	16	39,0	495	115	3000
Salmonelles	1	2,4	1	1	1
<i>Escherichia coli</i>	35	85,4	1,1.10 ⁶	220	3,8.10 ⁷
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter</i>	0	0	0	0	0

Tous les échantillons (100%) contenaient la Flore mésophile totale à 30°C, un seul échantillon contenait des salmonelles

☞ Lait caillé

Tableau XVIII: Fréquence des germes obtenus dans 44 échantillons de lait caillé

Germes	Nombre d'échantillons positifs	% d'échantillons positifs	Nombre de colonies par ml		
			moyenne	médiane	Valeur maximale
Coliformes à 30°C	37	84	3,8.10 ⁶	5.10 ⁴	6,6.10 ⁷
Coliformes Fécaux	36	81,8	1,7.10 ⁶	13500	5,3.10 ⁸
Staphylocoques	8	18,2	86872	12850	470000
Salmonelles	0	0	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	32	72,7	4,3.10 ⁶	3550	1,1.10 ⁸
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	-	-	-
<i>Campylobacter</i>	0	0	-	-	-

Sur l'ensemble des 44 échantillons analysés, on note une absence de Salmonelles, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter*.

☞ Laits en poudre

Tableau XIX : Fréquence des germes dans 6 échantillons de lait en poudre

Germes	Nombre d'échantillons positifs	% d'échantillons positifs	Nombre de colonies par ml		
			moyenne	médiane	Valeur maximale
Coliformes à 30°C	0	0	0	0	0
Staphylocoques	0	0	0	0	0
Salmonelles	0	0	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
Anaérobies sulfito-réducteurs	3	50	1,33	1	2

Seuls les Anaérobies sulfito-réducteurs ont été retrouvés dans 50% des échantillons de lait en poudre.

☞ Eaux

Tableau XX : Fréquence des germes dans 18 échantillons d'eau du réseau de distribution

Germes	Nombre d'échantillons positifs	% d'échantillons positifs
Flore mésophile totale à 37°C	17	94,5
Flore mésophile totale à 22°C	17	94,5
Coliformes à 37°C	10	55,6
Coliformes Thermotolérants à 44°C	10	55,6
Streptocoques Fécaux	7	38,9
Spores d'anaérobies sulfito-réducteurs	4	22,2

La Flore mésophile totale à 37°C et 22°C a été présente dans 17 échantillons sur un total de 18 soit un pourcentage de 94,5 %.

1-3. Sensibilité aux antibiotiques

☞ *Escherichia coli*

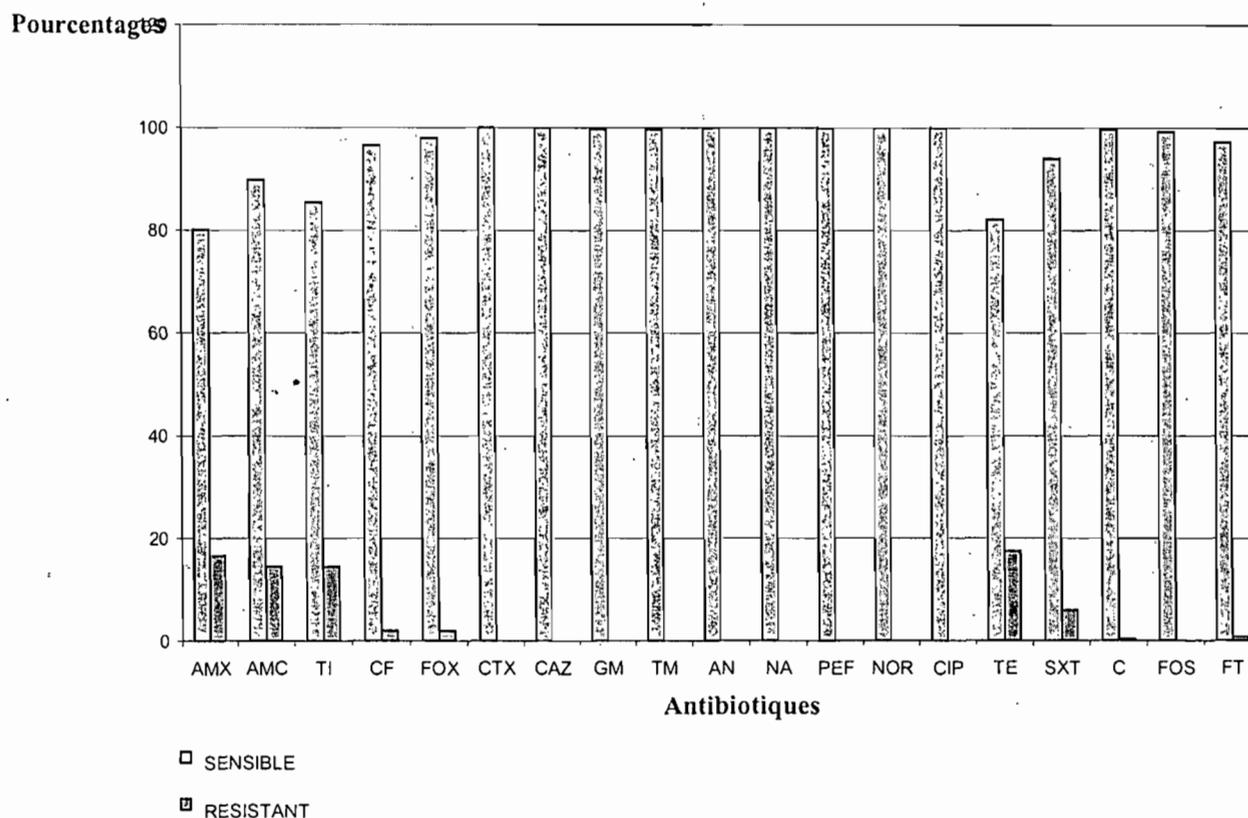


Figure 6 : Fréquence de sensibilité aux antibiotiques chez 303 souches d'*Escherichia coli* testées selon les recommandations du CA-SFM (2004)

Les souches de *E. coli* isolées dans l'ensemble des laits (cru et caillé) sont pour la plupart sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. On note par contre une légère résistance de certaines souches à l'amoxicilline (16.5%), à l'amoxicilline + acide clavulanique et ticarcilline (14.5%), puis à la Tétracycline 17.4%.

Pénicillinase de bas niveau : 29/303 (9.6 %) (Amox R ; Tica R ; AMC S)
 Pénicillinase de haut niveau : 15/303 (5.0 %) (Amox R ; Tica R ; AMC I)
 Céphalosporinase de bas niveau: 6/303 2.0 % (Amox R AMC R Ticar S
 Céfalotine R Céfoxitine R)

☞ *Staphylococcus aureus*

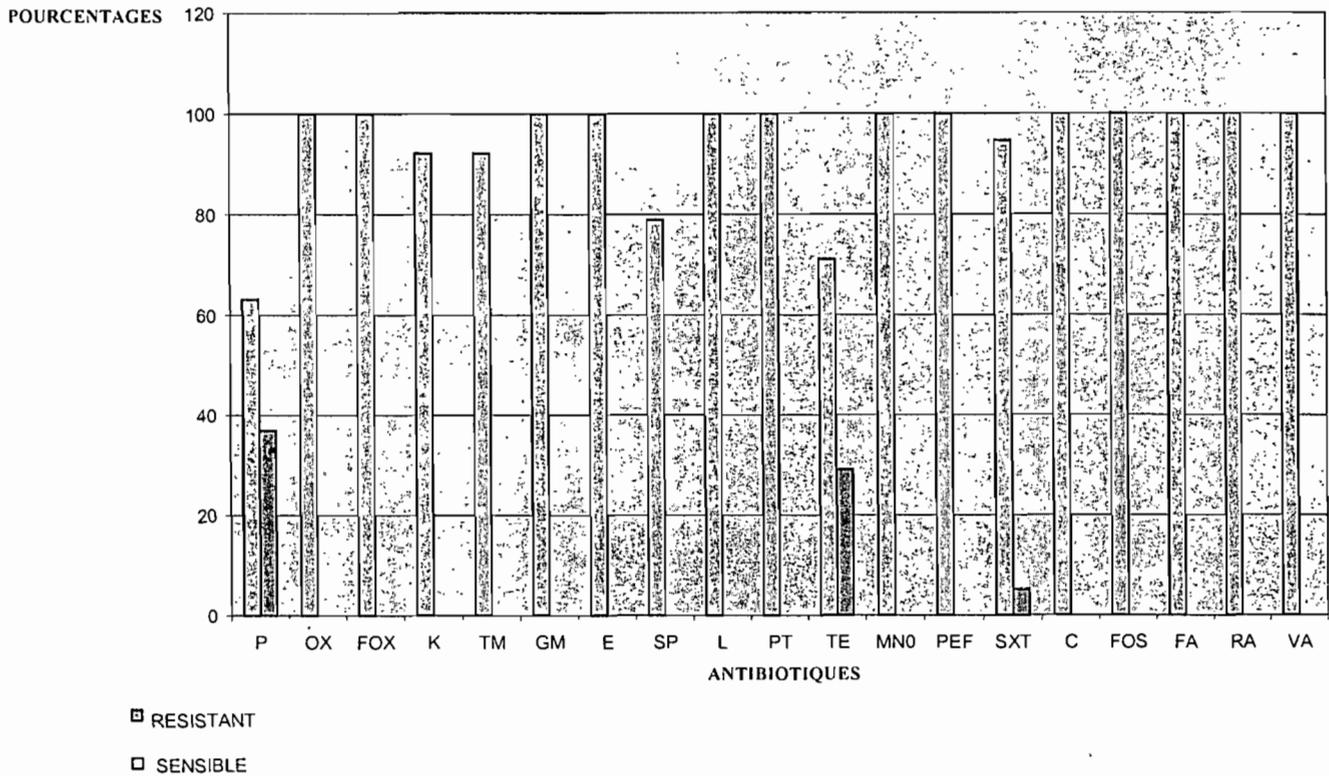


Figure 7 : Fréquence de sensibilité des souches de *staphylococcus aureus* aux antibiotiques selon les recommandations CA-SFM (2004)

Les souches de *S. aureus* isolées dans le lait caillé sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. Pour les laits crus, une résistance a été observée à la pénicilline G (37%) et à la tétracycline (29%). Aucun *S. aureus* résistant à la méticilline (Oxacilline) n'a été isolé.

☞ *Salmonelles*

Seules cinq souches de *Salmonella* Johannesburg ont été isolées dans un lait (lait cru). L'antibiogramme a montré une sensibilité de ces souches à l'ensemble des antibiotiques testés.

1-4. Résultats des analyses de biologie moléculaire et du test ELISA

Les recherches spécifiques que nous avons effectuées pour la détection de *Mycobacterium bovis*, *Coxiella burnetii* par biologie moléculaire et de *Brucella abortus* par test ELISA nous ont donné dans l'ensemble les résultats suivants :

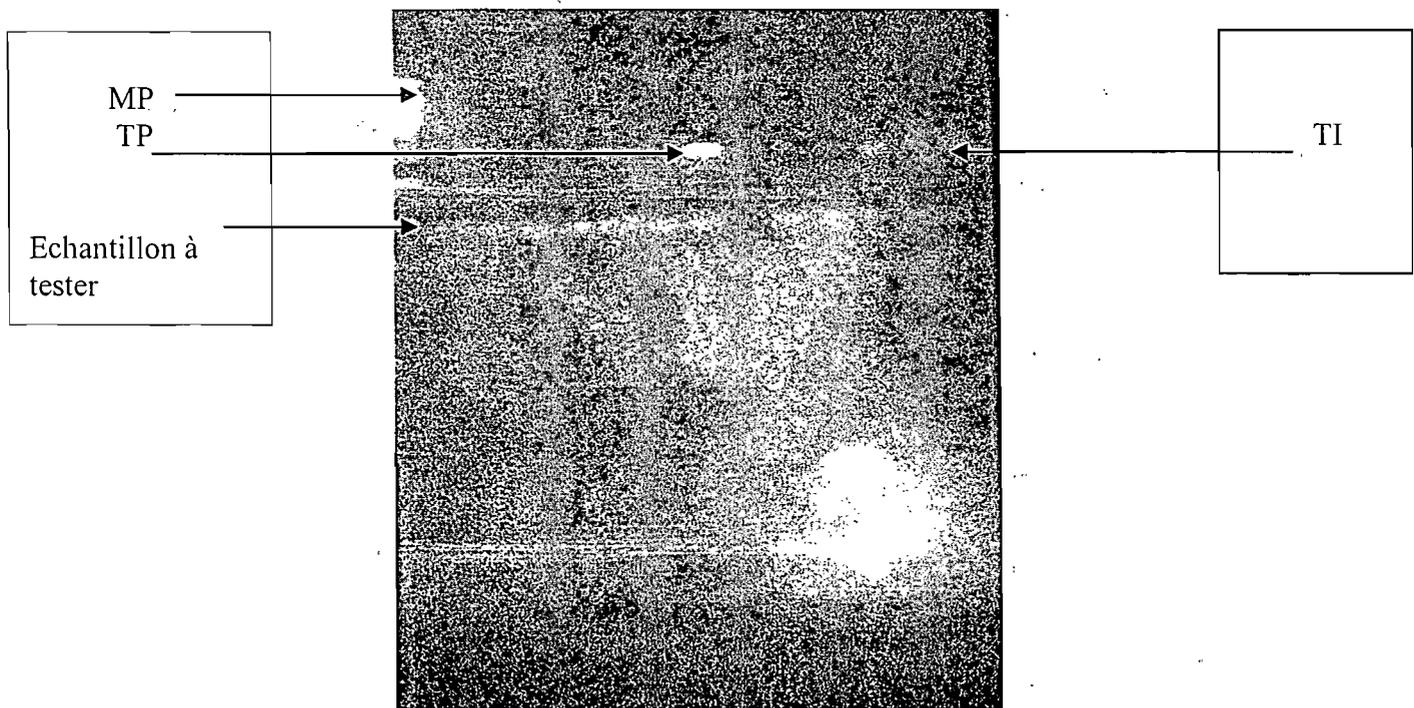
Mycobacterium bovis = 0%

Coxiella burnetii = 19%

Brucella abortus par test ELISA = 2.4%

1-4-1. *Mycobacterium bovis*

Aucun extrait d'ADN n'a été positif et la révélation par électrophorèse nous a donné un ensemble de gels identiques à celui de la figure 8



TI : Témoin d'Inhibition
MP : Marqueur de Poids Moléculaire (240pb)
TP : Témoin Positif *Mycobacterium bovis*

Figure 8 : séparation des produits de PCR sur gel

1-4-2. *Coxiella burnetii* et anticorps anti-*Brucella abortus*

Les anticorps anti-*Brucella abortus* ont été détectés dans un lait cru provenant d'une unité de production située à la périphérie de Dakar

Quant à *Coxiella burnetii*, il a été mis en évidence dans 8 laits crus provenant de 6 unités, dont 4 unités sur 6 à la périphérie de Dakar, 1 unité sur 2 à Ourossogui (Matam), et une autre unité sur 11 dans la région de Louga. Voir (Figure 9)

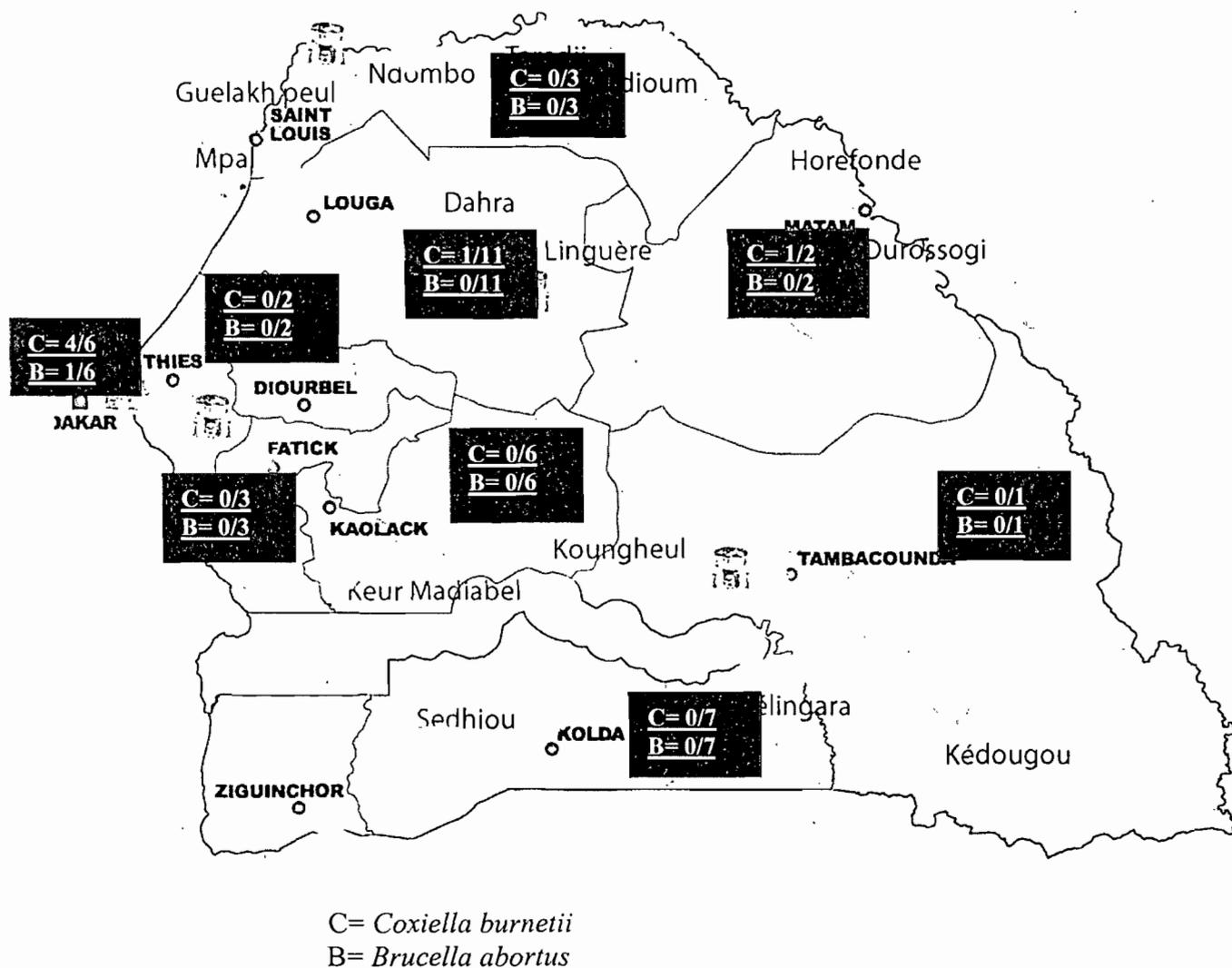


Figure 9 : Résultats obtenus au niveau des unités de production et de transformation de lait cru testées pour *Coxiella burnetii* et anticorps anti-*Brucella abortus* au Sénégal.

2-DISCUSSION

2-1. Représentativité de l'échantillonnage

L'ensemble des unités de production et de transformation identifiées au Sénégal lors d'une mission préalable effectuée par le GRET a été étudié. Mais nous regrettons un peu le fait que, la distance et le temps qui nous était imparti ne nous aient pas permis d'effectuer plusieurs prélèvements à au moins 2 mois d'intervalle comme l'exige la norme DGAL /SDHA/N2001-8090, de même que le Règlement CE 853-2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004.

En plus, les cellules somatiques n'ont pas été recherchées faute de réactifs qui n'ont pas été livrés à temps, or nous savons que ces cellules somatiques ne se conservent pas par congélation. Ce biais nous semble minime car ces cellules somatiques ne sont pas responsables des troubles graves pour la santé publique.

2-2. Facteurs de risques

A l'issue de nos analyses, nous avons obtenu 7 unités satisfaisantes et 61 unités non satisfaisantes. Les facteurs de risque qui ressortent de cette étude, après le calcul des χ^2 sur Epi info, sont les paramètres liés au matériel, et notamment le fait d'utiliser un réservoir en plastique.

Le fait d'avoir « la nature du matériel » comme facteur de risque est bien justifié, car certaines matières sont plus faciles à nettoyer et à désinfecter que d'autres. C'est le cas par exemple du matériel « INOX », qui par sa nature, ne retient pas de débris d'aliments, par rapport au matériel en bois ou en plastique. C'est ainsi que BROUTIN et al, (18) ont trouvé qu'il fallait privilégier les matériels en aluminium ou en plastique alimentaire (attention cependant aux rayures fréquentes du plastique, très difficiles à nettoyer et désinfecter) dans le souci d'une désinfection efficace.

Concernant les autres facteurs, nous ne trouvons pas de relation directe entre les mauvaises pratiques et la qualité du lait : Tous les autres paramètres sont non significatifs. Nous pensons que cela est dû au fait que les réponses que nous donnaient les personnes interrogées n'étaient pas toujours les bonnes, car chacune d'entre elles voulaient nous faire comprendre qu'elles étaient parfaites en matière d'hygiène. C'est ainsi que :

-98.4% des personnes interrogées déclarent se laver les mains avant et après la manipulation.

- Près de 50 % déclarent manipuler sans bagues

- 64 % déclarent désinfecter l'eau avant toute utilisation.

Ceci n'est pas en concordance avec les résultats obtenus (61 unités non satisfaisantes). C'est pourquoi nous préconisons une enquête d'observation, plutôt qu'une enquête par questionnaire.

2-3. Appréciation globale du niveau de contamination des laits et de l'eau.

☞ Lait cru

Les résultats obtenus au niveau des différents points de prélèvement montrent un taux de contamination élevé, rendant 68.3% de lait cru impropres à la consommation selon la Norme DGAL relative au « lait matière première », et 90.2 % de lait cru impropre pour les « laits de consommation mise sur le marché ».

Cette Norme DGAL est plus rigoureuse pour les "laits de consommation mise sur le marché", d'où la différence entre les deux pourcentages.

Ce degré de contamination est élevé, mais reste inférieur aux résultats obtenus lors d'une étude similaire réalisée au Mali en 2002 dans le cadre du projet « Lait Sain pour le Sahel », où BONFOH (14) a trouvé que 100% de lait frais était impropre à la consommation selon les normes internationales.

Ce niveau élevé de contamination est dû aux mauvaises pratiques (hygiène et traitement du lait) pendant ou après la traite. Ceci s'explique par le fait que :

à la sortie de la mamelle, le lait est à la température de l'animal, et malgré cette condition favorable à la multiplication de nombreux germes, ceux-ci sont inexistant pendant les quelques heures qui suivent la traite, en raison du pouvoir bactériostatique du lait frais. Il est hautement souhaitable de profiter de cette période pour refroidir le lait afin de ralentir la prolifération des micro-organismes dès la phase bactériostatique passée (27).

☞ Lait caillé

Notre obtenons pour notre étude un taux de 81.8% de lait caillé non satisfaisant selon la Norme Sénégalaise NS 03-002 et la Norme DGAL 2001-8090.

Plusieurs éléments pourraient expliquer ce taux élevé :

-la contamination des laits au cours des manipulations due au manque de bonnes pratiques d'hygiène, et à la mauvaise conservation de ces laits qui entraîne une prolifération des microorganismes lorsque la température est élevée.

- la contamination des matières premières (lait cru, lait en poudre, eau de reconstitution pour le lait en poudre). Car à partir d'une matière première fortement contaminée, il est fort probable d'avoir des produits finis contaminés, surtout si la pasteurisation n'a pas été bien effectuée.

- la contamination par les additifs achetés en vrac dans les marchés locaux.

BONFOH (14) a trouvé qu'au Mali, aucun produit laitier ne répondait aux normes internationales, et que seuls 6% de ces produits laitiers ont respecté les normes Kenyanes relatives au lait et produits laitiers.

Cependant, au Cameroun, NJASSAP (42) a trouvé que 69.70 % des laits caillés étaient impropres à la consommation. Cette valeur inférieure à la notre serait due aux effets de la température. Car en plus des glaciers utilisées par les commerçants pour la conservation du lait, on note un climat assez doux dans ce pays, ce qui ralentit un peu la prolifération des microorganismes.

☞ Lait en poudre

Pour ce qui est du lait en poudre, nous obtenons selon la norme sénégalaise NS 03-001, 50 % de non conformité. Tandis que selon la norme DGAL, tous les laits en poudre sont de qualité satisfaisante. La norme Sénégalaise en matière de lait en poudre est plus rigoureuse que la norme de la Direction Générale de l'Alimentation française.

La contamination du lait en poudre trouve son origine dans l'utilisation fractionnée après ouverture du sac. En effet, chez ces transformateurs un sac de 50 Kg de lait en poudre est utilisé pour 2 à 3 préparations. Ce qui ne garantit pas la pureté de ces laits après chaque utilisation.

☞ Eau

C'est le décret n° 89-3 du 3 Janvier 1989 (journal officiel de la république française) qui nous a permis de juger la potabilité de l'eau. C'est ainsi que nous avons obtenu 67 % d'eau non potable dans notre étude.

Les eaux non potables sont des sources potentielles de contamination du lait.

Il faudrait donc une bonne désinfection de ces eaux, ainsi que du récipient avant leur utilisation. Selon la FAO, cité par NJASSAP (42), une étude faite à Ibadan (Nigeria) a montré que l'eau était la principale source de contamination des aliments. Si nous prenons l'exemple de l'eau de robinet, les contaminations proviennent généralement du fait que l'eau coule des robinets pendant quelques heures seulement par jour et parfois même pas tous les jours. Ce qui favorise le développement des micro-organismes dans les conduites contenant l'eau stagnante.

Après cette vue globale du niveau de contamination de nos échantillons, Il serait donc nécessaire d'évaluer cette contamination de manière plus détaillée en tenant compte de chaque germe.

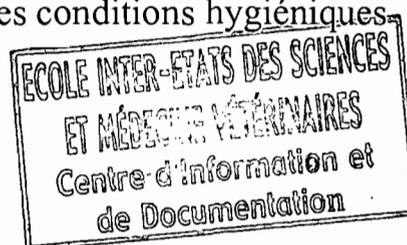
2-4. Appréciation du niveau de contamination en fonction des germes

Elle concerne les germes suivants :

- Flore de contamination fécale (Coliformes totaux, Coliformes thermotolérants *Escherichia coli*)
- Flore pathogène (Staphylocoques, Salmonelles, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* et *Coxiella burnetii*)

☞ Flore de contamination fécale

La recherche de ces germes au niveau industriel constitue un test de qualité hygiénique globale et un bon indice de mauvaises conditions hygiéniques pendant ou après la transformation du lait (30).



→ Les coliformes totaux

Dans notre étude, 19.5 % des laits crus et 84% de laits caillés sont contaminés par les coliformes totaux. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par NJASSAP (42) au Cameroun avec 57 %. Dans l'étude réalisée par BONFOH (14) au Mali, 100% de laits crus et de laits caillés étaient contaminés par les coliformes totaux.

Tous ces résultats diffèrent des nôtres et confirment la connaissance selon laquelle, le niveau de contamination diffère :

- selon le fabricant
- selon le niveau d'hygiène et de maîtrise des dangers inhérents aux manipulations.

Les principales sources de contamination de la filière locale sont les récipients du berger, des vendeurs, avec un effet non négligeable du temps et de la température de conservation.

→ Les coliformes fécaux ou thermotolérants et *Escherichia coli*

► Les coliformes fécaux ou thermotolérants

Pour ce qui est des Coliformes fécaux ou thermotolérants, nous avons obtenu un niveau de contamination de 81,8% dans le lait caillé. Ces Coliformes thermotolérants occupent la deuxième place de la flore d'altération des laits caillés analysés. Ce sont des germes pseudolactiques, donc capables de tolérer des pH relativement bas du lait caillé.

NJASSAP (42) a trouvé que 38.69 % des laits caillés étaient contaminés par les coliformes fécaux.

ARONA (5) quant à lui a trouvé que 100% des échantillons de lait caillé artisanal analysés sur le marché dakarois étaient souillés par les coliformes thermotolérants. Ce taux encore plus élevé témoigne des contaminations dues aux manipulations, ainsi qu'aux mauvaises conditions de stockage de ces produits sur le marché.

HAMZA (44) a trouvé un taux de 12.5% de laits caillés non satisfaisants au Niger, lors d'une étude effectuée en 2000 au Niger.

Les résultats de SINA cité par DIENG (22) ont montré que sur 87 échantillons de laits caillés SOCA analysés, 6 % seulement ont été contaminés. Ce taux de contamination est plus faible que le notre. Cela peut se justifier par le fait que nos échantillons proviennent d'unités de productions différentes, ayant des procédés de fabrication variables, alors que ceux de SINA proviennent tous d'une même société donc bénéficient d'une certaine homogénéité des lots.

Dans tous les cas, la présence des coliformes fécaux est le signe le plus souvent d'une contamination exogène d'origine fécale. Elle traduit également une défaillance technologique ou hygiénique.

► *Escherichia coli*

Ils ont été retrouvés à 72.7 % dans le lait caillé et à 85.4% dans le lait cru, ce qui est largement supérieur aux normes.

Le taux plus faible dans le lait caillé serait dû à l'effet de l'acidité qui réduit considérablement le pourcentage de *E. coli* (39).

Les taux proches de *E.coli* retrouvé dans le lait caillé (72%) et de Coliformes fécaux (82%) nous montrent que les coliformes fécaux sont constitués en grande majorité de *E. coli*. LECLERC et MOSSEL (35) ont montré que les coliformes thermotolérants sont représentés à plus de 99% par *E. coli* et qu'il est probable qu'à la température de 44° C, les *E. coli* en présence d'autres coliformes thermotolérants se développent mieux.

Pour POUMEROL cité par NJASSAP (42), le simple fait de retrouver *E. coli* dans les aliments, même en grand nombre, n'est pas suffisant pour dire qu'il est pathogène. Certains seulement peuvent être pathogènes pour l'homme et provoquer des gastro-entérites.

Il est donc important pour un travail à venir de faire un typage pour la détermination des souches entéropathogènes,

En définitive, ces coliformes sont des indices de contamination fécale, c'est-à-dire que leur présence dans une eau ou un aliment fait penser qu'il y a eu au cours de leur préparation une faute d'hygiène ayant conduit à une souillure par des matières fécales.

☞ Flore pathogène.

► *Staphylococcus aureus*.

Nos analyses ont révélé que 39 % des laits crus et 18.2 % des laits caillés sont contaminés par *Staphylococcus aureus*. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par NDIAYE (40) sur le lait caillé à Dakar et par HAMZA (44) sur le lait caillé artisanal « Tarmamoun Adar » au Niger et qui sont respectivement: 19% et 18.18%.

NJASSAP (42), a trouvé pour le même type d'étude au Cameroun, un taux beaucoup plus élevé (37%) de produits contaminés par *Staphylococcus aureus*. Il faut signaler que NJASSAP a effectué ses prélèvements au niveau des marchés, ce qui pourrait expliquer ce grand écart due à une forte manipulation.

► Les Salmonelles

Les salmonelles n'ont pas été retrouvées dans les échantillons de laits caillés analysés. Cela est conforme aux normes sénégalaises sur les laits fermentés qui exigent leur absence.

Les travaux de NJASSAP (42) n'ont également révélé aucune salmonelle. Cette absence de salmonelles dans le lait caillé se justifie sans doute par leur forte sensibilité aux pH acides. En effet, DUBOIS et SMORAGIEWICZ (24) ont constaté que les salmonelles ne résistent pas à des pH situés entre 4.6 et 4.8. Par contre dans le lait cru nous avons identifié 2.4 % de lait contaminé par les salmonelles. Ce faible taux serait due à l'effet de la pasteurisation du lait.

► *Brucella abortus, coxiella burnetii*

Dans les 41 échantillons de lait cru analysés nous avons obtenu 2.4 % de lait cru contenant les anticorps spécifiques de *Brucella abortus*.

Nos résultats se rapprochent des résultats de NAKOUNE et al. (38) qui ont trouvé une prévalence de 3.3 % d'anticorps de *Brucella abortus* chez les bovins en République Centrafricaine.

Des taux plus élevés ont été observés dans d'autres régions d'Afrique à savoir : 6.6 % au Ghana et 12.3 % en Uganda (32).

Le nombre d'échantillons peu élevé pour notre étude pourrait expliquer le fait que nos résultats soient inférieurs à ces derniers.

Concernant *coxiella burnetii*, la PCR temps réel a révélé un taux de positivité de 19%. Ce taux est légèrement supérieur aux résultats de

ADESIYUN et al. (1), qui ont révélé 24.3% de *Coxiella burnetii* dans lait au Nigeria. Cette différence pourrait provenir du fait que, les vaches ont été prélevées individuellement dans ces études, tandis que nous avons prélevé un mélange de lait issu de plusieurs vaches de plusieurs élevages différents. Ajouter à cela le nombre réduit d'échantillon pour notre étude.

NAKOUNE et al. (38) ont trouvé un taux beaucoup plus bas :14.3% par immunofluorescence indirect sur les sérums de bovins.

Vu le mode de transmission facile entre animaux par simple contact, et entre animaux et humains par contact et par ingestion des produits d'origine animale comme le lait, il est probable que la fièvre Q et la Brucellose soient présentes chez des humains vivant dans ces régions infectées, en particulier les éleveurs. NIANG et al en 1998 (41) ont trouvé une prévalence de 33 % d'anticorps de *coxiella burnetii* chez les donneurs de sang et patients du laboratoire central de l'Hôpital de Nouakchott en Mauritanie.

Il serait important de mener une telle étude au Sénégal dans le but de ressortir les corrélations entre la séroprévalence chez les bovins et les humains.

► *Mycobacterium bovis*

Nous n'avons pas retrouvé de *Mycobacterium bovis* dans les échantillons de lait analysés par PCR classique.

En Afrique, et particulièrement au Ghana une prévalence de 13.8% a été trouvée par BONSU et al. (15).

Le fait que nous n'ayons pas obtenu de *Mycobacterium bovis* peut se justifier premièrement par le nombre peu élevé d'échantillons, et deuxièmement par le fait que nous avons analysé des laits de mélange (venant de plusieurs animaux issus de plusieurs élevage). En effet, avec ces laits de mélange il pourrait y avoir un phénomène de dilution, qui sans doute va réduire la capacité du test à détecter ce micro-organisme. En plus, la durée de multiplication des mycobactéries est assez longue, (3 à 4 semaines). Or nous avons prélevé et analysé nos laits dans un intervalle de temps assez réduit.

Par ailleurs, KONTE cité par DIENG (22) a rapporté une faible prévalence de tuberculose au Sénégal

Au vu des résultats obtenus, et comparativement aux études précédemment menées dans la filière artisanale au Sénégal, la qualité microbiologique du lait n'a pas évolué favorablement. Cette étude révèle une forte contamination du lait par la flore mésophile totale, et la présence de bactéries pathogènes parmi lesquelles des agents de zoonoses.

Face à cette situation nous avons été amené à faire un certain nombre de recommandations.

2-5. Appréciation de la sensibilité aux antibiotiques des germes isolés

Cette étude de la fréquence de sensibilité aux antibiotiques des germes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) isolés du lait cru et lait caillé révèle que presque toutes les souches sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés.

Cependant on note une faible résistance de certaines souches de *Staphylococcus aureus* isolé du lait cru à certains antibiotiques comme la pénicilline G et la tétracycline.

Les résultats de cette toute première étude de la sensibilité des germes isolés du lait au Sénégal nous amènent à dire que, la situation n'est pas encore très critique. Mais qu'il faut dès maintenant prendre des mesures appropriées pour éviter toute évolution vers une résistance générale.

Pour la santé humaine, le risque peut être de deux ordres : risques posés par les résidus dans le lait de consommation et risques dus à la contamination de l'homme par des bactéries Zoonotiques résistantes à des antibiotiques chez l'homme.

Le meilleur outil pour suivre l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans une filière de production, et à l'échelle d'une région ou d'un pays, est un réseau de surveillance, avec une structure pérenne.

En plus de cela il faudra sensibiliser les producteurs de lait cru sur les risques d'utilisation anarchique des antibiotiques chez les animaux d'une part, et d'autre part sur l'importance du respect des délais d'attente pour chaque médicament.

Au vu des résultats obtenus, et comparativement aux études précédemment menées dans la filière artisanale au Sénégal, la qualité microbiologique du lait n'a pas évolué favorablement. Cette étude révèle une forte contamination du lait par la flore mésophile totale, et la présence de bactéries pathogènes parmi lesquelles des agents de zoonoses.

Face à cette situation nous avons été amené à faire un certain nombre de recommandations.

CHAPITRE IV : RECOMMANDATIONS

A l'issue de cette étude sur la qualité du lait au Sénégal, et au regard des résultats obtenus, un certain nombre de recommandations méritent d'être tiré dans le but d'améliorer la qualité sanitaire de ces produits (lait cru, lait caillé).

Ces recommandations visent deux grands niveaux, à savoir :

- les autorités publiques
- les professionnels de la filière lait (producteurs et transformateurs)

1. AUX AUTORITES PUBLIQUES

Vu l'importance économique, nutritionnelle, et les risques d'intoxication que le lait et les produits laitiers peuvent engendrer, les autorités doivent :

-Mettre sur pied une législation alimentaire pour ces produits et surtout l'adopter, car nous constatons qu'au Sénégal, les normes sur les produits laitiers sont anciennes et n'ont pas donné lieu à des décrets d'application : elles n'ont donc pas de caractère obligatoire. Il faut donc veiller au respect de ces normes.

- Porter une attention particulière à la santé du cheptel.

Il est donc nécessaire que les autorités compétentes et les projets intervenant dans la zone de collecte élaborent des recommandations pour les éleveurs. En fonction de la prévalence des maladies il faudra les sensibiliser aux dangers liés à la consommation des produits laitiers des vaches atteintes.

Pour une meilleure gestion du cheptel, il faudra éliminer systématiquement ou progressivement les animaux atteints de la brucellose, de la tuberculose et de mammites chroniques à la consommation ou lors de l'achat de nouveaux animaux.

- Procéder au recrutement de vétérinaires hygiénistes qui auront pour rôles d'assurer un suivi sanitaire à toutes les étapes depuis la production jusqu'au produit fini.

Ils doivent prélever des échantillons de matières premières et de produits finis pour les faire analyser par des services compétents (laboratoires d'hygiène alimentaire), servant d'appuis aux industries.

- Procéder à des contrôles inopinés au niveau de unités de production et de transformation afin de s'enquérir des dispositions hygiéniques prises.

Enfin, nous recommandons aux autorités de rendre obligatoire l'utilisation du Guide de Bonnes Pratique d'Hygiène (GBPH) par les acteurs de la filière artisanale tel qu'il a été validé le 15 Novembre 2005. Ce guide devra tout

d'abord être largement diffusé et transposé en support de formation et d'information pour tous les acteurs de la filière lait, les organismes d'appui et les agents de l'élevage. Il devra ensuite être pris en compte dans la réglementation et dans la révision des normes.

2. LES PROFESSIONNELS DE LA FILIERE LAIT (PRODUCTEURS ET TRANSFORMATEURS).

Il faudra tout d'abord à ce niveau mettre l'accent sur les volets très importants que sont l'information et l'éducation de ces acteurs sur les méthodes appropriées de manipulation des aliments.

Les producteurs et les transformateurs doivent comprendre qu'ils peuvent être source de danger si les principes d'hygiène en matière de préparation des aliments ne sont pas respectés. Ainsi, tout part de l'hygiène corporelle, du matériel, des locaux, et la maîtrise des techniques de transformation.

2-1. Hygiène du personnel

Il faut insister ici sur :

- la propreté corporelle,
- le port de blouse blanche et propre
- Port de gant avec un changement après chaque étape de transformation
- port de coiffes, et de masque bucconasal
- éviter de manipuler avec des bagues

2-2. Hygiène du matériel

Un nettoyage régulier du matériel est recommandé, y compris l'utilisation d'un produit bactéricide, rinçage et désinfection avec de l'eau de javel puis séchage, car le milieu humide favorise le développement des micro-organismes.

Pour la nature du matériel, nous recommandons l'utilisation du matériel en « INOX » car il est facile à laver et surtout à désinfecter.

2-3. Hygiène des locaux

Construire les locaux de façon à réduire les entrecroisements qui facilitent les intercontaminations.

L'aménagement des locaux doit respecter la marche en avant avec secteur sains et secteurs souillés. Garder les alentours de l'unité propre.

2-4 Techniques de transformation.

- Respecter le couple temps/température avec un chronomètre et un thermomètre. Le guide de bonnes pratiques recommande le couple « 85°C pendant 20 minutes ». Utiliser des méthodes adaptées : la meilleure méthode pour les unités artisanales est la pasteurisation au bain-marie.
- Grande vigilance sur les matières premières à l'arrivée dans l'unité de transformation (poudre de lait importée, lait cru, eau de reconstitution du lait) ainsi que sur le produit fini.
- Surveiller la qualité de l'eau, notamment celle qui est utilisée pour reconstituer le lait en cas d'utilisation de lait en poudre, mais également celle que l'on emploie pour le nettoyage.
- Enfin, prendre en compte toutes les recommandations mentionnées dans les fiches de bonnes pratiques présentées dans la première partie de ce travail.

Toutes ces recommandations, si elles sont bien observées, contribueront à assurer la qualité des laits et produits laitiers au Sénégal.

CONCLUSION

L'urbanisation en Afrique s'est accompagnée d'un accroissement considérable de la pauvreté, et d'une dégradation de la qualité de vie des populations concernées, avec des conséquences drastiques au double plan de la "nutrition et de la santé".

C'est l'une des raisons pour lesquelles les populations sénégalaises s'orientent plus aujourd'hui vers la consommation du lait. Considéré comme l'un des aliments les plus complets, il continue d'occuper une place prépondérante dans l'alimentation humaine, et on attend de lui ses vertus connues qui en font sa valeur et expliquent son importance.

Cependant, autant le lait est prisé, autant il est délicat et dangereux, car il suffit d'une petite défaillance hygiénique ou technique pour qu'il soit source de plusieurs affections de type : indigestion, diarrhée, dysenteries, hépatites, tuberculose Brucellose ...etc. En outre, les consommateurs ont le droit d'exiger un lait de bonne qualité hygiénique et organoleptique. Si l'on veut élargir sa consommation, il faut étudier le problème de la qualité bactériologique.

C'est pour apprécier la qualité microbiologique du lait dans la filière artisanale au Sénégal que la présente étude a été menée. Elle a consisté à réaliser des analyses microbiologiques, sérologiques et moléculaire des échantillons de lait cru, lait caillé, lait en poudre et d'eau prélevés dans les petites unités de production et de transformation dans 9 régions du Sénégal.

A cet effet, les résultats suivants ont été obtenus.

- Sur le plan de la qualité des unités de production et de transformation :

Sur les 68 unités prélevées, 7 ont été satisfaisantes, et 61 non satisfaisantes

- Sur le plan microbiologique :

- Nous avons trouvé respectivement 68,3 % et 90,2 % des échantillons de lait cru impropres à la consommation selon les « Critères microbiologiques lait matière première » et « Critères microbiologiques laits de consommation de mise sur le marché » de la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 30 mars 1994).

La fréquence des pathogènes trouvée est de :

39 % pour *Staphylococcus aureus*

84 % pour *Escherichia coli*

2,4 % pour les Salmonelles

- 82,2 % de laits caillés étaient également impropres à la consommation selon la Norme Sénégalaise NS 03-002 et la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 21 décembre 1979).

Ici la fréquence des pathogènes est de :

Staphylococcus aureus 18,2 %

Escherichia coli 72,7%

Avec absence de Salmonelles

Il faut également préciser que dans le lait cru et le lait caillé, certains germes comme *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* et les Streptocoques hémolytiques ont été recherché, mais pas retrouvés.

- pour ce qui est du lait en poudre, 50 % étaient non satisfaisants pour la Norme Sénégalaise NS 03-001 et tous les échantillons satisfaisants pour la Norme DGAL/SDHA/N2001-8090 (AM 21 décembre 1979). Les Bactéries anaérobies sulfito-réductrices étaient présentes dans 50 % des échantillons

- Enfin, l'analyse de l'eau a révélé que 67 % des échantillons étaient non potables, et nous avons obtenu une fréquence de Coliformes Thermotolérants à 44°C de 55,6 %, Streptocoques Fécaux 38,9 % Spores d'anaérobies sulfito-réducteurs 22,2 %.

▪ Sur le plan de la Biologie moléculaire et sérologie ELISA

La recherche de *Coxiella burnetii*, agent responsable de la fièvre Q a révélé que 19 % des échantillons de lait cru étaient contaminés par ce dernier.

Par contre, la recherche des Mycobactéries du complexe tuberculosis a donné des résultats négatifs.

Quant au test ELISA pour la détection des anticorps anti *Brucella abortus*, il nous a permis d'obtenir un pourcentage de 2,4 % de lait cru contaminé.

▪ Enfin, les résultats de l'enquête que nous avons effectuée nous ont permis de ressortir un facteur de risque d'insalubrité dans les unités de production et de transformation du lait. En effet, il s'agit du groupe de facteur de risque lié au Matériel utilisé. Ce groupe étant composé d'éléments suivants :

Réservoir de mélange en plastique

Absence de matériel de conservation du lait à froid,

Absence de nettoyage du matériel

Il ressort de cette analyse que le lait subit une forte contamination tout au long de la chaîne de production et de transformation. Cette situation qui compromet la santé de l'homme nous interpelle tous (populations, services techniques spécialisés, producteurs, transformateurs, distributeurs-vendeurs, autorités administratives et décideurs. Les intérêts sont convergents et personne ne peut mener ce combat seul.

Pour prévenir ces contaminations et les dangers qu'elles engendrent, les mesures suivantes doivent être prises :

- la nécessaire sensibilisation et la formation urgente des acteurs intervenant dans le secteur lait.

- La conduite d'une vaste campagne d'information et de sensibilisation sur l'hygiène et la salubrité des aliments en particulier du lait à travers les médias et dans les langues nationales.
 - L'appui à la recherche et à la transformation pour améliorer encore la qualité des produits laitiers.
 - La vulgarisation des résultats de la recherche et la disponibilité des nouvelles technologies pour une bonne appropriation des différents acteurs.
 - La vulgarisation du Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH) et surtout veiller à son utilisation par les acteurs de la filière artisanale tel qu'il a été validé le 15 Novembre 2005 à Dakar.
 - L'organisation du secteur par catégorie socio professionnelle.
 - L'élaboration d'une nouvelle loi sur le lait, et la mise en place d'un plan de suivi de l'application de ces normes et critères en partenariat avec les acteurs.
- De telles actions contribueront à améliorer la qualité sanitaire du lait au Sénégal et surtout à protéger notre santé, gage du mieux vivre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-ADESIYUM A. et al., Shedding of *Coxiella burnetii* in milk by Nigerian dairy and dual purposes cows.(1985) [Ressource électronique] Accès internet. <http://wwwpubmed> (page consulté le 12/05/2006.

2-ALAIS C. Science du lait : principes et techniques laitières.- 4^e éd.- Paris : édition Sepaic, 1984.- 814p.

3-AMARGLIO S. Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physique et chimique.- 3^e éd.- Paris : AFNOR ; ITSV ; 1986.-1030p.

4-APFEL BAUM M.; FORRAT C. et NILLUS P. Diététique et nutrition.- 5^e éd.- Paris : Masson ; 1989.- (312-332 p.)

5-ARONA D.- Contribution à l'étude de la qualité bactériologique de quelques denrées d'origine animale commercialisées sur le marché dakarois. Thèse : Med. Vet : Dakar ; 2000 ; (3).

6-BALZER L.- Biologie des populations humaines. – Paris les presses de Unesco, 1976.- 147-215p.

7-BERCHE P. LOUIS J. et SIMONET M. .- *Bactériologie : les bactéries des infections humaines*, Paris Flammarion, Médecine-Sciences.- 1991

8-BERCHE P.- *Escherichia coli.* (127-147) in: Bactériologie : les bactéries des infections humaines.-Paris : Flammarion Médecine – Sciences, 1988.-660p.

9-BERCHE P.- les Salmonelles. (77-90) in: Bactériologie : les bactéries des infections humaines.- Paris : Flammarion Médecine – Sciences, 1988. – 660p.

10-BERCHE P.- *listeria monocytogenes* (312-319) in: Bactériologie : les bactéries des infections humaines.- Paris : Flammarion Médecine– Sciences, 1988. – 660p.

11-BERCHE P.-BRUCELLE in: Bactériologie : les bactéries des infections humaines.- Paris : Flammarion Médecine – Sciences, 1988. – 660p.

12-BERCHE P.-Les Shigelles. (93-99) in: Bactériologie : les bactéries des infections humaines.- Paris : Flammarion Médecine – Sciences.1988. – 660p.

13-BOIVERT C.- Contribution à l'étude de la contamination du lait: mise en évidence de virus dans le lait cru par microscopie électronique. Thèse : méd. Vét : Toulouse : 1980 ; 66.

14-BONFOH B. « Lait Sain pour le Sahel » : Atelier de restitution des résultats ; hygiène et qualité du lait et des produits laitiers au Mali : implication en production laitière et en santé publique.- Bamako; 2002 : 51p.

15-BONSU O. et al., Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implication .Acta Tropica,2000 **76** : 9- 14.

16-BOUDIER J.F. et LUQUET F M.- Dictionnaire laitier.-2^e éd.- paris : Ed. Tec & Doc., 1981.- 220p

17-BOURGEOIS C. M. et LARPENT J. P.- Microbiologie alimentaire : les fermentations alimentaires. - Paris : APRIA ; Ed. Lavoisier. Tec & Doc., 1989.- 334 p.

18-BROUTIN C.; DIEDHIOU Y. et DIENG M.; Maîtrise de la qualité dans la transformation laitière : Guide de bonne pratique d'hygiène.- Paris : GRET ;2005.-103p.

19-CISSE S. A.-Contribution à l'étude de la pasteurisation du lait : faisabilité technique et contrôle de la qualité dans la région de Kolda. Thèse: Méd. Vét : Dakar : 1997 ; 9

20-COIFFIER O. et al., ENTERIOBACTERIACEÆ et Vibrionaceae. (133-166) in : Microbiologie alimentaire : Technique de laboratoire.-Paris : Lavoisier Tec & Doc ; 1997.-1073 p .

21-DECOSTER A. ; Mycobactéries.-[Ressource électronique] Accès internet. URL [http:// anne.decoستر.free.fr/bk/bk.htm](http://anne.decoستر.free.fr/bk/bk.htm) (page consultée le 05/04/2006

22-DIENG M.- Contributions à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché Dakarois Thèse : Méd : Vét : Dakar : 2001 ; 10

23-DROMIGNY E.- Méthode de recherche, de dénombrement et d'identification de Campylobacter. (78 -103) in : Microbiologie alimentaire : Technique de laboratoire.- Lavoisier Tec & Doc. 1997.-1073p.

24-DUBOIS et SMORAGIEWICZ Inhibition de quelques bactéries pathogènes et potentiellement pathogènes par Streptococcus lactis, Streptococcus

thermophilus, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus helveticus*. Le lait, 1982,62 : 681-687.

25-FAO, Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine [Ressource électronique] Accès Internet

URL.http://www.fao.org/documents/show_cdr_head.asp?url_file=/docrep/t4280f/t4280f09...(page consultée le31/10/2005).

26-FAO. Lait et produits laitiers.- Rome : FAO, 1998 et LAE, 2005.

27-FAO : Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.- Rome : FAO, 1992.-205-340.- (Collection FAO, Alimentation et nutrition ;28).

28-GAILLARD J.- *Campylobacter* (151-158) in : Bactériologie : les bactéries des infections humaines.- Paris : Flammarion Médecine – Sciences, 1988. – 660p.

29-GELINAS P.- Répertoire des microorganismes pathogènes transmis par les aliments.- Paris : La fondation des Gouverneurs Edisem, 2001.- 210p.

30-GUIRAUD J. et GALZY P. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires : Paris : éditions de l'usine nouvelle, 1980.-239 p.

31-HAMZA A. Contribution à l'étude de la qualité des laits caillés du Niger.Thèse. Méd. Vét : Dakar : 2000 ; 3

32-KUBUAFOR, D.K. et al., Seroprevalence of brucellosis in cattle and humans in the Akwapim south district of Ghana: public health implication. *Acta Tropica*, 2000, 76 (1), 45-48.

33-LARPENT J.P.-MYCOBACTERIES. (364-370) in : Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire.- Paris : Lavoisier TEC&DOC, 1997.- 1073p.

34-LARPENT J.P.- Aliments fermentés et ferments microbiens. L'information du biotechnicien, 1993,1, (1).

35-LECLERC M. et MOSSEL D. A. M.- Microbiologie, le tube digestif, l'eau et les aliments Paris : Lavoisier, 1989.-371p.

36-MACKENZIE P. et NORVAL R. - Transmission de *Cowdria ruminantium* par *Amblyomma tholloni* .*Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop*, 1980, 33 (3).

37-MONOTE S.E.- Contribution à la détermination de la valeur marchande du lait en poudre commercialisé au Sénégal. Thèse: Pharm: Dakar: 1977; 77.

38-NAKOUNE E. et al., Serological surveillance of brucellosis and Qfever in cattle in the Central African Republic. *Acta Tropica* **92** (2004): p147-151

39-NDIAYE A. ; Contribution à l'étude de l'assurance qualité dans l'industrie laitière : cas de NESTLE-SENEGAL.- Thèse : Méd. Vét : Dakar : 1994 ;17

40-NDIAYE M. Contribution à l'étude comparée de la qualité microbiologique des laits crus, caillés et laits en poudre commercialisés dans la région de Dakar. Thèse : Méd. Vét : Dakar : 1991 ;17

41-NIANG M. et al., Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi* and *Coxiella burnetii* in Mauritania.- *European journal of Epidemiology* 1998, **14**: 817-818.

42-NJASSAP NGABET H. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait fermenté "kossam" commercialisation dans les rues de Yaoundé (Cameroun) Thèse: Méd. Vét : Dakar : 2001 ; 11

43-SEMASAKA G.-Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés commercialisés dans la région de Dakar. Thèse: Méd. Vét : Dakar : 1986 ;6

44-SENEGAL/ Institut Sénégalais de Normalisation.- Produits laitiers – Laits fermentés : norme sénégalaise, NS 03-020, ISN 1990.-5 p.

45-SENEGAL/ Institut Sénégalais de Normalisation.- Produits laitiers – Laits en poudre : norme sénégalaise, NS 03-001.-Dakar : ISN.- 8p.

46-SENEGAL/Ministère de l'élevage -Direction de l'élevage Rapport Annuel.-Dakar : Direl, 2004.-141 p.

47-SENEGAL/Ministère du développement rural Décret n°69-89 du 25.7.1969, réglementant le contrôle du lait et des produits laitiers destinés à la consommation humaine.

48-SEYDI MG.- Contamination des denrées alimentaires d'origines animale (DAOA) incidences sanitaires et économiques. Méd. D'Afr. Noire, 1982, **29** (6) : 387-414.

49-SIMONET M.-Yersinia (127-147) in: Bactériologie : les bactéries des infection humaines.-Paris : Flammarion Médecine – Sciences, 1988. – 660p.
Thèse: Méd. Vét : Dakar : 1991 ;17.

50-Tissot-Dupont H. et al., Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. Am J Epidemiol. 1999, **150** (1):67-74.

51-VERDIER I. et al., [Ressource électronique] Accès internet. URL <http://www.microbe-edu.org/etudiant/staph.html> (page consultée le 03/04/2006).

52- ZUMARRAGA M. et al., Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. J Vet Diagn Invest 17:232–238 (2005).

ANNEXE N° I

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT DANS LA FILIERE ARTISANALE AU SENEGAL

FILIERE ARTISANALE DU SENEGAL

QUESTIONNAIRE TRANSFORMATEUR LAIT CRU/ CAILLE

Date : -----/-----/-----/

Personne interrogée : -----

► **Identification de l'unité de production** (1 lettre identifiant le type de prélèvement + 3 cases identifiant le lieu de prélèvement + numéro de prélèvement)

● Localisation.....

● Statut : individuel familial coopérative

● Année de démarrage _____

● Nombre de collecteurs _____

► **Installations et équipements**

1- Quels types de locaux utilisés ?

réservé à cet usage

réservé à d'autres usages

2- Le sol est t-il cimenté ?

OUI NON

3- Murs cimentés ?

OUI NON

4- Réservoir de collecte du lait est-il en :

inox plastique autres _____

5- Nettoyage et désinfection du matériel ?

5-1 Fréquence pour :

• Marmites

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

• Bols

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

• Cuillères

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

5-2 Quelle eau a t'on utilisée ?

eau de puits eau de forage eau de distribution

5-3 Désinfection de l'eau :

OUI NON

Si oui quel est le désinfectant utilisé ?

eau de javel autres _____

5-4 Utilise-on un détergent ?

OUI NON

5-4-1 Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

6- Nettoyage et désinfection des locaux

6-1 Fréquence

• Sol

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

• Murs

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

6-2 Quelle eau a t'on utilisée ?

eau de puits eau de forage eau de distribution

6-3 Utilisation de désinfectant :

OUI NON

6-3-1 Si oui quel est le désinfectant utilisé ?

eau de javel autres _____

6-4 Utilise-on un détergent ?

OUI NON

6-4-1 Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

7- Alentours de la laiterie

propre sale moyen

8 - Le test à l'alcool est -il effectué ?

OUI NON

9 - Pasteurisation :

Quel est le couple temps/ température pris en compte ?

Température _____ Temps _____

10- Refroidissement

10-1 Le lait est-il couvert au moment du refroidissement

OUI NON

10-2 Température de refroidissement finale connu? OUI NON

Si oui elle est de : _____

11- Conditionnement :

11-1 Nature du conditionnement utilisé ?

pot de récupération pot à usage unique matière plastique inox

11-2 - Le transformateur se lave-t-il les mains avant l'opération ?

OUI NON

11-3 Si oui, avec quelle eau?

eau de distribution eau de puits eau de forage

11-4 Utilise-il un détergent ?

OUI NON

11-4-1- Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

11-5 Le transformateur porte- t – il des gants ?

OUI NON

11-5-1 Si oui, quelle est la fréquence de changement des gants ?

moins d'une fois par jour une fois par jour

deux fois par jour plus

11-6 Le transformateur porte- t – il un masque bucco nasal ?

OUI NON

11-7 Le transformateur porte- t – il une coiffe ?

OUI NON

11-8 Le transformateur porte- t – il une bague ?

OUI NON

11-9 Le transformateur porte- t – il une tenue propre ?

OUI NON

12 - Formation des employés à l'hygiène :

OUI NON

13 - Conservation du lait

chambre froide frigidaire congélateur

14- Quel est l'état du matériel froid ?

bon état douteux état défectueux

► Transformation (lait cru → lait caillé)

15 Ensemencement :

lait caillé de la veille yaourt acheté au marché enzyme

température ambiante

16- Quel type de sucre ajoute-on ?

sec mouillé

QUESTIONNAIRE COLLECTEUR

► **Identification du collecteur**

(1 lettre identifiant le type de prélèvement + identifiant le lieu de prélèvement + numéro du prélèvement)

Date-----/-----/-----/

- Localisation.....
- Localisation.....
- Localisation.....
- Localisation.....

1- Nature du conditionnement utilisé par le collecteur

matière plastique inox autres _____

2- Moyen de transport

Voiture charrette motocyclettes autres

3- Matériel de collecte

3-1 Le matériel de collecte est- il lavé avant la collecte ?

OUI NON

3-2 Avec quelle eau ce matériel est-il lavé ?

eau de puits eau de forage eau distribution

3-3 Utilisation de désinfectant :

OUI NON

Si oui quel est le désinfectant utilisé ?

- eau de javel autres _____

3-4- Utilise-on un détergent ?

OUI NON

Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

4 - Le matériel de collecte est- il lavé après la collecte ?

OUI NON

4-1- Si oui, Avec quelle eau ce matériel est- il lavé ?

eau de puits eau de forage eau de distribution

4-2- Utilise-on un désinfectant :

OUI NON

Si oui quel est le désinfectant utilisé?

eau de javel autres _____

4-3 - Utilise-on un détergent ?

OUI NON

Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

5 – Fréquence de collecte

tous les jours toutes les 48heures après 72 heures autres

6 - Système de stockage au cours du transport :

chambre froide frigidaire congélateur

7- Quel est l'état du matériel froid ?

bon état douteux état défectueux

➤ **Transport du lait**

1 -Heure de collecte.....

2 -Température au départ.....

3 - Heure d'arrivée à l'unité de transformation.....

4- Température à l'arrivée dans l'unité de transformation.....

QUESTIONNAIRE TRANSFORMATEUR LAIT EN POUDRE

Date-----/-----/-----/

Personne interrogée-----

► **Identification du type de produit transformé :**

(1 lettre identifiant le type de produit transformé + identifiant le lieu de prélèvement + numéro du prélèvement)

• Localisation.....

• Statut : individuel familial coopérative

• Année de démarrage _____

► **Information sur le lait en poudre**

1- Le lait en poudre est-il acheté

En gros (sac de 25 kg)

En sachet conditionné hermétiquement

Au détail (reconditionné sachet noué ou vrac)

► **Transformation**

2- Ensemencement

lait caillé de la veille yaourt acheté au marché enzyme

3 - Quel type de sucre ajoute-on ?

sec mouillé

4- Pasteurisation :

Quel est le couple temps/ température pris en compte ?
température _____ temps _____

5- Refroidissement :

5-1- Le lait est-il couvert au moment du refroidissement ?

OUI NON

5-2- Température de refroidissement finale ? _____

6 - Conditionnement

6-1- Nature du conditionnement utilisé ?

pot de récupération pot à usage unique matière plastique inox

6-2- Le transformateur se lave-t-il les mains avant l'opération ?

OUI NON

6-3- Utilise-il un détergent ?

OUI NON

Si oui quel est le détergent utilisé ? savon autres _____

6-4 Le transformateur porte t – il des gants ?

OUI NON

6-4-1 Si oui, quelle est la fréquence de changement des gants ?

moins d'une fois par jour une fois par jour deux fois par jour plus

6-5 Le transformateur porte t – il un masque bucco nasal ?

OUI NON

6-6 Le transformateur porte t – il une coiffe ?

OUI NON

6-7 Le transformateur porte t – il une bague ?

OUI NON

6-8- Le transformateur porte t – il une tenue propre ?

OUI NON

7 - Formation des employés à l'hygiène

OUI NON

8 - Le matériel utilisé est- il en :

inox plastique autres préciser.....

9- Nettoyage et désinfection du matériel ?

9-1 Fréquence

- Marmites

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

- Assiettes

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

- Cuillères

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

9-2 Avec quelle eau ce matériel est-il lavé ?

eau de distribution autres _____

9-3 Utilisation de désinfectant :

OUI NON

Si oui quel est le désinfectant utilisé ?

eau de javel autres _____

9-4 Utilise-on un détergent ?

OUI NON

Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

10- Nettoyage et désinfection des locaux

10-1 Fréquence

- Sol

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

- Murs

pas de nettoyage chaque jour chaque deux jours autres _____

10-2 Quelle eau a t'on utilisée ?

eau de puits eau de forage eau de distribution

10-3 Utilisation de désinfectant :

OUI NON

10-4 Si oui quel est le désinfectant utilisé ?

eau de javel autres _____

10-5 Utilise-on un détergent ?

OUI NON

10-6 Si oui quel est le détergent utilisé ?

savon autres _____

11- Conservation du lait

chambre froide frigidaire congélateur

12- Quel est l'état du matériel froid ?

bon état douteux état défectueux

QUESTIONNAIRE EAU DE TRANSFORMATION DU LAIT EN POUVRE

13- Quelle est l'eau utilisée pour reconstituer le lait ?

eau de distribution (SDE) autres _____

14- l'eau est-elle bouillie avant utilisation ?

OUI NON

15- Cette eau est-elle traitée à l'eau de javel ?

OUI NON

Transport des échantillons (lait cru, lait caillé, lait en poudre, eau) au laboratoire dans une glacière entre + 4 °C et + 8°C

1- Heure de prélèvement du premier échantillon :

2- Température à mi-parcours:

3- Heure à l'arrivée au labo :

4- Température à l'arrivée:

5- Le transport au laboratoire a duré :

1 à 4h 5 à 9 h 10 à 15 h 16 à 24 h >24 h

6- La température de la glacière pendant le transport a t'elle excédé +8°C ?

OUI NON

7- Si oui, pendant quelle durée ?

30mn 1 h 2 h 3 h >3 h

8- Quelle est la température maximum atteinte ?

ANNEXE 2

Révélation par Electrophorèse en champ continu des produits PCR

1. Objet

Ce document explicite la préparation et la conservation des gels, les paramètres d'électrophorèse et les conditions de révélation des produits séparés par l'électrophorèse.

2. Matériel

Pellicule photo
Cones à filtre 10 μ l
Parafilm
Portoirs tubes Eppendorf (paillasse)
Pipette automatique P10
Four micro-ondes

3. Réactifs

Eau distillée stérile
Trizma base
Acide borique
Tampon TBE 10 X
EDTA
Tampon TBE 10 X
Tampon TBE 0,5 X
Bromure d'éthidium (BET)
Marqueur de poids moléculaire

Préparation

- Tampon TBE 10X (pH 8,0)

Tris base	108 g
Acide borique	55 g
EDTA(Na ₂ EDTA,2H ₂ O)	9.3 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

Dissoudre. Ajuster le pH à 8,0. Répartir en flacon à vis. Autoclaver 20 minutes à 110°C. Se conserve à température du laboratoire.

- Tampon TBE 0.5X (pH 8,0)

Ajouter 25ml de Tampon TBE 10X (pH 8,0) dans 475 ml d'eau distillée. Se conserve à température du laboratoire.

- Tampon de charge

- Marqueur de poids moléculaire

Marqueur PM	40 μ l
Tampon TAE 0.5X	10 μ l
Tampon de charge	10 μ l

Conservation à +4°C.

4. Modalités

4.1. Préparation des gels d'agarose pour séparation de fragments d'ADN

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en champ continu. La concentration du gel d'agarose est de 1.5%.

- Peser 1.5 g d'agarose dans un flacon stérile de 250 mL
- Ajouter 100 ml de tampon TBE 0,5 X
- Faire fondre 2 mn dans le four à microondes : 2 X 45 s (la solution doit être transparente)
- Laisser refroidir à environ 60°C
- Ajouter 1 goutte de BET
- Préparer le support gel adéquat dans le système de coulage
- Mélanger délicatement et couler sur le support gel
- Installer immédiatement les peignes adéquats
- Laisser reprendre 15 à 30 minutes en fonction de la dimension du gel
- Enlever les peignes et poser le gel et son support dans la cuve (conservation du gel à + 4°C maximum 3 j dans papier aluminium)
- Remplir la cuve avec du tampon de migration TBE 0,5X. Le niveau du tampon doit être de 5 mm au dessus du niveau du gel

3.2. Dépôt des échantillons

- Sur un morceau de parafilm posé sur du papier d'aluminium, déposer N (N = nbre d'amplifiat à tester) gouttes de 2 μ L de tampon de charge. Mélanger pour chaque amplifiat à tester, 2 μ l de tampon de charge et 8 μ L d'amplifiat. Changer d'embout pour chaque amplifiat. Reprendre la totalité du mélange et le déposer dans un puit selon l'ordre défini à l'avance et noté sur la fiche PCR.
- Prévoir un puits pour le marqueur de taille et y déposer 5 μ l
- Fermer le couvercle de la cuve
- Brancher les électrodes au générateur de tension

3.3. Séparation et révélation des produits d'amplification (PCR)

- Afficher les paramètres choisis pour la migration sur le générateur
- Pour la séparation des produits de PCR multiplex, faire migrer à 120 Volts pendant 30 minutes minimum.
- Après la migration arrêter le générateur, débrancher les électrodes, ouvrir le couvercle, sortir le gel avec le support gel
- Observer sous rayons UV et photographier. Si nécessaire poursuivre la migration jusqu'à l'obtention d'une bonne séparation des fragments attendus pour les témoins positifs :
 - Allumer les UV à 312 nm pour vérifier l'amplification
 - Arrêter les UV et allumer la lumière blanche

CRITERES DE VALIDATION

La réaction est validée dans la mesure où :

- l'échantillon de contrôle positif a une valeur moyenne minimale en DO.450 non corrigée de : 0.400 et
- un rapport minimal de 3 est obtenu entre la DO.450 moyenne corrigée de l'échantillon de contrôle positif et la DO. 450 corrigée de l'échantillon de contrôle négatif.

NB : la DO. 450 corrigée de l'échantillon de contrôle négatif peut être trouvée "négative" ou nulle. Dans ce cas, utiliser la valeur absolue pour la validation.

INTERPRETATION

Calculer, pour chaque échantillon à tester, le pourcentage E/P (%E/P) :

$$\%E/P = (DO.450 \text{ corrigée de l'échantillon à tester} / DO.450 \text{ moyenne corrigée de l'échantillon de contrôle positif}) \times 100$$

Dans la mesure où les valeurs de validation sont obtenues, le statut des laits testés est le suivant :

- Tout échantillon à tester dont %E/P est inférieur ou égal à 45% sera considéré comme issu d'un groupe de bovins ne portant pas d'anticorps spécifiques du LPS de *Brucella abortus*.
- Tout échantillon à tester dont %E/P est compris entre 45 et 55% sera considéré comme douteux. Un second test sera nécessaire pour confirmer le statut de ces échantillons.
- Tout échantillon à tester dont %E/P est supérieur ou égal à 55% sera considéré comme issu d'un groupe de bovins portant des anticorps spécifiques du LPS de *Brucella abortus*.

SIGNIFICATION DES IDEOGRAMMES

* : Modification majeure du mode d'emploi (= modification concernant le « Mode opératoire » ou les « Critères de validation » ou les « Règles d'interprétation »)

/ : Modification mineure du mode d'emploi (conseils, pratiques ...)

BIBLIOGRAPHIE

- Directive C.E.E. 64/432 modifiée le 11 décembre 1984, le 26 juin 1991 et le 21 mars 2002
- Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, page 328-345, 4^{ème} édition 2000, OIE, Paris
- ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988) - Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris

MATERIEL NECESSAIRE A LA REALISATION DES TESTS ET NON FOURNI DANS LE KIT

- 1) Lecteur de microplaques
- 2) Centrifugeuse
- 3) Tubes à centrifuger
- 4) Vortex ou similaire
- 5) Système de lavage de plaques permettant la distribution de 300 µl par cupule
- 6) Micropipettes de précision et multicanaux (la précision requise pour la mesure doit être inférieure ou égale à 10% pour les volumes inférieurs ou égaux à 10µl et à 5% pour tous les autres volumes indiqués)
- 7) Embouls de pipettes à usage unique
- 8) Eau distillée : l'eau utilisée pour la reconstitution des échantillons de contrôle et de la solution de lavage peut être produite par un système de distillation conventionnel ou par tout système performant de purification d'eau (osmose inverse, purification sur résine et charbon actif, ...)
- 9) Couvercles pour plaques, aluminium ou adhésifs.

CONTENU DU KIT ET CONSERVATION

Il est recommandé de travailler avec la totalité des réactifs ramené à : 21°C (± 5°C). Pour cela, il est conseillé de sortir le réactifs de la pièce réfrigérée au moins une heure avant le test (à l'exception du conjugué).

COMPOSANT	QUANTITE	CONSERVATION ET REMARQUES
Microplaques sensibilisées bicupules	2	+5°C (± 3°C) - Si une microplaque n'est pas utilisée en totalité, elle pourra être utilisée ultérieurement, si elle a été refermée immédiatement de façon étanche et conservée à +5°C (± 3°C).
Solution de Lavage Concentrée 20 X	1 flacon de 100 ml	+5°C (± 3°C) - Présente des précipités à +5°C (± 3°C) qui disparaissent rapidement à +21°C (± 5°C), une légère agitation de temps en temps accélère la dissolution des cristaux. - Peut aussi être conservée à +21°C (± 5°C) jusqu'à un mois, les flacons sont refermés de façon étanche, afin d'être immédiatement disponible. - Après dilution, peut être conservée 3 jours à +5°C (± 3°C). - Identique pour tous les kits de l'Institut POURQUIER et peut donc être utilisée indifféremment dans un kit ou dans un autre.
Tampon de dilution I	1 flacon de 120 ml	+5°C (± 3°C)
Echantillon de contrôle positif lyophilisé	1 flacon de 1 ml	+5°C (± 3°C) - Après reconstitution, les échantillons de contrôle doivent être aliquotés et conservés à une température ≤ -16°C. Ils peuvent être congelés et décongelés jusqu'à trois fois sans perte d'activité. Une conservation à +5°C (± 3°C) se traduirait par une augmentation importante des bruits de fond.
Echantillon de contrôle négatif lyophilisé	1 flacon de 1 ml	+5°C (± 3°C) - Après reconstitution, les échantillons de contrôle doivent être aliquotés et conservés à une température ≤ -16°C. Ils peuvent être congelés et décongelés jusqu'à trois fois sans perte d'activité. Une conservation à +5°C (± 3°C) se traduirait par une augmentation importante des bruits de fond.
Conjugué anti IgG de bovins - peroxydase	1 flacon de 0,4 ml	+5°C (± 3°C) - La solution de conjugué dilué peut être conservée jusqu'à 2 heures à +21°C (± 5°C).
Solution de révélation 3 prête à l'emploi (TMB)	1 flacon de 30 ml	+5°C (± 3°C) - Peut être légèrement bécotée à +5°C (± 3°C). Devient incolore à +21°C (± 5°C). - Peut être laissée sur la paillasse à +21°C (± 5°C) d'une utilisation à l'autre jusqu'à une semaine si le flacon est refermé de façon étanche.
Solution d'arrêt (solution H ₂ SO ₄ 0,5 M)	1 flacon de 120 ml	+5°C (± 3°C) - Peut aussi être conservée à +21°C (± 5°C) jusqu'à un mois, si les flacons sont refermés de façon étanche, afin d'être immédiatement disponible.
Mode d'emploi		

Annexe 4

MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

(Formule indiquée en gramme par litre d'eau distillée)

1- EAU Peptonée Tamponnée

Formule :

Peptone	10
Chlorure de sodium	5
Hydrogène-orthophosphate dissodique dodécahydraté	9
Dihydrogène-orthophosphate de potassium	1,5
Eau distillée	1000

2- GELOSE BAIRD-PARKER

Formule :

Peptone	10
Extrait de viande bœuf	4
Extrait de levure	2
Pyruvate de sodium	10
Glycocolle	12
Agar	14
Eau distillée	1000ml

pH : 7,2

Préparation : Ajouter les solutions suivantes

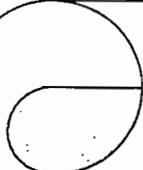
- Tellurite de potassium	1ml
- Emulsion de jaune d'œuf à 10% en eau physiologique	5ml
- Sulfaméthazine	2,5ml

3-GELOSE HEKTOEN

Formule :

Bio-thione	12
Extrait de levure	3
Sels biliaire	9
Lactose	12
Saccharose	12
Salicine	2
Chlorure de sodium	5
Hyposulfite de sodium	5
Citrate de fer ammoniacal	1,5
Bleu de bromothymol	0,064
Fushine acide	0,040

Gélose	13,5
4- Gelose pour numération ou Plate Count Agar (PCA)	
Formule :	
Peptone :	5
Extrait de levure	2,5
Agar	15
Eau distillée	100ml
pH final : 7,2	
5- Bouillon de Rappaport Vassiliadis	
Formule :	
Peptone	4,54
Chlorure de sodium	7,2
Dihydrogeno-phosphate de potassium	1,45
Chlorure de magnesium anhydre	13.4
Vert de malchite oxalate	0,036
pH final : 5,1	
6- Milieu de Mueller-Hinton (gélose)	
Formule :	
Macération de viande de bœuf	300ml
Hydrolysate de caséine	17,5
Agar	10
Amidon	1,5
7- Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (V.R.B.L.)	
Formule :	
Peptone	7
Extrait de levure	5
Sels biliaires	1,5
Lactose	10
Chlorure de sodium	5
Agar	11
Rouge neutre	0,03
Cristal violet†	0,002



SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR

« Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

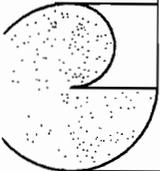
✎ d'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire ;

✎ d'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays ;

✎ de prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire ;

✎ de ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.

Que toute confiance me soit retirée s'il advient que je me parjure. »



RESUME

L'urbanisation en Afrique s'est accompagnée d'un accroissement considérable de la pauvreté, et d'une dégradation de la qualité de vie des populations concernées, avec des conséquences drastiques au double plan de la "nutrition et de la santé".

C'est l'une des raisons pour lesquelles les populations sénégalaises s'orientent plus aujourd'hui vers la consommation du lait. Considéré comme l'un des aliments les plus complets, il continue d'occuper une place prépondérante dans l'alimentation humaine, et on attend de lui ses vertus connues qui en font sa valeur et expliquent son importance.

Cependant, autant le lait est prisé, autant il est délicat et dangereux, car il suffit d'une petite défaillance hygiénique ou technique pour qu'il soit source de plusieurs affections de type : indigestion, diarrhée, dysenterie, hépatite, tuberculose, Brucellose ...etc.

C'est pour apprécier la qualité microbiologique du lait dans la filière artisanale au Sénégal que la présente étude a été menée. Elle a consisté à réaliser des analyses microbiologiques, sérologiques et de biologie moléculaire des échantillons de lait cru, lait caillé, lait en poudre prélevés dans les petites unités de production et de transformation dans 9 régions du Sénégal.

A cet effet, les résultats suivants ont été obtenus :

Sur les 68 unités prélevées, 7 ont été satisfaisantes, et 61 non satisfaisantes

- 90,2 % des échantillons de lait cru et 82,2 % de laits caillés impropres à la consommation
- 50 % de lait en poudre non satisfaisants,
- 19 % des échantillons de lait cru étaient contaminés par *Coxiella burnetii*.
- 2,4 % de lait cru contaminés par *Brucella abortus*.

Il faut nécessairement veiller à l'application des règles d'hygiène de base, et la maîtrise des procédés de transformation dans la filière lait.

De telles actions contribueront à améliorer la qualité sanitaire du lait au Sénégal et surtout à protéger notre santé, gage du mieux vivre.

Mots clés : Lait - filière artisanale - Qualité - microbiologique.

Rodrigue Simonet POUEME NAMEGNI

BP : 102 Bafoussam (CAMEROUN)

TEL : (00237) 937 69 35

Email : st_poueme@yahoo.com