



Université Nangui Abrogoua

*République de Côte d'Ivoire*

*Union-Discipline-Travail*

*Ministère de l'Enseignement Supérieur et*

*de la Recherche Scientifique*



UFR des Sciences et  
Technologies des Aliments

*Année Universitaire*

2012-2013

*Numéro d'ordre*

.....

*Soutenue publiquement*

*Le 12-12-2013*

## THÈSE UNIQUE

pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences et Technologies  
des Aliments de l'Université Nangui Abrogoua

**Spécialité : Microbiologie et biologie moléculaire**

Présentée par

**KOUAME - SINA Sylvie Mireille**

**CONTRIBUTION A LA GESTION DES RISQUES  
DE CONTAMINATION MICROBIENNE ET  
DIVERSITÉ GÉNOTYPIQUE DES ESPÈCES DU  
GENRE *BIFIDOBACTERIUM* ISOLÉES DE LA  
CHAÎNE DE PRODUCTION  
DU LAIT LOCAL A ABIDJAN**

### Commission d'examen

- Président :** Prof. KOUAME Patrice, Professeur Titulaire UNA
- Co-Directeurs de thèse :** Prof. DJE Koffi Marcellin, Professeur Titulaire UNA  
Prof. BONFOH Bassirou, Maître de Recherches CSRS
- Rapporteurs :** Prof. KOUSSEMON Marina, Maître de Conférences UNA  
Prof. KACOU-N'DOUBA Adèle, Professeur Titulaire UFHB
- Examineurs :** Prof. BOHOUA Guichard, Maître de Conférences UNA  
Prof. AHONZO Niamké, Professeur Titulaire UFHB

## *DÉDICACE*

*A mon père Kouamé Lolo et ma mère Mathilde*

Pour leur générosité, leur confiance et leur soutien

*A mes frères David, Franck et ma sœur Chantal*

Avec qui j'ai passé de merveilleux moments

*A mon tendre époux Albéric Sina*

Pour sa patience et son amour

*A mes filles Lindsay et Emeraude*

Pour la joie qu'elles apportent dans ma vie

À toutes les personnes qui ont été à mes côtés dans les bons et les mauvais moments de ma vie.

Je vous aime tous.

## **REMERCIEMENTS**

*Un travail scientifique ne saurait se réduire à une réalisation isolée. Que chacun reçoive ici mes remerciements pour avoir contribué à l'aboutissement de ce projet de recherche.*

*Je tiens d'abord à remercier les autorités de l'Université Nangui Abrogoua et les personnes suivantes :*

### **Le Professeur DJE KOFFI Marcellin,**

Directeur du Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie des Aliments de l'Unité de Formation et de Recherches des Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA), et Directeur de cette thèse. Mon infinie gratitude pour la confiance placée en moi et le paternel soutien dont j'ai bénéficié durant mon 3<sup>ème</sup> cycle universitaire, notamment pour la recherche de financements, les orientations scientifiques et les conseils avisés.

### **Le Professeur BONFOH Bassirou,**

Directeur Général du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS). Mon infinie gratitude, d'une part, pour m'avoir ouvert les portes du CSRS avec différentes sources de financements, offert l'opportunité de participer à cette exaltante aventure qu'est l'Analyse Participative des Risques (APR) à travers le projet « *Safe Food, Fair Food* », et, d'autre part, pour l'intérêt accordé à mon travail et le soutien à la publication de mes résultats. Toute ma reconnaissance pour votre sollicitude, malgré vos nombreuses occupations.

### **Le Professeur DAUBE Georges,**

Directeur du Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires de l'Université de Liège (LMDA). Merci de m'avoir fait confiance spontanément. Toute ma reconnaissance pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires à la réalisation de mon travail au LMDA. Merci également à toute l'équipe du laboratoire, avec une pensée pour le Dr Bernard Taminiou et le Dr Marie-Athénaïs de Schaetzen.

### **Le Professeur DADIE Adjéhi,**

Responsable de la filière microbiologie de l'UFR-STA, qui a suivi mon parcours depuis la licence, et qui a toujours cru en mes capacités et m'a encouragée à persévérer malgré l'adversité.

### **Le Docteur GRACE Delia,**

Investigateur principal du projet « *Safe Food, Fair Food* », qui, depuis ILRI Kenya, a permis les actions de renforcement des capacités nécessaires à la réalisation de cette thèse.

**Le Docteur MAKITA Kohei,**

Coordinateur du projet « *Safe Food, Fair Food* ». Son aide a été précieuse pour la compréhension de l'APR et l'analyse statistique des données. Nonobstant la distance qui nous sépare (Japon-Côte d'Ivoire), son amitié, sa simplicité, sa réactivité, son efficacité ont été constantes dans le suivi de mon travail du début à la fin de ce projet.

**Le Docteur COSTARD Solenne,**

Chercheur associé au Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College (University of London, UK). Ces compétences pédagogiques nous ont permis de mieux cerner le logiciel Model Risk (Vose software) ainsi que les éléments statistiques de l'évaluation stochastique des risques. Merci pour ta participation et ta disponibilité à la rédaction de nos publications scientifiques.

Je souhaite également adresser toute ma reconnaissance au jury de la thèse, Prof. KOUAME Patrice, Prof. DJE Koffi Marcellin, Prof. BONFOH Bassirou, Prof. KOUSSEMON Marina, Prof. KACOU-N'DOUBA Adèle, Prof. BOHOUA Guichard, Prof. AHONZO Niamké, qui ont accepté d'apporter leurs contributions à l'amélioration de la qualité scientifique de cet travail.

Une mention spéciale est adressée au Professeur Benjamin KOUDOU, au Dr. Giovanna RASO (Directrice du Département Environnement et Santé du CSRS), à l'équipe choc du Laboratoire du CSRS (Regina KRABBI, Liliane ZAHUI-IRIÉ, Bassa YOBOUET, Sadikou TOURÉ, Dr.Sylvain TRAORÉ, H. TRAORÉ), au Dr. Yolande AKÉ-ASSI, mon témoin, Dr. Edwige YAPO et à tous les autres membres du groupe de recherche Analyse des risques et Nutrition ainsi qu'à l'ensemble des chercheurs du CSRS et ceux du laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie des Aliments de l'Université Nangui Abrogoua.

Sans oublier les personnes que je n'ai pas pu citer nommément ici...

Cette thèse n'aurait pu exister sans l'appui financier des organismes suivants :

1. Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH dans le cadre du projet « *Safe Food, Fair Food* » à travers l'ILRI et le CSRS,
2. Agence universitaire de la francophonie (AUF) par une bourse de mobilité,
3. International Foundation for Science (IFS, N°E-4866),
4. Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS).

## **TABLE DES MATIÈRES**

<i>Dédicace</i> .....	I
<i>Remerciements</i> .....	II
<i>Table des matières</i> .....	IV
<i>Liste des figures</i> .....	IX
<i>Liste des tableaux</i> .....	X
<i>Liste des photographies</i> .....	XI
<i>Liste des abréviations et sigles</i> .....	XII
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>I- GÉNÉRALITÉS</b>	
<b>1. La filière bovine Ivoirienne</b> .....	7
1.1 Cadre naturel de l'élevage bovin en Côte d'Ivoire.....	7
1.2 Les principaux systèmes de production.....	7
1.3 Les principaux produits animaux.....	9
1.4 Les différentes races du cheptel bovin .....	9
1.5 La filière laitière locale.....	10
<b>2. Le lait de vache et ses caractéristiques</b> .....	14
2.1 La composition du lait de vache.....	14
2.2 Les caractéristiques des cellules somatiques du lait.....	15
2.3 Les contaminants microbiens du lait .....	16
2.3.1 Origine de la contamination.....	16
2.3.2 Les microorganismes responsables d'altération.....	19
2.3.3 Les micro-organismes potentiellement pathogènes.....	20
2.4 Les zoonoses bactériennes.....	23
<b>3. Les microorganismes utilisés en technologie laitière : les bactéries lactiques</b>	25
3.1 Les bactéries lactiques.....	26
3.2 Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocines	27
3.3 Les bactériocines	28

<b>4. Les microorganismes à potentialité probiotique.....</b>	<b>29</b>
4.1 Définition et principaux probiotiques.....	29
4.1.1 Définition.....	29
4.1.2 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé.....	30
4.1.3 Principaux microorganismes à potentiel probiotique.....	30
4.2 Genre <i>Bifidobacterium</i> .....	31
4.2.1 Écosystème gastro-intestinal.....	31
4.2.2 Historique.....	34
4.2.3 Propriétés phénotypiques .....	34
4.2.4 Sensibilité aux antibiotiques.....	35
4.2.5 Pouvoir pathogène.....	36
4.2.6 Propriétés génotypiques.....	36
<b>5. L'analyse des risques.....</b>	<b>38</b>
5.1 Historique.....	38
5.2 Le risque alimentaire : définition et caractéristiques.....	39
5.3 Composantes de l'analyse du risque .....	40
5.3.1 Évaluation du risque ou appréciation du risque.....	41
5.3.2 Gestion du risque.....	45
5.3.3 Communication relative au risque.....	47
5.4 Intégration des outils participatifs à l'analyse des risques .....	47

## **II- MATÉRIEL ET MÉTHODES**

<b>1. Établissement du profil des risques de contamination du lait à travers la description de la filière laitière.....</b>	<b>50</b>
1.1 Zone d'étude.....	50
1.2 Caractérisation du système de production.....	51
1.3 Évaluation des perceptions et pratiques des acteurs de la filière.....	51
<b>2. Évaluation de la qualité du lait de vache produit localement.....</b>	<b>53</b>
2.1 Matériel d'étude.....	53
2.2 Méthodes.....	53

2.2.1	Échantillonnage.....	53
2.2.2	Analyse physico-chimique du lait cru de vache.....	54
2.2.3	Dénombrement des germes de contamination.....	55
<b>3.</b>	<b>Isolement des bifidobactéries et évaluation de leur potentiel</b>	
	<b>antibactérien.....</b>	<b>56</b>
3.1	Matériel d'étude.....	56
3.2	Échantillonnage.....	56
3.3	Isolement des bifidobactéries.....	57
3.4	Identification des espèces de <i>Bifidobacterium</i> .....	58
3.5	Évaluation du pouvoir antibactérien des bifidobactéries.....	61
<b>4.</b>	<b>Évaluation des risques du lait local de contamination du lait local.....</b>	<b>63</b>
4.1	Choix des microorganismes à étudier lors de l'évaluation des risques.....	63
4.2	Identification de la chaîne des valeurs du lait et des pratiques de consommation.....	63
4.3	Évaluation des risques.....	64
4.4	Scenarii de réduction du risque .....	66
<b>5.</b>	<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>68</b>
<b>III</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>1.</b>	<b>Le système de production laitière .....</b>	<b>69</b>
1.1	Caractéristique des éleveurs et de la production laitière.....	69
1.2	Facteurs de risque de contamination du lait à la ferme.....	69
1.3	Les conditions de la vente du lait.....	76
1.4	Les perceptions des acteurs de la filière.....	79
<b>2.</b>	<b>Qualité chimique et microbiologique du lait local.....</b>	<b>83</b>
2.1	Caractéristiques physico-chimique du lait.....	83
2.2	Présence d'inhibiteurs dans le lait.....	84
2.3	Qualité globale du lait.....	84
2.4	Sources de contamination du lait.....	85
2.4.1	Origine de la contamination du lait à la ferme.....	85

2.4.2	Points de contaminations du lait.....	87
2.4.3	Évolution de la charge microbienne du lait de la ferme à la vente.....	87
<b>3.</b>	<b>Évaluation du risque lié à la consommation du lait cru.....</b>	<b>88</b>
3.1	Description de la chaîne de production informelle du lait à Abidjan.....	88
3.2	Habitudes de consommation du lait.....	90
3.3	Évaluation du risque.....	91
3.3.1	Arbre des défaillances des évènements conduisant à une gastro- entérite après la consommation du lait.....	91
3.3.2	Identification du danger.....	93
3.3.3	Évaluation de l'exposition .....	95
3.3.4	Risque de gastro-entérite.....	95
<b>4.</b>	<b>Gestion des risques de consommation du lait.....</b>	<b>97</b>
4.1	Réduction du risque par le contrôle de la qualité du lait.....	97
4.1.1	Simulation de la réduction du risque de contamination au point de vente.....	97
4.1.2	Impact économique.....	98
4.2	Réduction du risque par les campagnes de sensibilisation.....	98
4.3	Réduction du risque par le potentiel d'inhibition des bactéries pathogènes par les bifidobactéries isolées.....	99
<b>5.</b>	<b>Diversité génotypique des espèces de Bifidobactéries.....</b>	<b>100</b>
5.1	Identification moléculaire.....	101
5.2	Séquences consensus du gène hsp60 des Bifidobactéries isolées.....	102
5.3	Profil phylogénique.....	104
5.4	Origine de la contamination du lait par les bifidobactéries.....	106
5.5	Distribution des espèces de <i>Bifidobacterium</i> isolées à différents niveaux de la chaîne de production.....	108

<b>6. La communication du risque de consommation du lait local.....</b>	<b>109</b>
<b>7. Discussion.....</b>	<b>110</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>122</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>125</b>

## ANNEXES

Annexe I : Fiche d'enquête - producteur de lait

Annexe II : Fiche d'enquête marché - producteur de lait

Annexe III : Fiche d'enquête marché - vendeur de lait

Annexe IV : Fiche d'enquête consommation de lait

Annexe V : Procédure du focus group

Annexe VI : Protocole de prélèvement des échantillons

Annexe VII : Protocole de laboratoire

Annexe VIII : Protocole d'isolement et d'identification des bifidobactéries

Annexe IX : Simulations de type Monte Carlo

## PUBLICATIONS TIRÉES DE CETTE THÈSE

**-Kouamé-Sina S.M.**, Bassa A., Dadié A., Makita K., Grace D., Dje M., and Bonfoh B., 2010. Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)*, S (8): 35-42.

**-Kouamé-Sina S.M.**, Dadié A., Makita K., Grace D., Dje M., Taminiou B., Daube G. and Bonfoh B., 2011. Diversity, phylogenetic relationship and antibacterial potential of *Bifidobacterium* species isolated from raw milk production chain in Abidjan (Côte d'Ivoire), *African Journal of Microbiology Research*, 5(21):3394-3403.

**-Kouamé-Sina S.M.**, Kohei Makita, Costard S., Dadié A., Grace D., Dje M., Bonfoh B. 2012. Hazard identification and exposure assessment for bacterial risk assessment of informally marketed milk in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Food and Nutrition Bulletin*, 33(4) :223-234.

## ***LISTE DES FIGURES***

	Page
<b>Figure 1.</b> Morphologie cellulaire de différentes espèces de bifidobactéries.....	35
<b>Figure 2.</b> Schéma général de l'évaluation du risque.....	42
<b>Figure 3.</b> Cadre générique de gestion des risques.....	46
<b>Figure 4.</b> Concept d'analyse participative des risques dans la chaîne de valeur informelle des produits d'origine animale.....	49
<b>Figure 5.</b> Les différentes techniques de recueil de données dans le cadre de la recherche qualitative.....	49
<b>Figure 6.</b> Carte de la zone d'étude avec les sites de production laitière et les marchés informels de vente du lait de vache.....	50
<b>Figure 7.</b> Test F6PPK.....	58
<b>Figure 8.</b> Diagramme descriptif du processus de production, de transport et de vente du lait local à Abidjan.....	75
<b>Figure 9.</b> Qualité du lait cru selon le test de la résazurine.....	85
<b>Figure 10.</b> Log <sub>10</sub> des moyennes des charges des contaminants microbiens des échantillons de l'environnement.....	86
<b>Figure 11.</b> Diagramme présentant la chaîne des valeurs du lait de la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan.....	90
<b>Figure 12.</b> Arbre des défaillances indiquant les événements menant à une gastroentérite après la consommation du lait.....	92
<b>Figure 13.</b> Simulation de la fréquence de contamination du lait cru par les Pathogènes (5000 itérations).....	95
<b>Figure 14.</b> Gel d'agarose 2% présentant le fragment de 217 pb du gène hsp60.....	101
<b>Figure 15.</b> Gel d'agarose 2% présentant le fragment de 1050 pb du gène 16s rDNA ...	101
<b>Figure 16.</b> Liste des séquences consensus du gène hsp60 des espèces de <i>Bifidobacterium</i> de Côte d'Ivoire.....	103
<b>Figure 17.</b> Arbre phylogénétique basé sur la séquence partielle du gène hsp60.....	105

## ***LISTE DES TABLEAUX***

	Page
<b>Tableau I.</b> Constantes physiques du lait de vache.....	14
<b>Tableau II.</b> Bactéries responsables de mammites.....	18
<b>Tableau III.</b> Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques.....	33
<b>Tableau IV.</b> Exemples de dangers qui peuvent être présents dans les aliments.....	40
<b>Tableau V.</b> Les étapes de l'analyse de risque : comparaison des modèles décrits par le Codex Alimentarius et l'OIE.....	41
<b>Tableau VI.</b> Liste des amorces utilisées .....	59
<b>Tableau VII :</b> Liste des souches de référence utilisées et leurs numéros correspondant dans la banque de données GenBank.....	61
<b>Tableau VIII.</b> Microorganismes pathogènes testés.....	62
<b>Tableau IX:</b> Description et distribution des variables et des modèles pour l'évaluation des risques .....	66
<b>Tableau X.</b> Paramètres d'atténuation du risque par des simulations.....	67
<b>Tableau XI.</b> Production moyenne de lait par vache par traite.....	70
<b>Tableau XII.</b> Présence d'autres espèces animales dans l'environnement des fermes bovines.....	70
<b>Tableau XIII.</b> État sanitaire des vaches et des veaux dans les fermes.....	72
<b>Tableau XIV.</b> Conditions d'alimentation des vaches laitières en lactation.....	73
<b>Tableau XV.</b> Conditions de la traite du lait dans les fermes.....	76
<b>Tableau XVI.</b> Caractéristiques de la vente de lait.....	78
<b>Tableau XVII.</b> Présence d'inhibiteurs dans le lait par site.....	84
<b>Tableau XVIII.</b> Prévalence de contaminants microbiens dans les échantillons de l'environnement.....	86
<b>Tableau XIX.</b> Prévalence des contaminants microbiens aux différentes étapes de la chaîne de production.....	87
<b>Tableau XX.</b> Moyennes géométriques (ufc/mL) des germes de contamination du lait	

cru.....	88
<b>Tableau XXI.</b> Estimation de la quantité de lait disponible sur les marchés informels d'Abidjan .....	89
<b>Tableau XXII.</b> Habitudes de consommation du lait .....	91
<b>Tableau XXIII.</b> Prévalence observée de bactéries dans le lait en vente.....	93
<b>Tableau XXIV.</b> Données d'entrée du modèle pour les simulations de Monte Carlo.....	94
<b>Tableau XXV.</b> Les prédictions obtenues après les simulations (5 000 itérations).....	96
<b>Tableau XXVI.</b> Effet du traitement thermique du lait sur la survenue de la maladie....	96
<b>Tableau XXVII.</b> Symptômes de gastro-entérite développé après ingestion du lait cru	97
<b>Tableau XXVIII.</b> Probabilités prédites par simulation après les options de contrôle du lait et les campagnes de sensibilisation.....	98
<b>Tableau XXIX.</b> Potentiel d'inhibition des bifidobactéries vis-à-vis d'une sélection de bactéries pathogènes.....	100
<b>Tableau XXX.</b> Distribution des souches de <i>Bifidobacterium</i> à différents niveaux de la chaîne de production.....	107
<b>Tableau XXXI.</b> Sites d'isolement de bifidobactéries.....	107

## ***LISTE DES PHOTOGRAPHIES***

	Page
<b>Photographie 1 :</b> Déroulement du « focus group » à Lièvre rouge.....	52
<b>Photographie 2 :</b> Fin du « focus group » avec les producteurs de lait de N'Dotré.....	53

## ***LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES***

<b>AFNOR</b>	Association Française de Normalisation
<b>APR</b>	Analyse Participative des Risques
<b>BPF</b>	Bonnes Pratiques de Fabrication
<b>BPH</b>	Bonnes Pratiques d'Hygiène
<b>CAC</b>	<i>Codex Alimentarius</i> Commission
<b>CSRS</b>	Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid/ ADN acide désoxyribonucléique
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation
<b>FIL</b>	Fédération Internationale de la laiterie
<b>FED</b>	Fonds Européen de Développement
<b>FMAT</b>	Flore Mésophile Aérobie Totale
<b>HACCP</b>	Hazards Analysis of Critical Control Point
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>ILRI</b>	International Livestock Research Institute
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer (espace interne transcrite)
<b>LAB</b>	Lactic acid bacteria
<b>mg/mL</b>	milligramme par millilitre

<b>MIPARH</b>	Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques
<b>mM</b>	millimolaire
<b>N</b>	Normalité
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>OIE</b>	Organisation mondiale de la Santé Animale (Office International des Épizooties)
<b>OMC</b>	Organisation Mondiale du Commerce
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>pb</b>	paire de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PIB</b>	Produit Intérieur Brut
<b>SPS</b>	Sanitary and Phytosanitary measures
<b>SODEPRA</b>	Société de Développement des Productions Animales
<b>μM</b>	micromolaire
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TIAC</b>	Toxi-infection alimentaire collective
<b>μg/L</b>	microgramme par litre
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UV</b>	Ultra-violet

# **INTRODUCTION**

Le développement de l'élevage reste en Côte d'Ivoire un objectif pour le gouvernement, mais des importations sont encore nécessaires à la satisfaction de la consommation nationale en produits animaliers (Direction Générale de l'Économie, Ministère de l'Économie et des Finances de la République de Côte d'Ivoire, 2007). La faible production nationale de lait n'a couvert que 11% de la consommation totale de lait en Côte d'Ivoire (Balagtas et *al.*, 2007). L'une des principales contraintes de la filière est la faible production de lait des races locales (Yapi-Gnaoré et *al.*, 1996). La consommation de produits laitiers dépend encore fortement des habitudes alimentaires des peuples en Côte d'Ivoire. Les groupes à tradition pastorale consomment beaucoup de lait frais et caillé. Par contre, au sud de la Côte d'Ivoire comme dans la région côtière, le lait ne fait pas encore partie des habitudes alimentaires. Mais en milieu urbain ivoirien, la consommation du lait et des produits laitiers, est devenue l'une des plus élevées en Afrique subsaharienne (FAO, 1998). Le lait et les produits laitiers de vache, de brebis ou de chèvres constituent une importante source d'infection pour l'homme. Le lait cru ou non pasteurisé peut contenir des bactéries comme *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* et *Listeria* qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire et entraîner de graves problèmes de santé tels que la fièvre, des vomissements, la diarrhée, une insuffisance rénale potentiellement mortelle, des fausses couches et même la mort (Dufour et *al.*, 2005). Si l'ébullition ou la pasteurisation suffisent à détruire la plupart des germes pathogènes du lait, il n'est que rarement bouilli en Côte d'Ivoire. Bien que les traditions culinaires varient d'un groupe ethnique à un autre, le lait est le plus souvent consommé cru ou caillé (Gidel et *al.*, 1974).

En Côte d'Ivoire, comme partout dans le monde, les toxi-infections bactériennes, restent un véritable problème de santé publique. Ce sont des maladies qui peuvent être transmises à l'homme par la consommation de denrées alimentaires contaminées. Les populations particulièrement sensibles sont les enfants à bas âge, les personnes âgées, les femmes enceintes et les personnes au système immunitaire affaibli. Les services officiels de contrôle sanitaire enregistrent une dominance de germes tels que les *Salmonelles*, les *Anaérobies Sulfito -Réducteurs*, les *Clostridium*, les *Staphylocoques*, les *Coliformes*, les levures et les moisissures dans les denrées alimentaires soumises à consommation en Côte d'Ivoire (MINAGRI, 2010). En 2005 des quantités importantes de lait en poudre contaminé par *Salmonella agona* à l'origine de gastro-entérites sévères chez les nourrissons ont été signalées (FAO et OMS, 2005). Au niveau des établissements de restauration collective, les coliformes, les levures et les moisissures constituent l'essentiel des contaminations, tandis que l'on enregistre une contamination non négligeable par les *Salmonelles* ; cela explique la forte

prévalence de certaines maladies comme la fièvre typhoïde (Kouamé et *al.*, 2000 ; Michel et *al.*, 2005). Depuis 1998, la Côte d'Ivoire a adopté la stratégie de surveillance intégrée des maladies et a mis en place un système d'Alerte précoce qui se charge de la surveillance hebdomadaire des maladies transmissibles. Seul le choléra fait l'objet de cette surveillance. Il faudrait envisager l'extension de la surveillance aux autres maladies dont l'origine alimentaire est démontrée (fièvre typhoïde, autres toxi-infections alimentaires).

Pour réduire d'incidence de ces maladies et équilibrer le microbiote intestinal, les bactéries lactiques sont de plus en plus utilisées parcequ'elles produisent des bactériocines qui réduisent la croissance des microorganismes pathogènes tels que *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et des microorganismes de détérioration (Aymerich et *al.*, 2000). Les espèces appartenant au genre *Bifidobacterium* font partie du groupe des bactéries lactiques. Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies Gram positif qui sont prédominants dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux (Biavati et *al.*, 2000 ; Kurokawa et *al.*, 2007). Ces bactéries ont des propriétés probiotiques. Plusieurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte humain ont été attribués à la présence de bifidobactéries dans le côlon (Leahy et *al.*, 2005 ; Picard et *al.*, 2005 ; Lee & O'Sullivan, 2010) ; ainsi, elles deviennent de plus en plus intéressantes pour des applications pharmaceutiques et probiotiques dans les produits laitiers. En effet, les bifidobactéries préviennent la constipation, améliorent la tolérance au lactose réduisent le risque de cancer du côlon, baissent les niveaux de cholestérol sanguin et améliorent la réponse immunitaire (Gourbeyre et *al.*, 2011 ; Kalliomaki et *al.*, 2001 ; Savilahti et *al.*, 2008). De plus elles interviennent dans la résorption des infections intestinales (Lee et *al.*, 2003) en inhibant la croissance de nombreux agents pathogènes (Henriksson & Conway, 2001; Slovakora et *al.*, 2002) et en restaurant la flore intestinale après un traitement antibiotique (Kelleher et *al.*, 2002 ; Penner et *al.*, 2005).

Par ailleurs, certaines bifidobactéries produisent des bactériocines, des acides aminés, des Galacto-oligosaccharides et des vitamines (B1, B3, B9, B2, B8, pyridoxine et B6) (Delcenserie et *al.*, 2002 ; Matteuzzi et *al.*, 1978). Ceci a été à la base du développement de nombreux probiotiques et prebiotiques dits « bifidogènes » (AFSSA, 2005). Les probiotiques peuvent être apportés par les produits alimentaires (produits laitiers fermentés) sous forme de compléments nutritionnels c'est-à-dire lyophilisés, gélules ou sachets. De par leur écologie intestinale, les bifidobactéries n'ont pas pour milieu naturel le lait. Leur présence dans le lait est donc un signe de contamination d'origine fécale (Delcenserie et *al.*, 2002) et peut donc servir de marqueur du niveau d'hygiène de la chaîne de production (Beerens et *al.*, 2000).

La sécurité sanitaire des aliments est devenue une préoccupation politique et sociale majeure en particulier depuis la crise liée à l'épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en 1996 (Borraz et *al.*, 2006). La montée des préoccupations de sécurité alimentaire a suscité dans de nombreux pays, la création d'agences de sécurité sanitaire des aliments qui ont pour rôle la veille sanitaire, l'alerte, l'expertise et la recherche sur les risques sanitaires et nutritionnels des aliments destinés à l'homme et aux animaux. Dans les pays développés, on a rapporté que le pourcentage annuel des personnes souffrant de maladies infectieuses transmises par les aliments atteint 30%, alors que le problème est susceptible d'être bien plus répandu dans les pays en voie de développement (WHO, 2002). Bien que des milliards de personnes souffrent de maladies d'origine alimentaire chaque année, il est difficile d'obtenir des estimations précises de l'incidence de ces maladies, en particulier dans les pays en développement comme la Côte d'Ivoire (WHO, 2002 ; Grace et *al.*, 2008). En Côte d'Ivoire, les personnes présentant des symptômes gastro-intestinaux (Diarrhée, vomissements, crampes abdominales, fièvre) se rendent rarement dans les centres de santé par manque de couverture médicale. Par conséquent, la prévalence des intoxications alimentaires est sous-estimée. Les micro-organismes pathogènes les plus fréquemment rencontrés dans les aliments sont *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Escherichia coli* (Kouamé et *al.*, 2000 ; Michel et *al.*, 2005 ; FAO et OMS, 2005 ; MINAGRI, 2010 ; Koffi-Nevry et *al.*, 2012). Les aliments d'origine animale sont des sources importantes de maladie d'origine alimentaire. Le lait et les produits laitiers provenant des vaches, des moutons et des chèvres peuvent contenir des micro-organismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157:H7*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., et *Staphylococcus aureus* (Johnson et *al.*, 1990 ; Garg et *al.*, 1991). Dans une grande partie de l'Afrique, la production laitière est dominée par le secteur informel à travers de petites exploitations qui ont des pratiques traditionnelles de production. La traite du lait avec les mains sales, le transport et la vente sans chaîne de froid à température ambiante, sont susceptibles de conduire à un lait de qualité hygiénique douteuse. C'est aussi le cas dans les pays limitrophes de la Côte d'Ivoire, où les microorganismes comme *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Enterococcus* contaminent la chaîne de production laitière. En effet, de nombreux auteurs ont rapporté qu'au Burkina Faso (Savadogo et *al.*, 2004 ; Millogo et *al.*, 2008 ; Millogo et *al.*, 2010) , au Mali (Bonfoh et *al.*, 2003 c; Bonfoh et *al.*, 2006) et au Ghana (Donkor et *al.*, 2007), le lait local est de mauvaise qualité hygiénique tout au long de la chaîne de production, de la ferme au marché. En dépit de l'association connue du lait cru avec des maladies infectieuses, certains consommateurs sont persuadés que le lait cru et les produits à base de lait cru sont d'une

meilleure qualité que les produits laitiers pasteurisés (Hegarty et *al.*, 2002), ainsi la consommation de ces produits est favorisée par un certain nombre d'individus pour des raisons culturelles, alimentaires, gustatives et pour des raisons économiques (Desenclos et *al.*, 1996; Headrick et *al.*, 1997). Indépendamment de la rareté des maladies infectieuses transmises par les aliments associées au lait cru, la menace pour la santé humaine de l'ingestion du lait non pasteurisé ou des produits laitiers ne devrait pas être sous-estimée.

Dans les pays en développement, le lait occupe une place importante dans l'alimentation. Sa production et sa commercialisation constituent les moyens de subsistance de nombreuses personnes à faible revenu. Il est donc important d'évaluer les risques pour la santé associés à la production du lait local aux fins d'informer sur les mesures de gestion à prendre pour réduire le fardeau de la maladie, sans compromettre la disponibilité de l'aliment nutritif, des moyens de subsistance des producteurs de lait et le développement économique. L'évaluation quantitative des risques est une méthode rigoureuse et crédible pour évaluer les risques sur la santé. Il y a eu plusieurs études sur l'évaluation quantitative des risques liés aux produits laitiers (Bemrah et *al.*, 1998 ; Bemrah et *al.*, 2003 ; Sanaa & Cerf, 2002 ; Lindqvist et *al.*, 2002), mais cette méthode d'évaluation des risques n'a pas été largement appliquée dans les pays en développement. Le défi des gestionnaires des risques est d'utiliser une approche multidisciplinaire pour identifier les meilleures stratégies de réduction le long de la chaîne alimentaire, de l'incidence des maladies infectieuses transmises par les aliments, particulièrement au niveau de la production primaire, et de mettre en application des programmes appropriés de prévention. La méthode la plus appropriée pour réaliser ce but est l'utilisation du processus d'analyse participatif du risque qui associe les microbes pathogènes des aliments au problème de santé publique.

Des études scientifiques ont montré l'impact favorable des espèces du genre *Bifidobacterium* sur la santé de l'homme. Certaines de ces espèces produisent des composés antibactériens ou bactériocines, véritable arme naturelle grâce à laquelle ces bactéries peuvent éliminer les germes nocifs contenus dans des aliments. L'utilisation des bifidobactéries en alimentation pour la production de substances nutritionnelles, la conservation des aliments et la production de bactériocines pourrait contribuer à réduire les risques de toxi-infections alimentaires dus à la consommation du lait et des produits laitiers en Côte d'Ivoire. Ces propriétés des bifidobactéries constituent un autre moyen de gestion des risques, en plus des autres méthodes (BPH) qui seront associées sur la base des facteurs de risques identifiés.

Les questions de recherche et les hypothèses qui en découlent ont permis de définir les objectifs du présent travail. L'exploitation des propriétés des bifidobactéries peut permettre de

répondre aux exigences de sécurité sanitaire du lait en Côte d'Ivoire, ce qui conduit aux questions suivantes :

- Quelles sont les pratiques à risques des acteurs de production à la vente du lait? Comment sécuriser le lait produit et consommé à Abidjan ?
- Quels sont les risques microbiologiques et chimiques de contamination de lait cru à Abidjan ?
- Quel est, pour le consommateur, le niveau de risque lié aux différents niveaux de contamination du lait cru par les micro-organismes pathogènes ?
- Quelles sont les espèces du genre *Bifidobacterium* présentes dans le lait cru de vache ? Quelles sont parmi ces espèces celles produisant des substances antibactériennes capables d'inhiber les agents pathogènes diarrhéiques ?

De l'ensemble de ces questions, quatre hypothèses ont été formulées. Ce sont les suivantes :

- Les pratiques de production et de commercialisation du lait sont à l'origine de sa mauvaise qualité microbiologique.
- Le lait produit à Abidjan dans le secteur informel contient des germes pathogènes.
- Certaines habitudes de consommation de ce lait représentent un risque pour la santé des consommateurs.
- Le lait local contient des bifidobactéries capables de réduire la charge bactérienne des germes de contamination du lait avec la contribution des bonnes pratiques d'hygiène.

Ainsi les objectifs de ce travail sont les suivants.

- **Objectif général**

L'objectif général de ce travail était de :

Contribuer à la sécurisation du lait produit localement et consommé par les populations à travers une évaluation microbiologique et une gestion intégrée des risques sanitaires.

- **Objectifs spécifiques**

Pour atteindre l'objectif général, trois objectifs spécifiques ont été développés, à savoir :

- Établir le profil des risques liés à la filière laitière à Abidjan à travers la description de la filière et des pratiques.
- Évaluer les risques microbiologiques liés à la consommation du lait cru
- Évaluer le potentiel antibactérien des souches de bifidobactéries isolées vis-à-vis des pathogènes.

# **GÉNÉRALITÉS**

## 1. LA FILIÈRE BOVINE IVOIRIENNE

### 1.1 Cadre naturel de l'élevage bovin en Côte d'Ivoire

La Côte d'Ivoire est située entre 4°30 et 10°30 de latitude nord et 2°30 et 8°30 de longitude ouest, avec une superficie de 322 462 km<sup>2</sup>. Elle est limitée à l'Ouest par le Libéria et la Guinée ; au Nord par le Mali et le Burkina Faso; à l'Est par le Ghana et au Sud par l'Océan Atlantique sur une distance de 550 km (FAO, 2009). Elle avait une population estimée à 21 075 000 en 2009. La Côte d'Ivoire est un pays essentiellement agricole. L'agriculture emploie les 2/3 de la population active et contribue au PIB total pour 34 % et au revenu d'exportation pour 66 % (Anonyme 3, 2003). L'élevage reste encore une activité économique secondaire avec une contribution directe d'environ 4,5 % au PIB agricole et 2 % au PIB total. Il constitue, néanmoins, une activité importante qui concourt à l'amélioration de la sécurité alimentaire, à la diversification et à l'augmentation des revenus des paysans et des éleveurs et à la préservation et à l'amélioration de l'environnement. La production bovine est très fortement régionalisée. Près de 80% des bovins se concentrent au Nord du pays, pour seulement 11% au Centre et 9% au Sud. Le cheptel ivoirien en 2001 était constitué d'environ 1 442 000 bovins, 1 487 000 ovins, 1 162 000 caprins, 346 000 porcins et 31 millions de volailles. En 2004 le cheptel bovin était estimé par la FAO à 1500 000 têtes (FAO, 2006). Le taux de couverture de la consommation en 2001 par la production nationale était de 59% pour les viandes et abats, 100% pour les œufs et de 18% pour le lait et les produits laitiers.

### 1.2 Les principaux systèmes de production

L'élevage ivoirien se partage schématiquement en trois systèmes de production bien différenciés que sont le système traditionnel, le système traditionnel amélioré et le système moderne.

#### 1.2.1 L'élevage traditionnel

L'élevage traditionnel des bovins est pratiqué sous deux formes extensives. L'élevage sédentaire et l'élevage transhumant.

❖ **L'élevage sédentaire** est caractérisé par une conduite collective du troupeau regroupé au sein de parcs villageois et confié à la garde de bouviers d'origine sahélienne. Particulièrement représenté dans la zone des savanes avec des performances zootechniques

médiocres et constitués de troupeaux de petites tailles avec une prédominance des races taurines (Anonyme 3, 2003).

❖ **L'élevage transhumant** est d'origine sahélienne et s'est développée très progressivement en Côte d'Ivoire à partir de 1950. La taille moyenne des troupeaux est de l'ordre de 150 têtes avec un certain nombre d'éleveurs possédant plus de 500 animaux. Sur le plan génétique, les zébus dominant largement malgré une tendance fréquente au métissage par acquisition de génisses de races taurines (Anonyme 3, 2003).

### 1.2.2 L'élevage traditionnel amélioré

Ce système d'élevage, résulte d'une intensification progressive du système traditionnel. L'adoption des améliorations proposées reste conditionnée par la disponibilité régulière des intrants (sanitaires, aliments complémentaires, matériel génétique), la valorisation économique des efforts de l'éleveur au travers de circuits de commercialisation performants et l'accès à un crédit adapté, facteur important de cette première intensification.

Au niveau des bovins, les éleveurs du système amélioré sont beaucoup plus conscients de l'intérêt de l'amélioration génétique. Ces élevages se retrouvent sur l'ensemble du pays avec une plus forte concentration en régions Centre et Centre-Nord. Un système à but de production laitière commence à se développer mais est cependant récent et ne concerne que quelques dizaines d'exploitations (Anonyme 3, 2003).

### 1.2.3 L'élevage moderne

Le système moderne est représenté pour les ruminants, par les ranches, les stations d'État et les grands élevages privés, mais aussi sous des formes plus modestes mises au point par des projets ou relevant d'initiatives privées. Au niveau des ovins, le système moderne surtout représenté par les élevages privés (essentiellement des jeunes installés sur le programme des Fonds Européens de Développement) est assez répandu dans les régions Centre-Nord, Centre et Sud-Est. Les animaux élevés sont issus de la race Djallonké. La taille moyenne des troupeaux est de l'ordre de 50 têtes avec un certain nombre d'éleveurs possédant plus de 400 animaux. L'alimentation est à base de pâturages naturels avec une complémentation alimentaire. Certains élevages, particulièrement sur Abidjan, sont liés par contrat à des sociétés qui structurent ainsi de véritables filières (Anonyme 3, 2003).

### 1.3 Les principaux produits animaux

Les principaux produits d'origine animale issus de l'élevage ivoirien sont destinés à la consommation nationale qu'ils ne satisfont pas. La production totale de viande et abats toutes catégories domestiques confondues (bovins, ovins -caprins, porcins et volailles) est de 45 932 tonnes contre 68 583 tonnes en 2002, soit une régression de 33%, imputable principalement à la crise de 2002 (Anonyme 3, 2008). La valeur bord champ de la production intérieure de viande et abats s'est élevée en 2006 à 61,26 milliards de F CFA, et sa valeur à la consommation de 74,78 milliards de F CFA, soit une valeur ajoutée de 13,52 milliards de F CFA. La valeur marchande bord champ de toutes les productions est estimée à 112,25 milliards de F CFA et leur valeur marchande de 196,38 milliards, soit une valeur ajoutée de 84,13 milliards de F CFA. La baisse de la production totale de viandes et abats est certes imputable à la crise socio-politique mais également aux difficultés techniques de la filière. Il faut déplorer le fait que le marché national soit également tributaire du régime des exportations subventionnées des pays occidentaux. En effet déversées sur les marchés africains à des prix artificiellement bas, ces exportations désorganisent les filières et ruinent les producteurs dans certains secteurs. La Côte d'Ivoire est un pays importateur de viande et de lait. Seule la production d'œufs couvre la consommation nationale à plus de 100% (Anonyme 3, 2003). Seule une partie des peaux est exportée (sous forme tannée ou salée) vers les pays de l'Union Européenne. Le reste est utilisé par l'artisanat local (10%).

### 1.4 Les différentes races du cheptel bovin

Les principales espèces animales élevées en Côte d'Ivoire sont les bovins, les ovins, les caprins, les porcins et les volailles (poules traditionnelles et moderne (chair et ponte). Les asins et les équins sont anecdotiques (Anonyme 3, 2003).

Au niveau des bovins l'on note les:

- races adaptées localement : les races N'dama, Baoulé, Lagunaires
- races d'introduction récente : le zébu

A ces races il faut ajouter les différents croisés : N'damaze (Zébu x N'dama), N'damon (N'dama x Montbéliard), N'damance (N'dama x Abondance).

- races régulièrement importées : les races Holstein, Montbéliard, Brune des Alpes, Tarentaises (Anonyme 3, 2003).

## **1.5 La filière laitière locale**

### **1.5.1 Informations générales sur l'industrie laitière Ivoirienne**

La croissance démographique, la croissance des revenus et l'urbanisation croissante stimulent la demande des aliments d'origine animale, en particulier des produits laitiers dans les pays en développement comme la Côte d'Ivoire. Les ventes de produits laitiers en Côte d'Ivoire étaient estimées à 11,9 milliards de F CFA en 1998 (Ekberg, 2001). Comme de nombreux pays en développement, la Côte d'Ivoire dépend presque entièrement des importations pour satisfaire la demande en produits laitiers. En effet, les produits laitiers représentent le troisième produit alimentaire le plus importé après le riz et le poisson (Gbongue, 2002). En effet, en 2003, environ 200 000 tonnes de produits laitiers ont été importés, comparés à une production nationale estimée à environ 25 000 tonnes (Anonyme 3, 2004). Peu de données existent sur le secteur laitier ivoirien. D'après les estimations du Ministère ivoirien de la Production Animale et des Ressources Halieutiques, la production intérieure de lait représente 11 % de la consommation totale de lait en Côte d'Ivoire. La production nationale a augmentée passant d'environ 17 800 tonnes en 1990 à 25 000 tonnes en 2005. Approximativement 80% de la production totale provient du secteur traditionnel principalement (Anonyme 3, 2004).

### **1.5.2 La production de lait dans le secteur traditionnel**

La production de lait dans le secteur traditionnel se déroule principalement dans les zones rurales, dans la partie nord du pays sous le système pastorale et agro-pastorale. La taille moyenne des troupeaux dans cette région était de 15 vaches en 2002 (Anonyme 3, 2002). Dans cette région, le coton, la noix de cajou et les mangues représentent les plus importantes sources de revenus pour les agriculteurs. L'élevage est couramment utilisé comme puissant fournisseur d'engrais organique pour l'entreprise agricole. Le lait quant à lui, est considéré comme un sous-produit du bétail et surtout consommé dans le ménage agricole (Anonyme 4, 2002). Ce système traditionnel repose principalement sur les races locales avec une production de lait très faible. La production de lait par vache est d'environ un à deux litres de lait par jour pendant les huit mois de lactation. Les vaches sont à sec le reste de l'année.

Dans le système traditionnel, l'excédent de lait (c.-à-d le lait non consommé à la maison) est commercialisé cru ou fermenté aux consommateurs dans les marchés des villages alentours. La commercialisation est assurée soit directement par les agriculteurs ou soit par les commerçants. Dans les deux cas, le lait est livré à pied ou à vélo. Le manque d'équipements de stockage et de transport du lait limite l'extension géographique du marché du lait cru aux consommateurs de proximité. Les perspectives d'élargissement du marché de production du système traditionnel sont limitées par des difficultés de production et de commercialisation. Les défis de la production sont la mauvaise génétique des animaux (faible rendement par vache), les maladies animales et l'accès aux pâturages. Les défis de la commercialisation comprennent les longues distances vers les marchés, le manque d'infrastructures de transport et les mauvaises pratiques d'hygiène du lait. L'accès au capital financier est également un problème pour les agriculteurs qui pourraient investir dans une capacité de production et de marketing accrue pour le lait (Balagtas et *al.*, 2007).

### 1.5.3 Production de lait dans le système moderne, intensif

Le système moderne de production de lait existe auprès des populations des zones urbaines du centre et du sud. L'élevage laitier moderne se développe de plus en plus en zone périurbaine. Les animaux élevés sont des races locales améliorées par croisement et plus rarement des animaux de race pure d'origine européenne. Très peu répandue, la filière laitière moderne contribue pour 15% environ à la production nationale. Les élevages extensifs, sédentaires ou semi-transhumants fournissent les 85% restants (FAO, 2009).

Le secteur laitier moderne utilise des vaches laitières élevées spécifiquement pour la production de lait, avec une production de lait par vache de 15 à 20 litres par jour (Coulibaly 2004). Pour réduire le déficit de la production laitière locale, l'État a défini une politique d'amélioration de la production nationale de lait en favorisant la promotion de l'élevage laitier dans les zones périurbaines à travers des projets intégrés (Eco-fermes laitières de Bouaké, bovin industriel de Korhogo, Banque Africaine de Développement (BAD) Élevage phase II, Projet Laitier Sud) et la formation des jeunes en élevage dans les fermes expérimentales de l'État. Cette promotion de la production laitière est basée sur la production et la distribution de vaches laitières issues de croisements entre les races locales, notamment la N'Dama et les races exotiques laitières (De Rochemonteix & Muscat, 1984 ; Atsé, 1990 ; Leroy et *al.*, 2002). Le projet Eco-fermes lancé en 1986 et soutenu par la Deutsche Gesellschaft für Zusammenarbeit (GTZ), concernait huit installations en situation péri-urbaine et se fixait

l'objectif de promouvoir une production laitière rentable intégrant une meilleure valorisation des sous produits agro-industriels et le maintien de la fertilité des sols (FAO, 1995). Sur Korhogo, la Société de Développement des Productions Animales (SODEPRA) a réalisé plusieurs études sur l'intérêt de la création d'une unité agro-industrielle pour la transformation du lait produit localement. Dans les fermes privées et celles des coopératives commerciales sont intégrées des usines de transformation à petite échelle qui pasteurisent le lait et emballent le lait frais, le lait caillé et le yoghourt. Les produits laitiers ainsi transformés sont ensuite distribués aux consommateurs au détail sur des points de vente.

Le Nord de la Côte d'Ivoire est potentiellement apte à voir naître un projet laitier important. Le retrait ou la frilosité des opérateurs possibles trouvent leur explication dans une conjoncture locale très défavorable. Toutefois, la ceinture laitière qui se met en place à Bouaké (Eco-fermes) et le bassin laitier identifié dans un large rayon autour de Korhogo doivent inciter les responsables locaux ou extérieurs à aller au-delà des études d'identification.

L'élevage laitier est en train de se développer dans la zone forestière tout autour de la capitale économique Abidjan. Une ferme d'application a été installée près d'Abidjan, dans le cadre d'un projet belgo-ivoirien, le Projet laitier Sud (PLS), qui doit fournir des animaux de qualité supérieure à des éleveurs privés démarrant une ferme laitière et former ces derniers aux différentes techniques liées à ce type d'élevage (Thys et *al.*, 2005). Ce projet vise à mettre en place une filière de production laitière performante pour l'approvisionnement d'Abidjan en lait frais.

#### 1.5.4 Les importations laitières

Le marché des produits laitiers ivoirien est dominé par les importations de produits laitiers finis et de lait en poudre qui sont ensuite retraités en Côte d'Ivoire. Quatre-vingt-neuf pour cent de la consommation des produits laitiers est satisfaite par ces importations (Anonyme 3, 2004). La transformation des produits laitiers est dominée par les grandes usines de fabrication qui utilisent le lait en poudre importé comme ingrédient principale à cause de la quantité insuffisante, de la disponibilité incertaine et de la qualité du lait local. Ces grandes usines fabriquent des yaourts, du fromage, du lait concentré, et d'autres produits laitiers, qui sont distribués dans des petits points de vente ainsi que dans les grands supermarchés. Les industriels importent également des produits laitiers finis et fournissent directement les grands supermarchés. Les produits laitiers sont également importés directement par les supermarchés eux-mêmes ou par des importateurs qui vendent dans les supermarchés. Le principal

fournisseur des importations laitières est l'Union Européenne, avec lequel la Côte d'Ivoire maintient un accord commercial préférentiel, et en particulier avec la France par la force des liens historiques, culturels et économiques. Les pays de l'Union européenne fournissent près de 80 % des produits laitiers de la consommation ivoirienne. Parmi ces pays, la France et la Hollande sont les plus gros fournisseurs. Comme beaucoup d'autres pays en Afrique de l'Ouest, la Côte d'Ivoire a un schéma de développement laitier guidé par la sécurité alimentaire. Cette politique appelle des importations laitières pour compléter l'insuffisance de la fourniture domestique (Balagtas et *al.*, 2007).

A partir de l'indépendance dans les années 1960, les importations de produits laitiers se sont fait avec des tarifs nominaux et des quotas non limitatifs. Ces importations de produits laitiers à bas prix ont découragé la production nationale. En 1990, le gouvernement a changé de cap et a pris des mesures pour réglementer les importations afin de promouvoir la production nationale de lait et augmenter les recettes douanières. Cette politique s'est poursuivie au moyen d'instruments tels que les licences d'importation et des droits de douane à l'importation. Le gouvernement a augmenté les droits d'importation pour les produits comme le lait concentré. En outre, au cours des années 1990-1991, le gouvernement a exigé que les importateurs achètent 40 % des produits laitiers à SIALIM (Société ivoirienne de l'alimentation) une entreprise gérée par le gouvernement qui transforme la poudre de lait importée en produits finis tels que le lait concentré, le yaourt, etc (Balagtas et *al.*, 2007).

En dépit des obstacles économiques mises en œuvre par le gouvernement en vue de réglementer les importations de produits laitiers et développer l'industrie nationale, les importations de produits laitiers ont continué à croître et à l'échelle locale la production est restée faible. En 1993, le gouvernement a mis en place des mesures d'urgence pour non seulement développer et moderniser l'industrie laitière locale, mais aussi réduire les importations. Ces programmes reposaient essentiellement sur des programmes visant à améliorer la génétique du cheptel national. Dans ce contexte, de nombreux projets de développement de l'industrie laitière ont été mis en œuvre dans le secteur commercial. Toutefois, les efforts visant à améliorer la performance nationale des vaches laitières ont montré peu de succès jusqu'à présent, en raison de la mauvaise gestion technique et financière des projets (Balagtas et *al.*, 2007).

## 2 LE LAIT DE VACHE ET SES CARACTÉRISTIQUES

### 2.1 La composition du lait de vache

#### 2.1.1 Les caractéristiques physico-chimiques du lait

La définition réglementaire du lait cru est donnée par l'article 2 de la directive CEE 92/46, il s'agit d'un lait non chauffé au-delà de 40°C et n'ayant subi aucun traitement d'effet équivalent (CAC, 2004). Le lait est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en  $\beta$ -carotène de sa matière grasse. Son odeur est discrète et son goût légèrement sucré. Le pH est voisin de la neutralité varie habituellement entre 6,5 et 6,7 (à 20°C) : il est donc très légèrement acide. L'acidité titrable est exprimée en degrés DORNIC, elle correspond à une quantité d'acide lactique que l'on neutraliserait avec de la soude N/9 en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré, de telle sorte qu'1°D équivaldrait à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. . L'acidité titrable du lait doit être comprise entre 15 et 18°D et renseigne sur l'acidité globale qui repose sur l'ensemble des constituants acides et sur la teneur en matière sèche. La densité correspond au rapport de la masse d'un volume de lait à une température donnée sur celle du même volume d'eau à la même température. Celle du lait de vache est généralement comprise entre 1,028 et 1,033. La température de congélation varie entre -0,52 et -0,55°C, selon les conditions zootechniques. Les principales constantes du lait sont reprises au tableau I. Le lait constitue un milieu aqueux caractérisé par trois phases : une émulsion de globules gras (gouttelettes d'huile avec une membrane de lipoprotéines) dans un liquide qui est lui-même est une suspension colloïdale de matières protéiques (d'une part les albumines et les globulines, molécules polymérisées aux propriétés hydrophiles, et d'autre part le caséinate de calcium et le phosphate tricalcique dans un sérum. Ce lactosérum est une solution neutre qui contient principalement du lactose et divers ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ...)) (FAO, 1998).

**Tableau I:** Constantes physiques du lait de vache (Sources Alais, 1984 ; Manuel suisse des denrées alimentaires, 2004)

Critères	Moyennes	Valeurs extrêmes
Masse volumique à 20°C [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]	1031	1028 - 1033
Point de congélation (°C)	-0,525	-0,52 - 0,55
pH à 20°C	6,6	6,6 - 6,8

Le lait contient plus de 100 composants différents dont certains en quantités infimes. On peut regrouper ces divers éléments de telle sorte qu'un litre de lait directement issu de la mamelle se compose globalement de (Wattiaux, 1997) :

- 900-910 g d'eau, quantité qui dépend de celle du lactose ;
- 125-130 g de matière sèche totale qui se répartit en :
  - 35-45 g de matière grasse (40g pour un lait standard)
  - 47-52 g de lactose
  - 31-38 g de matières azotées protéiques, proportion qui peut varier avec la race de vache et la quantité de lipides dans le lait (varient dans le même sens)
  - 0,02-1,2 g d'azote non protéique (urée surtout)
  - 7-7,5 g de cendres (Calcium : 1 à 1,4 g/L ; Phosphore : 0,8 à 1,1 g/L ; Magnésium : 0,12 g/L; Fer : 0,6 mg/L)
  - biocatalyseurs
  - pigments : carotène
  - enzymes : lipase, phosphatase, protéase, xanthine-oxydase, lactoperoxydase
  - vitamines : surtout A, B et D
  - gaz dissous : dioxygène, dioxyde de carbone et diazote.

## 2.2 Les caractéristiques des cellules somatiques du lait

Le lait contient toujours une certaine quantité de cellules, en plus de ses différents composants (eau, lactose, gras, protéines, minéraux et vitamines). Les deux grands types de cellules somatiques rencontrés sont les cellules épithéliales et les leucocytes. Les cellules épithéliales sont des cellules qui tapissent normalement l'intérieur du pis et qui se sont détachées des alvéoles, alors que les leucocytes (c-à-d. globules blancs) sont des cellules du système immunitaire. Même en l'absence d'infection intra-mammaire, plus de 85% des cellules somatiques du lait sont des leucocytes, alors que cette proportion passe à plus de 99% si le quartier doit combattre une infection (Schukken et *al.*, 2003). Le nombre de cellules par ml de lait varie normalement entre 5000 et 10 millions environ, pour un échantillon composite du lait des 4 quartiers d'une vache.

La concentration cellulaire individuelle (CCS) correspond au nombre de cellules somatiques présentes dans un millilitre de lait produit par vache donnée. Sur une mamelle saine aucun signe extérieur d'état pathologique n'est détecté et le lait est exempt d'organismes pathogènes. Le seuil limite permettant de différencier une vache non infectée d'une vache infectée est généralement fixé à 200 000 cellules/mL, la grande majorité des vaches saines auront un CSS en-dessous de 100000 cellules/mL. Dans le cas d'une mammite qui est une inflammation d'un ou plusieurs quartiers quel qu'en soit l'origine, la gravité et le mode évolutif, le nombre de cellules somatiques augmente. Chez les vaches laitières, les mammites à *S. aureus* s'expriment le plus souvent par une élévation du taux de cellules somatiques dans le lait, principalement liée à un afflux des neutrophiles (Van Oostveldt et *al.*, 2001). Dans le cas d'infections de la mamelle, le nombre de germes augmente peu ainsi que le nombre de cellules somatiques sauf dans le cas de mammites cliniques.

### **2.3 Les contaminants microbiens du lait**

Le lait qu'il soit cru ou traité est un excellent milieu de culture pour plusieurs microorganismes avec pour résultante l'altération du produit ou les infections/intoxications chez les consommateurs (Murinda et *al.*, 2004 ; Olivier et *al.*, 2005).

#### 2.3.1 Origine de la contamination

##### *2.3.1.1 Environnement de la traite*

Le lait d'un animal parfaitement sain traité aseptiquement, est normalement dépourvu de micro-organismes. A la sortie de la mamelle, le lait est à la température de l'animal (37°C). 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 (FAO, 1998). Dans le lait, il existe des inhibiteurs naturels qui peuvent agir sur le développement des micro-organismes. Parmi eux, on distingue les systèmes liés à la composition physicochimique du lait (système lactoperoxydase-thiocyanate-peroxyde d'hydrogène, lactoferrine, acides gras libres), et ceux liés à l'état immunitaire de l'animal (production d'anticorps, de cellules). Cependant la traite n'est jamais réalisée dans des conditions aseptiques. Ainsi le lait recueilli se contamine très rapidement en traversant le conduit papillaire puis au contact du matériel de traite. Le nombre de germes est très faible, généralement inférieur à 5000 UFC/mL. Ils proviennent de l'extérieur et pénètrent dans la mamelle par le canal du trayon. Ainsi, hormis les maladies de la mamelle, la contamination du

lait se fait pour l'essentiel au cours des diverses manipulations dont il est l'objet à partir de la traite. Le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté du trayeur, de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (eau de traite, seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (Bonfoh et *al.*, 2003c ; Murinda et *al.*, 2004 ; Olivier et *al.*, 2005 ; Adesiyum et *al.*, 2007).

### 2.3.1.2 Mammites

Les mammites consistent en une inflammation de la glande mammaire, le plus souvent développée en réponse à une infection bactérienne intramammaire. Elles constituent la pathologie la plus fréquente et la plus coûteuse rencontrée en élevage laitier (Seegers et *al.*, 2003). En général, les mammites aiguës sont caractérisées par une importante inflammation de la mamelle (douleur, chaleur, tuméfaction), par une production du lait réduite, et un changement de la composition du lait (modifications macroscopiquement visibles de la quantité et de la qualité de l'aspect du lait). Les signes systémiques qui accompagnent les mammites aiguës sont l'hyperthermie, la dépression, les frissons, l'anorexie, la perte de poids et la mort de la vache dans les cas sévères (Radostits et *al.*, 2007). Les infections subcliniques sont responsables d'environ 80 % de l'ensemble des pertes économiques associées aux mammites, liées à une réduction de la production et de la qualité du lait, ainsi qu'aux coûts de traitements et de préventions (Seegers et *al.*, 2003 ; Shim et *al.*, 2004 ; Petrovski et *al.*, 2006). Les mammites sont généralement des infections mono microbiennes presque exclusivement d'origine infectieuse et dues à dix espèces bactériennes différentes, que l'on classe en bactéries pathogènes majeures et mineures (Dodd & Booth, 2000). Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium pyogenes* et de mycoplasmes (tableau II). Les germes qui prolifèrent dans un quartier peuvent entraîner une mammite clinique (symptomatique), une mammite subclinique (asymptomatique) ou une infection latente. Les mammites d'origine chimique ou traumatique sont exceptionnelles et se compliquent le plus souvent d'une infection mammaire. Le caractère clinique ou non d'une mammite est majoritairement influencé par le genre et l'espèce de la bactérie pathogène (Rainard & Riollet, 2006). Les bactéries coliformes sont souvent associées à des mammites aiguës accompagnées de symptômes cliniques. À

l'opposé, *Staphylococcus aureus*, bien que pouvant induire des mammites cliniques, cause le plus fréquemment des mammites subcliniques. Ces mammites subcliniques à *S. aureus* ont, de plus, tendance à devenir chroniques et à persister durant de longues périodes de temps (Sears & McCarthy, 2003). Le caractère subclinique de ces mammites et la capacité de survie des *S. aureus* à l'intérieur des cellules mammaires compliquent respectivement le diagnostic de terrain et l'isolement de la bactérie en laboratoire (Brouillette et al., 2004 ; Von Eiff et al., 2006). Le traitement consiste soit à l'utilisation des antibiotiques intramammaires, soit à l'utilisation des médicaments systémiques. Lors d'antibiothérapies, les taux de guérison associés aux mammites à *S. aureus* sont généralement faibles (Brouillette et al., 2004).

Enfin, bien que de nombreuses études vaccinales aient mis en évidence l'induction d'une réponse humorale, la majorité des vaccins ne permet pas, à ce jour, de prévenir l'infection de la glande mammaire (Middleton, 2008).

**Tableau II** : Bactéries responsables de mammites (Source : Poutrel, 1985)

Micro-organismes	Période de lactation		Expression clinique		Transfert pendant la traite	Persistance des infections
	Lactation	Tarissement	Sub-clinique	Clinique		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+	+++	+	+++	+++
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	+	+++	+++	+++	+++
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	++	++	+++	+	+	+++
<i>Streptococcus uberis</i>	++	+++	++	+++	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	++	+	+	+++	+	+
<i>Escherichia coli</i>	++	+++	+	+++	+	+
<i>Pseudomonas</i>	++	+	+++	+	+	
<i>Corynebacterium pyogènes</i>	+	+++	+	+++	++	+++
Mycoplasmes	+++	+	+	+++	+++	++

+ : faible présence      ++ : présence moyenne      +++ : présence importante

### 2.3.2 Les microorganismes responsables d'altération

La détérioration microbienne, une des principales causes de la perte des aliments dans le monde entier, peut affecter des produits traités thermiquement, y compris ceux qui sont stockés sous réfrigération (Huis & Veld, 1996.). L'extension de la réfrigération a certes amélioré la qualité et la durée de vie microbiologique du lait. Toutefois, ce type de conservation est responsable de la sélection de la flore psychrotrophe. Ce sont les microorganismes qui ont la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7 °C, indépendamment de leur température optimale de croissance (Cousin et *al.*, 2001). En général, dans le lait, c'est le genre *Pseudomonas* qui domine. Dans le lait refroidi, cette flore peut devenir la flore dominante, notamment quand le le lait n'est pas récolté dans d'excellentes conditions hygiéniques et qu'il est maintenu plus de 24 à 48 heures dans les conditions habituelles de réfrigération (+3 à +4 °C). La plupart des bactéries psychrotrophes sont facilement détruites au cours de la pasteurisation et de la stérilisation UHT; cependant, leurs enzymes extracellulaires résistent à la chaleur et causent la détérioration et la pourriture des produits laitiers pendant le stockage à froid (Koka & Weimer, 2001; Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007). *Pseudomonas fluorescens* est l'une des plus importantes bactéries psychrotrophes responsables des saveurs désagréables des produits laitiers en raison de sa métalloprotéase caséinolytique extracellulaire (Dufour et *al.*, 2008).

La détérioration des aliments due aux bactéries psychrotolérantes non sporulées se produit généralement à cause de chauffage inadéquat ou de contamination post-pasteurisation, qui peut être éliminés par l'amélioration de l'assainissement et des corrections dans les procédures de pasteurisation (Dogan & Boor, 2003). A l'inverse, les bactéries Gram-positif psychrotolérantes sporulées ont le potentiel pour survivre dans les régimes de pasteurisation conventionnelle, tels que la pasteurisation Haute température courte durée (HTST) et la basse température longue durée (LTLT), et peuvent se développer pendant le stockage réfrigéré. Certaines bactéries produisent des protéases (Ageitos et *al.*, 2007 ; Dutt et *al.*, 2009), qui entraînent des flaveurs atypiques et le caillage du produit final. Les genres *Bacillus* et *Paenibacillus* ont été identifiés comme dominants des genres des bactéries Gram-positif sporulées dans les environnements des fermes laitières, les installations de traitement et des laits pasteurisés (Huck et *al.*, 2007a ; Huck et *al.*, 2007b ; Huck et *al.*, 2008 ; Ranieri & Boor, 2010). Les *Bacillus* spp. sont détectés principalement au début de la conservation du lait pasteurisé par contre les *Paenibacillus* sont prédominantes à la fin de la conservation (Ranieri & Boor, 2009 ; Ranieri & Boor, 2010). Par conséquent, en excluant la contamination post-

pasteurisation par les bactéries Gram négatif, *Paenibacillus* spp. est probablement la bactérie psychrotolérante prédominante dans le lait liquide pasteurisé et réfrigéré (Ranieri & Boor, 2010). En ce qui concerne la flore thermorésistante leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé. L'ensilage est considéré comme la principale source de contamination du lait par les spores de *Clostridium tyrobutyricum*, une bactérie causant des défauts des fromages (Vissers et al., 2007).

Pour les levures et moisissures, elles se manifestent dans le fromage et peu dans le lait. Ainsi, *Mucor* est responsable de l'accident dit « poil de chat » principalement en fromage à pâte molle (Camembert), se caractérisant par un défaut d'aspect des fromages, et par l'apparition de mauvais goûts (Leyral & Vierling, 2007).

### 2.3.3 Les microorganismes potentiellement pathogènes

Les germes pathogènes auxquels on accorde une importance particulière, en raison de la gravité ou de la fréquence des risques qu'ils présentent sont cités ci-dessous :

#### 2.3.3.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est le micro-organisme pathogène le plus souvent incriminé dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) par le lait et les produits laitiers. L'intoxication résulte de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites dans les aliments par des souches de *S. aureus* productrices de SE (Derzelle et al., 2009). Elle déclenche des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête voire des conséquences plus graves chez les jeunes enfants, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. La contamination du lait cru à la production est due à la flore présente dans la mamelle en cas d'infection, de la flore de contamination apportée par le milieu extérieur au cours des différentes manipulations (Brouillette et al., 2004 ; Von Eiff et al., 2006). Si le lait cru reste la principale source de contamination des produits laitiers en staphylocoques, il faut préciser que la pasteurisation détruit facilement ces bactéries mais pas l'entérotoxine produite dans le lait.

#### 2.3.3.2 *Les Streptocoques*

Le genre *Enterococcus* comprend une vingtaine d'espèces qui se retrouvent dans différents habitats et chez différents hôtes. On les retrouve souvent dans le tractus gastro-intestinal des

humains et de plusieurs animaux ; *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain (Edberg *et al.*, 2000 ; Hancock & Gilmore, 2000). *Streptococcus agalactiae*, bactérie pathogène invasive, est la principale cause de la septicémie, de méningite et de pneumonie chez les nouveau-nés. *Streptococcus agalactiae* est également l'un des principaux agents pathogènes qui peut causer la mammite dans les troupeaux laitiers (Trijbel-Smeulders *et al.*, 2003; Chiang *et al.*, 2008). Fréquemment on y trouve aussi *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* (Ericsson *et al.*, 2009).

#### 2.3.3.3 *Listeria monocytogenes*

La présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru et le lait en vrac a été rapportée par plusieurs auteurs (Moshtaghi & Mohamadpour, 2007 ; Van Kessel *et al.*, 2004). *L. monocytogenes* est une bactérie saprophyte à Gram positif, largement répandue dans la nature. Cette bactérie responsable d'infections sporadiques sévères chez l'homme et les animaux est invasive, capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central (méningo-encéphalites). La listériose est une infection alimentaire due à *Listeria monocytogenes*. Chez l'adulte, elle se manifeste principalement par une septicémie ou une infection du système nerveux central (méningite ou méningo-encéphalite). Chez la femme enceinte, elle peut provoquer un avortement, un accouchement prématuré ou une infection néonatale. La listériose touche, principalement dans les pays industrialisés, les populations à risque comme les femmes enceintes et leurs nouveau-nés, les personnes âgées et les personnes dont les défenses immunitaires sont perturbées, à la suite d'un traitement ou d'une maladie (Van Kessel *et al.*, 2004). Les produits laitiers les plus fréquemment contaminés par *Listeria monocytogenes* sont les fromages à pâte molle et au lait cru.

#### 2.3.3.4 *Les salmonelles*

*Salmonella* est une bactérie naturellement présente dans l'intestin des animaux (en particulier chez les volailles et les porcs), des oiseaux, des reptiles, de certains animaux de compagnie et de certaines personnes. Elle est également présente dans l'environnement et peut contaminer le lait à la production à la ferme (Anonyme 5, 2000 ; Van Kessel *et al.*, 2004). Les personnes qui consomment du lait contaminé par *Salmonella* sont susceptibles de contracter la salmonellose (De Buyser *et al.*, 2001). Comme dans le cas d'autres toxi-infections alimentaires (Streit *et al.*, 2006), les symptômes de la salmonellose ressemblent à ceux de la grippe. Ils se manifestent habituellement de 12 à 72 heures après l'ingestion d'aliments contaminés et durent généralement jusqu'à sept jours. La plupart des gens s'en remettent sans

traitement. Les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes dont le système immunitaire est affaibli sont les plus à risque de développer des complications graves comme la septicémie. Des épidémies de fièvre typhoïde et paratyphoïde ont pour origine la consommation de lait, crème, beurre, crème glacée, etc., n'ayant pas subi de traitement d'assainissement ou qui ont été recontaminés.

#### 2.3.3.5 Les coliformes totaux

Les coliformes totaux sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale. Les coliformes totaux sont définis comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 35°C afin de produire des colonies rouges avec reflet métallique sur un milieu gélosé approprié (Archibald, 2000 ; Edberg *et al.*, 2000). Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia*. Des coliformes banals absorbés en quantité massive (1 million à 1 milliard de germes) peuvent déclencher des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements et diarrhée), habituellement de courte durée. Mais la presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé (Edberg *et al.*, 2000), à l'exception de certaines souches d'*Escherichia coli* ainsi que de rares bactéries pathogènes opportunistes.

*Escherichia coli* fait partie du groupe des coliformes totaux et constitue le seul membre de ce groupe que l'on trouve exclusivement dans les matières fécales des humains et des animaux. Sa présence dans le lait indique non seulement une contamination récente par des matières fécales, mais aussi la présence possible de bactéries, virus et protozoaires pathogènes (Ericsson *et al.*, 2009). Les *E. coli*, dont certaines souches sont entéropathogènes (*E. coli* O157H7), peuvent être responsables de graves toxi-infections et d'une insuffisance rénale, voire la mort suite à la consommation de lait ou de produits laitiers infectés.

Outre les bactéries citées, on retrouve dans les produits laitiers, *Enterobacter sakazakii*. Il a été signalé dans la méningite, la septicémie néonatale et l'entérocolite (Bar-Oz *et al.*, 2001). La contamination de la poudre des préparations pour nourrissons par *Enterobacter sakazakii* a été soupçonnée être la cause de certaines épidémies chez les nourrissons (Chen *et al.*, 2010).

Le lait cru peut contenir une large gamme de bactéries à Gram négatif (Lafarge et *al.*, 2004) retrouvée à des niveaux de population relativement élevés (jusqu'à  $10^5$  ufc/mL) (Ercolini et *al.*, 2009; Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006). Le nombre élevé d'Enterobacteriaceae, est considéré comme représentatif de la mauvaise qualité hygiénique du processus de traite du lait et de fabrication des fromages mais le niveau de risque de la plupart des maladies d'origine alimentaire due aux bactéries à Gram négatif est mal documenté. Les Enterobacteriaceae peuvent produire des amines biogènes dans le fromage qui peuvent être préjudiciables à la santé des consommateurs (Marino et *al.*, 2000; Martuscelli et *al.*, 2005). Les fromages associés à des souches de *Citrobacter freundii*, de *Hafnia alvei*, de *Morganella morganii*, de *Klebsiella oxytoca*, de *Enterobacter* sp. et de *Serratia liquefaciens* ont été trouvés à produire des quantités significatives d'amines biogènes *in vitro* (Coton et *al.*, 2012; Marino et *al.*, 2000; Pattono et *al.*, 2008).

## 2.4 Les zoonoses bactériennes

Les zoonoses, maladies et/ou infections transmissibles naturellement de l'animal, domestique ou sauvage, à l'homme et vice-versa (Toma, 2004) provoquent la mort de 2,2 millions de personnes et la maladie de 2,4 milliards de personnes chaque année dans le monde. Elles représentent 60 % des maladies infectieuses humaines et 75 % des maladies émergentes (Grace et *al.*, 2012). Elles se concentrent dans les pays d'Asie et d'Afrique à revenu faible ou moyen. Mais les menaces de pandémie pèsent sur toute la planète.

Les laits de vache, de chèvre et d'autres espèces sont des hôtes potentiels et sont souvent contaminés par *Brucella* et *Mycobacterium* dans les pays où il n'a pas été effectué de sérieuses campagnes d'éradication (Toma, 2004).

### 2.4.1 La brucellose

La brucellose est un des exemples classiques de zoonose transmise par le lait. C'est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme et due à des cocobacilles immobiles, Gram négatif appartenant au genre *Brucella*. Les trois principales espèces de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) peuvent contaminer l'homme et être excrétées dans le lait des animaux infectés. Chez l'homme la maladie se manifeste par un tableau de fièvre sudoro-algique (fièvre ondulante, arthralgies, céphalées, myalgies et sueurs nocturnes abondantes) à la phase de septicémie (Blétry et *al.*, 2009).

Chez l'animal, les troubles de la fertilité dominent le tableau clinique avec des répercussions économiques considérables. Connue depuis de nombreuses années en Côte d'Ivoire, cette

maladie du bétail y est considérée comme une dominante pathologique (Angba et al., 1987). La contamination humaine est d'origine animale. Elle est professionnelle (éleveurs, bouchers) et/ou alimentaire (lait et fromage non pasteurisé). La transmission se réalise par inhalation accidentelle ou par contact des excoriations cutanées ou de la conjonctivite et par manipulation des viandes, carcasses ou avortons. Le lait de vache, de brebis ou de chèvre constituent une importante source d'infection pour l'homme. Chez les animaux atteints de brucellose, il y a excrétion continue ou intermittente des *Brucella* dans le lait lors des lactations successives. Chez les animaux, la brucellose bovine, essentiellement due à *Brucella abortus* reste la plus répandue en Afrique (McDermott & Arimi, 2002). En Côte d'Ivoire, la prévalence de la brucellose bovine, impose une grande vigilance sur les procédés de production du lait local. Elle était en 2004 dans la zone forestière périurbaine d'Abidjan, de 3,6% dans les fermes laitières (Thys et al., 2005). La consommation de produits laitiers de mauvaise qualité peut mettre en danger la santé des consommateurs et même causer des problèmes de santé publique.

#### 2.4.2 La tuberculose

La tuberculose est une maladie essentiellement respiratoire et la transmission de l'infection se fait principalement par la voie aéroportée. En 2010, l'incidence mondiale de la tuberculose était de 8,8 millions de cas avec 1,1 millions de décès chez les personnes séronégatives (WHO, 2011). En 2009, la plupart des cas ont été constatés dans la région africaine, de l'Asie du Sud-est et du Pacifique occidental, avec des taux de 35 %, 30% et 20% respectivement (WHO, 2010). Chez les mammifères, la tuberculose est due à un groupe de microorganismes incluant le complexe *Mycobacterium tuberculosis*, composé de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* et *M. africanum*. La tuberculose due à *M. bovis* se distribue dans le monde entier et affecte de nombreux vertébrés y compris l'homme. Les bovins, les chèvres et les porcs sont les plus sensibles alors que les moutons et les chevaux montrent une résistance naturelle élevée (Radostits et al., 2000; Thoen et al., 2006). Dans les pays industrialisés, les programmes de lutte et d'élimination, de concert avec la pasteurisation du lait, ont considérablement réduit l'incidence des maladies causées par *M. bovis* dans le bétail et chez les humains. Cependant dans les pays en développement, la tuberculose animale est largement distribuée parce que les activités de surveillance et de contrôle sont souvent insuffisantes ; ce qui est la cause de pertes économiques importantes. La fréquence de la tuberculose bovine chez l'homme dépend donc de l'atteinte du bétail et des quantités de lait cru ou insuffisamment thermo-traité consommé par la population (Shitaye et al., 2007). Si les

bacilles tuberculeux du lait peuvent provenir du milieu (fumier, poussière, etc.), ils viennent des pis infectés, bien que l'on ait montré qu'ils peuvent passer du sang dans le lait sans que le pis perde son aspect normal. La contamination se fait par l'animal ou par l'homme, ce dernier pouvant avoir contaminé l'animal et réciproquement.

#### 2.3.4 Les zoonoses entériques

Les zoonoses sont divisées selon leur symptomatologie. On distingue ainsi les zoonoses entériques des zoonoses non entériques. Pour les zoonoses présentant des symptômes entériques, la pénétration de l'agent pathogène dans l'organisme se fait généralement par ingestion (ingestion d'eau ou d'aliment contaminé, contact entre des mains contaminées et la bouche). Les maladies suivantes sont des exemples de zoonoses entériques : salmonellose, listeriose, campylobacteriose, cryptosporidiose, giardiose ou les infections par des *Escherichia coli* vérocytotoxinogènes. La présentation clinique la plus commune prend la forme de symptômes gastro-intestinaux qui vont de léger (les gens continuent d'aller travailler) jusqu'à la diarrhée grave, des vomissements suivis de déshydratation et même d'une hospitalisation. Cependant, même si la diarrhée est légère, le patient est susceptible d'excréter le germe dans ses selles et le transmettre à d'autres personnes via les mains, les aliments manipulés et même les objets. Le risque zoonotique lié à la contamination du lait par certains germes fait l'objet de préoccupations de santé publique (Bradley, 2002 ; Seegers et *al.*, 1997). En effet, le lait « mammiteux » peut être vecteur d'agents responsables de toxoinfections alimentaires (salmonellose, listériose, etc.). De fait, en l'absence de pasteurisation, des germes pathogènes pour l'Homme provenant de quartiers infectés peuvent contaminer les produits laitiers (Bradley, 2002).

### **3 LES MICROORGANISMES UTILISÉS EN TECHNOLOGIE LAITIÈRE : LES BACTERIES LACTIQUES**

Les populations microbiennes qui contaminent le lait cru peuvent inclure des bactéries à potentiel technologique telles que bactéries lactiques qui sont fondamentales si le lait est utilisé pour la fabrication de fromages (Coppola et *al.*, 2008). Dans l'industrie laitière, de multiples microorganismes sont utilisés comme ferments dans la production de yogourts, de fromage, de crème et d'autres produits laitiers fermentés.

### 3.1 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique qui génère une ou deux molécules d'ATP, en fonction de la voie métabolique homofermentaire (seul acide lactique) ou hétérofermentaire (l'acide lactique en mélange avec d'autres produits comme le CO<sub>2</sub>, l'acide acétique, l'éthanol (Stiles et *al.*, 1997).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes : elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme les produits laitiers, la viande, les végétaux, les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et *al.*, 1997), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Klaenhammer et *al.*, 2005). Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Ce sont des bactéries à Gram positif et qui peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en coques. Elles sont principalement utilisées en tant que starter dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Abee, 1995 ; Hugenholtz & Kleerebezem, 1999). En effet, elles ont une grande importance en laiterie et sont utilisées pour l'acidification du lait. Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (starter culture) par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers (Gálvez et *al.*, 2011). Elles ont pour rôles essentiels d'acidifier le lait et de participer à la formation du goût (protéolyse, production d'arômes) et de la texture des produits laitiers (fromage, beurre, yaourt, lait fermenté) (Labioui et *al.*, 2005).

Aussi, les bactéries lactiques sont à l'origine de la fermentation utilisée pour la préparation de boissons à partir de plantes (boza, cidre, ...). Parmi elles, on distingue des espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* (Gálvez et *al.*, 2011).

### 3.2 Utilisation des bactéries lactiques productrices de bactériocines

Grâce à leur propriétés d'acidification et de production de polysaccharides, les bactéries lactiques ont souvent été utilisées en co-cultures pour initier et/ ou améliorer la fermentation de nombreux aliments comme la choucroute, les saucisses ou les olives vertes (Settanni & Corsetti, 2008). Cependant, une des caractéristiques des bactéries lactiques qui leur permet de se placer comme bio-conservateur est leur production de molécules antimicrobiennes (Callewaert & De Vuyst, 2000 ; Settanni et Corsetti, 2008). La production de bactériocine *in situ* offre de nombreux avantages comparée à la production de bactériocine *ex situ*, comme le coût ou l'augmentation de la compétition avec la microflore résidente augmentant ainsi l'inhibition de croissance des bactéries pathogènes (Holzapfel, 2002). D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques comme l'augmentation de valeurs nutritionnelles des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini (Gálvez et al., 2011).

Les bactéries productrices sont aussi utilisées comme cultures bio-protectrices dans les aliments non fermentés dans la mesure où elles ne présentent aucun effet négatif sur le produit fini. De nombreuses souches bactériennes productrices de bactériocines sont actuellement utilisées dans les produits alimentaires fermentés, tels que les produits laitiers, les viandes, les poissons ou les légumes. Les souches bactériennes du genre *Lactococcus* sont les bactéries productrices de bactériocines les plus utilisées. La souche bactérienne productrice de la nisine, *Lc. lactis*, est souvent utilisée lors de la fermentation de fromages comme le Manchego ou le Camembert en raison de ses propriétés antibactériennes dirigées contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (Gálvez et al., 2008). Les souches productrices de nisine Z sont aussi utilisées pour limiter les gaz produits lors de la fermentation, qui sont le plus souvent dus à une surcroissance de spores de *Clostridium* et en particulier de *Clostridium tyrobutyricum*. La souche productrice de lacticine 3147 est aussi utilisée pour le contrôle de la prolifération de *Listeria monocytogenes* dans les aliments tels que les fromages fabriqués à partir du lait écrémé (O'Sullivan et al., 2006).

Du fait de leur robustesse, leur présence naturelle dans différents produits alimentaires et leur production de nombreuses bactériocines, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* productrices de bactériocines sont largement utilisées comme adjuvants (Franz et al.,

2007). Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* productrices de bactériocines ne sont pas adaptées à la fabrication des produits laitiers fermentés de par leur manque ou leur lenteur de fermentation du lactose (Papagianni & Anastasiadou, 2009). En revanche, la souche *Pediococcus acidilactici* productrice de pédiocine PA-1/ AcH s'est révélée être responsable de la bonne conservation de la viande en diminuant les populations de *Listeria monocytogenes* et de *Clostridium perfringens* (Rodríguez *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques sont, de loin, la catégorie de microorganismes la plus utilisée dans la production de produits alimentaires contribuant ainsi à la texture et au goût des produits fermentés. Par ailleurs, la production par ces bactéries de métabolites tels que les peptides antimicrobiens et l'acide lactique, permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et d'assurer ainsi une bonne conservation des aliments (Pot, 2008).

### 3.3 Les bactériocines

Les bactériocines sont définies comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Klaenhammer, 1988). Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varient considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et de leur mode d'action (Klaenhammer, 1988). Toutes les bactériocines produites par des bactéries lactiques décrites jusqu'à présent ont une activité dirigée contre les bactéries Gram+. Aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques avec une activité contre des bactéries Gram- n'a été décrite, la membrane externe des bactéries Gram- ne permettant pas aux bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu & Thonart, 2009).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont réparties en quatre classes, comme proposé par Klaenhammer (1993). Ces quatre classes sont :

**-Classe I :** Les lantibiotiques : peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés posttraductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la -méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine aminés (McAuliffe *et al.*, 2001 ; Twomey *et al.*, 2002).

**-Classe II :** Peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Elles ont toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*.

**-Classe III :** Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques.

Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lactobacillus helveticus* A, l'enterolysin A produite par *Enterococcus faecium*, la zoocin A produite par *Streptococcus zooepidemicus* et la millericin B produite par *Streptococcus milleri* (Nilsen et al., 2003 ; Papagianni, 2003 ; Nigutova et al., 2007).

**-Classe IV :** Peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a été décrite.

## 4 LES MICROORGANISMES À POTENTIALITÉ PROBIOTIQUE

### 4.1 Définition et principaux probiotiques

#### 4.1.1 Définition

La notion de "probiotique" a été développée grâce aux travaux d'Elie Metchnikoff (1907) qui avait constaté que les paysans bulgares, grands consommateurs de laits fermentés, vivaient très vieux et en bonne santé. Ainsi, Metchnikoff avait proposé l'ingestion de bactéries vivantes, particulièrement des bactéries lactiques, pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, et donc augmenter l'espérance de vie (Gournier-Château et al., 1994). Le terme probiotique dérive des deux mots grecs "pros" et "bios" qui signifient littéralement "pour la vie" contrairement au terme antibiotique signifiant "contre la vie". Ce terme a été introduit pour la première fois par Ferdinand Vergin (Vergin, 1954) pour décrire des substances produites par un microorganisme et stimulant la croissance d'autres microorganismes.

Enfin, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par la FAO et l'OMS en 2002, les probiotiques sont « des microorganismes vivants administrés en quantités adéquates et qui sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ». De façon plus spécifique, pour qu'un organisme soit considéré comme étant potentiellement probiotique il ne doit présenter ni toxicité ni pathogénie et présenter les caractéristiques qui suivent. Il doit être un habitant naturel de l'intestin, être capable de coloniser le milieu intestinal, persister et s'y multiplier, pouvoir adhérer aux cellules intestinales et exclure ou réduire l'adhérence des pathogènes, avoir un métabolisme actif et produire des substances inhibant les pathogènes (acides, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bactériocine (ce sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes), être non invasif, non carcinogène et non pathogène, être capable de co-agrégier pour former une flore normale équilibrée, pouvoir survivre aux différents procédés technologiques de production, et garder sa viabilité dans l'aliment et durant le transit intestinal (Salminen et al., 1996 ; Tannock, 1999a,b ; Stanton et al., 2001).

#### 4.1.2 Les probiotiques et leurs effets bénéfiques sur la santé

Plusieurs effets bénéfiques sur la santé ont été associés à la consommation des probiotiques (Mercenier et *al.*, 2002). Ils participent à l'amélioration de la digestion de lactose (sécrétion de lactase), à la réduction des produits du catabolisme éliminés par le foie et le rein, à l'augmentation de la valeur nutritionnelle (bonne digestion et absorption des minéraux et vitamines), à l'influence positive sur la flore intestinale, à la bonne croissance et au bien-être, à la régulation de la motilité intestinale (constipation, syndrome d'irritation intestinale), à la prévention de l'ostéoporose, du cancer, de hypertension et l'athérosclérose, réduction du taux de cholestérol, à la modulation du système immunitaire, réduction de l'inflammation ou des réactions allergiques (Gourbeyre et *al.*, 2011 ; Kalliomaki et *al.*, 2001 ; Savilahti et *al.*, 2008), et enfin à la prévention des infections intestinales (virus, *Helicobacter pylori*) et urogénitales (Reid et *al.*, 2003a,b).

Grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques utilisées par les industries agroalimentaires et pharmaceutiques, les probiotiques sont parfois utilisés comme compléments dans des produits comme les yaourts ou bien dans des préparations pharmaceutiques sous forme de gélules. De nombreuses souches bactériennes ont montré leurs bénéfices sur la santé humaine et sont déjà commercialisées par Danone telles que *Bifidobacterium lactis* (bifidus actif) utilisée dans la production des yaourts Activia® (Picard et *al.*, 2005) ou *Lb. casei* retrouvé dans Actimel®.

Les probiotiques ne sont pas seulement utilisés comme additifs alimentaires mais aussi en association avec des traitements médicaux conventionnels dans quelques préparations pharmaceutiques du fait de leur reconnaissance en tant que GRAS aux Etats-Unis (Saarela et *al.*, 2000, Salminen et *al.*, 1998). L'agence Américaine du Médicament (Food and Drug Agency, FDA), estime que les produits contenant des probiotiques ne font pas objet des mêmes recommandations que les médicaments.

#### 4.1.3 Les principaux microorganismes à potentiel probiotique

Les souches ou espèces probiotiques sont des composants normaux de la flore intestinale (Dunne et *al.*, 2001). En alimentation humaine, les genres microbiens les plus utilisés comme probiotiques sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus*. Par contre, en alimentation animale de nombreux genres bactériens et fongiques sont utilisés, comme *Lactobacillus*,

*Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* et *Torulopsis* (Pestka et al., 2001).

Il faut noter que les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont de plus en plus utilisées dans les produits probiotiques à causes des nombreux effets bénéfiques sur la santé (tableau III) associés à leur consommation (Leahy et al., 2005 ; Picard et al., 2005 ; Lee & O'Sullivan, 2010 ; Gourbeyre et al., 2011, Kalliomaki et al., 2001, Savilahti et al., 2008). Pour obtenir certains effets positifs sur la santé (réduction des infections intestinales, digestion du lactose, réduction du cholestérol), une souche probiotique doit atteindre le gros intestin à une concentration d'environ  $1 \times 10^7$  cellules viables/gramme (Stanton et al., 2001). De ce fait, la concentration d'un probiotique dans un aliment doit tenir compte de cette contrainte pour permettre d'atteindre les concentrations ciblées dans le colon. Cette concentration dépend évidemment de la nature de l'aliment utilisé et de la quantité journalière consommée.

## 4.2 Genre *Bifidobacterium*

### 4.2.1 Ecosystème gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m<sup>2</sup>, il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzapfel et al., 1998). L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une activité normale de l'écosystème. Si l'un des trois composants de l'écosystème est défaillant, l'alliance est altérée et par conséquent diverses pathologies s'y installent (McCracken & Lorenz, 2001).

La flore intestinale normale est une collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte (Isolauri et al., 2002). Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de  $10^{13}$ - $10^{14}$  cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Bjorksten, 2004 ; Picard et al., 2005). L'effet principal de cette flore sur l'homme est la protection et

l'amélioration de la résistance aux maladies infectieuses (Asahara *et al.*, 2004 ; Sullivan et Nord, 2005). La microflore du colon est très complexe et dominée par les bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides* spp., *Clostridium* spp, *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* spp : ). Tandis que les bactéries anaérobies facultatives sont moins nombreuses et représentées par les lactobacilles, les entérocoques, les streptocoques et les *Enterobacteriaceae*. Les levures (ex. *Candida albicans*) sont relativement faiblement représentées. La charge microbienne dans les différents compartiments a été estimée à environ  $10^4$ ,  $10^{3-4}$ ,  $10^{5-7}$ ,  $10^{7-8}$  et  $10^{10-11}$  ufc/g dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon respectivement (Ouwehand & Vesterlund, 2003; Isolauri *et al.*, 2004). Les bifidobactéries et les lactobacilles, ainsi que certains entérocoques, *E. coli*, streptocoques et bactéroïdes, se distinguent par leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, comme l'amélioration de la maturation et de l'intégrité de l'intestin, l'antagonisme contre les pathogènes et la modulation de la fonction immunitaire (Schiffrin & Blum, 2002; Rastall, 2004).

Chez le nourrisson, les bifidobactéries sont largement dominantes dans la flore et deviennent souvent sous-dominantes après la période de sevrage (Metsuoka, 1989). Alors, on assiste à l'augmentation du nombre de bactéries indésirables comme les Coliformes, les *Clostridia* et les Streptocoques, *E coli*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, qui peuvent causer de sérieuses pathologies chez l'homme (Biavati *et al.*, 2000). Le taux de bifidobactéries continue de décroître avec l'âge, provoquant du coup une augmentation de la sensibilité aux infections. Les bifidobactéries sont prédominantes dans tout le gros intestin et surtout au sein du côlon proximal, alors que les lactobacilles colonisent principalement l'intestin grêle distal (Roy, 2001). Les bifidobactéries se retrouvent également dans la flore vaginale et buccale (Collado *et al.*, 2005).

**Tableau III:** Quelques souches probiotiques et leurs effets cliniques. Adapté de Mattila-Sandholm *et al.*, (1999).

Souche probiotique	Effets cliniques sur l'Homme
<i>Lactobacillus GG ATCC 53103</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, réduction de l'activité des enzymes fécales, prévention des diarrhées associées aux antibiotiques, prévention et traitement des diarrhées à rotavirus et autres diarrhées, modulation de la réponse immunitaire
<i>Lactobacillus johnsonii Lj-1(LA-1)</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, modulation de la flore intestinale, réduction des symptômes de l'intolérance au lactose, traitement de la constipation, amélioration de l'immunité, adjuvant dans le traitement de <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Bifidobacterium lactis (bifidum) Bb-12</i>	Prévention de la diarrhée du voyageur, traitement des diarrhées virales (rotavirus), modulation de la flore intestinale, traitement de la constipation, modulation de la réponse immunitaire.
<i>Lactobacillus reuteri ATCC 55730</i>	Colonisation du tractus intestinal, réduction de la durée des diarrhées aux rotavirus, traitement des diarrhées virales
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Modulation de la flore intestinale, réduction de l'activité des enzymes fécales, effets positifs sur le cancer superficiel.
<i>Lactobacillus plantarum DSM 9843</i>	Adhésion aux cellules intestinales humaines, modulation de la flore intestinale
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prévention et traitement des diarrhées associées aux antibiotiques (ex. <i>Clostridium difficile colitis</i> )

Les bifidobactéries se retrouvent également dans la flore vaginale et buccale (Collado *et al.*, 2005). On compte actuellement plus de 40 espèces et sous-espèces de *Bifidobacterium* dont douze ont été retrouvées chez l'homme. Les autres ont été isolées à partir de laits fermentés ou du tractus digestif d'animaux (bovins, lapin, porcs, abeilles, poulet, hamsters...).

#### 4.2.2 Historique

Au cours de ses recherches sur la flore du nourrisson allaité au sein, Tissier (1900) découvre des bacilles à Gram positif incurvés, souvent bifides, qu'il appela *Bacillus bifidus communis*. De 1900 à 1957, cette espèce est incluse dans la famille des *Lactobacillaceae* sous le nom de *Lactobacillus bifidus* (Winslow, 1917 ; Holland, 1920). En 1927, Orla-Jensen reconnaît l'existence du genre *Bifidobacterium* mais étant donné ses similitudes avec le genre *Lactobacillus*, les bifidobactéries resteront assimilées au genre *Lactobacillus* jusqu'en 1957. En 1957, Dehnart réalise qu'il existe plusieurs biotypes de *Bifidobacterium*. Il faudra attendre 1963 pour que Reuter découvre sept espèces du genre *Bifidobacterium*. C'est dans la 8e édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Rogosa, 1974) que le genre *Bifidobacterium* est reconnu. Il est inclus dans la famille *Actinomycetaceae* de l'ordre des Actinomycetales (Biavati et al., 2000).

#### 4.2.3 Propriétés phénotypiques

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram-positif, immobiles, non sporulées, non productrices de gaz, anaérobies (sauf quelques espèces pouvant tolérer l'oxygène), catalase négatives (excepté *B. indicum* et *B. asteroides*) et saccharolytiques. La morphologie est variable selon les conditions de culture (Scardovi, 1986) et selon les espèces et l'aspect bifide n'est pas constant (figure 1). Par exemple, la disposition en «V» ou en palissade est caractéristique chez *B. angulatum*, l'alignement d'éléments globulaires chez *B. catenulatum*, de longues chaînes de cellules régulières chez *B. pullorum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium longum* (souches des trois biovars) sont des bacilles généralement bifides alors que *Bifidobacterium coryneforme* ou *Bifidobacterium minimum* ressemblent à des corynébactéries. Mais, le plus souvent, la morphologie cellulaire ne permet pas une bonne différenciation du genre et de l'espèce. Même l'aspect bifide des extrémités des bâtonnets sont rencontrés aussi chez les genres *Corynebacterium* et *Propionibacterium*.

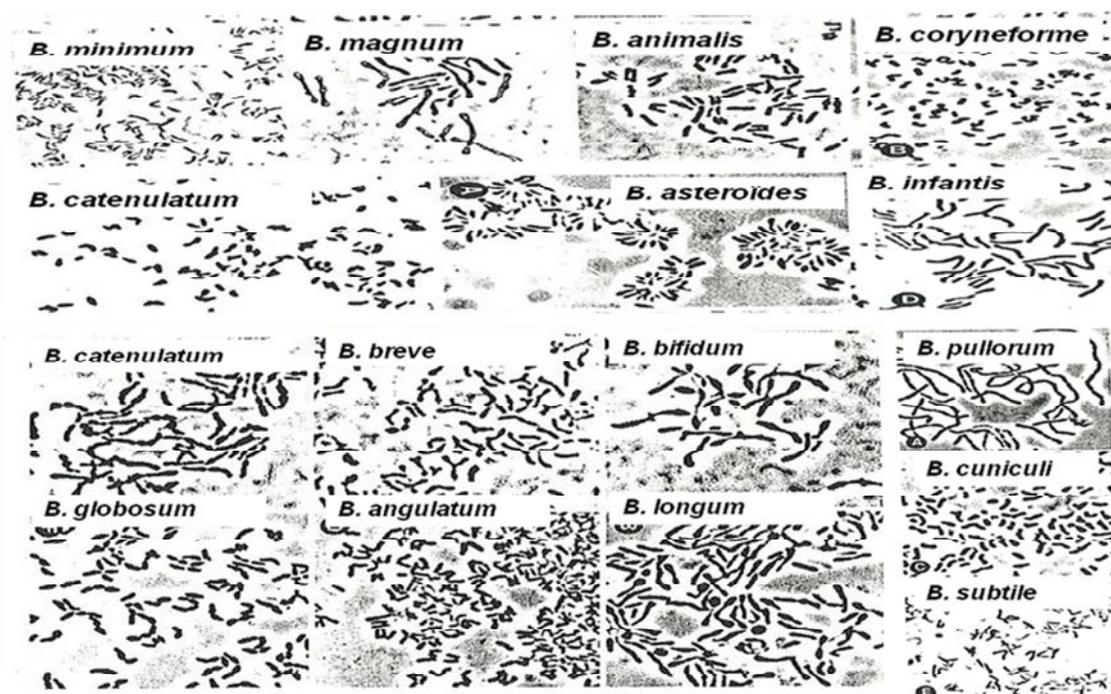
Leurs niches écologiques sont l'intestin de l'homme, la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal de l'animal, l'intestin de l'insecte et les eaux résiduaires (Ventura et al., 2004).

La température de croissance des bifidobactéries isolées de l'humain ou des animaux varie respectivement de 36° à 38 °C et de 41° C à 43 °C (Dong et al., 2000).

Du point de vue physiologique, les bifidobactéries se caractérisent par leur activité enzymatique leur permettant d'utiliser de nombreux sucres, comme le lactose, le galactose, le

raffinose, le sucrose, l'amylopectine, l'amylose, le xylan (Scardovi, 1984) et de produire de l'acide lactique et de l'acide acétique (Gibson & Wang, 1994; Yildirim & Johnson, 1998).

Le fructose est dégradé par fermentation selon une cascade de réactions aboutissant à la formation d'acétate et de lactate. Normalement 75% d'acétate sont formés pour 50% de lactate. L'enzyme clé de ce mécanisme est la Fructose-6-phosphate phosphokétolase (F6PPK) qui scinde l'hexose-P en érythrose-4-P et acétylphosphate. Cependant, la dégradation du pyruvate en acide formique et acétylphosphate et la réduction de cet acétylphosphate en éthanol peuvent modifier le ratio en faveur d'une production d'acétate, acide formique et éthanol plutôt qu'en faveur d'une production de lactate (Scardovi et Trovatelli, 1965 ; De Vries *et al.*, 1967 ; Veerkamp., 1978).



**Figure 1:** Morphologie cellulaire de différentes espèces de bifidobactéries

#### 4.2.4 Sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité aux substances antimicrobiennes d'une souche bactérienne est une condition préalable pour son approbation comme probiotique. Certains auteurs affirment que dans les cas de co-administration avec des antibiotiques pour prévenir et traiter les troubles intestinaux, les probiotiques doivent être résistants à certains antibiotiques pour survivre dans le tractus gastro-intestinal (Danielsen & Wind, 2003).

Les bifidobactéries sont sensibles aux pénicillines telles que l'ampicilline ou la pénicilline G, aux céphalosporines de première génération, aux tétracyclines, aux macrolides tels que l'érythromycine, aux lincosamides tels que la clindamycine et enfin au chloramphénicol.

Elles sont par contre résistantes aux aminosides tels que la néomycine, la kanamycine, la gentamycine et la streptomycine. Une résistance aux polymyxines telles que la polymyxine B a également été observée ainsi que pour le thriméthoprim et le metronidazole (Rada et Dlebal, 1998). Les mécanismes de résistance sont encore peu connus (Lim et *al.*, 1993). La résistance intrinsèque à la néomycine et à la kanamycine a été largement exploitée pour améliorer la sélectivité des milieux de culture. Des limites sont cependant observées à cause de la grande variabilité entre les espèces (Charteris et *al.*, 1998).

#### 4.2.5 Pouvoir pathogène

Les espèces du genre *Bifidobacterium* ne possèdent ni endotoxine (bactérie Gram positive), ni exotoxine. Ce genre n'est pas considéré comme pathogène. Cependant, son pouvoir acidogène est tellement intense qu'il peut provoquer des irritations locales (cystites hémorragiques) ou même des destructions : ainsi la présence de l'espèce *B. dentium* dans les dents cariées a incité de nombreux auteurs à l'incriminer comme agent de corrosion de la dentine et de l'émail. A ce jour, l'espèce *B. dentium* est considérée comme potentiellement pathogène, bien qu'on la trouve dans la flore intestinale humaine à des taux relativement bas ( $10^4$ - $10^5$  ufc/g de matière fécale) (Crociani et *al.*, 1996). *B. adolescentis* et *B. longum*, également, ont été incriminés dans des cas de septicémies (Ishibashi & Yamazaki, 2001).

#### 4.2.6 Propriétés génotypiques

##### 4.2.6.1 La composition en bases cytosine-guanine de l'ADN

Les bifidobactéries ont un pourcentage en base G+C plus élevé que la plupart des autres espèces bactériennes. Ce taux est en général supérieur à 55% par rapport aux bases A+T. On peut cependant classer les bifidobactéries en 3 groupes : les « G+C riches » (55-67%), les « G+C pauvres » (45%) et les bifidobactéries ayant un % G+C intermédiaire (55%). Ces trois groupes correspondent à trois phylum évolutifs différents (Jian et *al.*, 2001).

#### 4.2.6.2 Les plasmides

Dans l'étude de Sgorbati *et al.*, (1982), vingt pour cent des souches de bifidobactéries contenaient un ou plusieurs plasmides. Ce sont *B. longum*, *B. globosum*, *B. asteroides* et *B. indicum*. *B. longum* est la seule espèce d'origine humaine dont 70% des souches sont porteuse d'ADN extrachromosomique (Sgorbati *et al.*, 1982 ; Sgorbati *et al.*, 1986). De manière étonnante, *B. infantis*, souvent présent avec *B. longum* dans les prélèvements, ne présente pas de plasmides (Neut *et al.*, 1981 ; Scardovi *et al.*, 1986)

#### 4.2.6.3 Les séquences d'ADN étudiées

L'étude de la séquence de l'ADN est un bon moyen pour pouvoir identifier une espèce bactérienne, mais aussi pour pouvoir étudier le lien de parenté entre des souches appartenant à une même espèce. En ce qui concerne les bifidobactéries, certaines régions du génome ont particulièrement été étudiées.

##### ➤ Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S

L'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (16SrDNA) est un moyen utile pour identifier des relations phylogéniques entre les espèces (Mangin *et al.*, 1996 ; 1999). Le 16SrDNA a été séquencé pour presque toutes les espèces et sous-espèces de bifidobactéries. Ce gène est très bien conservé, jusqu'à 99% dans le genre *Bifidobacterium*. En tenant compte de la séquence du 16SrDNA, presque toutes les espèces du genre *Bifidobacterium* et l'espèce *Gardnerella vaginalis* appartiennent à un groupe phylogénétiquement distinct des autres genres (Miyake *et al.*, 1998).

##### ➤ Le gène codant pour la protéine Hsp60

La séquence partielle du gène codant pour la protéine de choc thermique de 60kDa (*hsp60*) de 30 espèces de bifidobactéries ainsi que de *Gardnerella vaginalis* a été déterminée (Jian *et al.*, 2001) afin d'étudier la taxonomie du genre. Il a été établi que la similitude de séquence est de 99,4 à 100% dans la même espèce, 96% en cas de sous-espèces et 73-96% (85% en moyenne) entre les différentes espèces. La similitude entre la séquence du gène *hsp60* de *G. vaginalis* et les séquences de *Bifidobacterium* est de l'ordre de 75%. Cette classification semble être meilleure que la classification par le 16SrDNA car le dendrogramme obtenu est mieux corrélé avec le contenu en G+C. Avec le classement phylogénique basé sur *hsp60*, toutes les bactéries « G+C riches » (55-67%, la plupart des espèces du genre *Bifidobacterium*) sont dans un même

cluster tandis que les bactéries «G+C pauvres» (45%, *B. inopinatum*) se retrouvent dans un autre cluster avec *Gardnerella vaginalis*. Un troisième groupe est formé par des bifidobactéries ayant un «G+C moyen» (55%, *B. denticolens*).

➤ *L'espace intergénique 16S-23S*

Les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S forment un opéron présent en plusieurs copies. Autant la séquence du 16SrDNA est un bon moyen d'identification du genre *Bifidobacterium*, autant la séquence nucléotidique située dans l'espace intergénique 16SrDNA- 23SrDNA est un bon moyen d'établissement des relations intraspécifiques. En effet, chaque souche est caractérisée par sa séquence ITS «*Internally Transcribed Spacer*». Ainsi, ces séquences sont de bonnes souches. Le taux maximum de divergence entre les souches appartenant à la même espèce est de 13% (Leblond- Bourget et al., 1996).

## 5. L'ANALYSE DES RISQUES

### 5.1 Historique

Depuis quelques années, différents concepts relatifs à l'hygiène et à la sécurité des aliments ont été développés. Ces concepts s'appliquent à différents niveaux de la chaîne alimentaire et sont associés à des programmes de santé publique et aux marchés. Les analyses des risques relatifs à la sécurité sanitaire des aliments sont conduites par les autorités nationales, régionales et internationales compétentes dans ce domaine.

En 1994, l'Organisation mondiale du Commerce (OMC) a conclu un accord pour l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires (*sanitary and phytosanitary measures* (SPS *measures*)) dont les objectifs sont d'éviter les entraves au commerce international et d'instituer des règles selon lesquelles un pays peut refuser de commercialiser un produit sur son territoire s'il présente un risque pour la population (OMC, 1994). La justification du refus de commercialisation d'une denrée alimentaire doit se fonder sur une analyse de risque basée sur des normes internationales reconnues par l'OMC. Le *Codex Alimentarius* et ses composantes techniques sont reconnus par l'OMC. Un des objectifs du *Codex Alimentarius* est d'instituer des normes et des références servant de base pour une analyse de risque (Rogy, 2002; FAO/WHO, 2006). Les comités du *Codex Alimentarius* sur l'hygiène alimentaire, sur l'hygiène de la viande, sur les additifs alimentaires, sur les contaminants, sur les résidus de pesticides et sur les résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments jouent un rôle de gestionnaires des risques.

En 1999, l'Union européenne a rédigé le Livre Blanc sur la sécurité alimentaire où les principes généraux de la politique européenne en matière de sécurité alimentaire y sont exposés (Commission des Communautés européennes, 2000). Depuis lors, l'Union européenne a remplacé son ancienne législation par un ensemble de nouveaux règlements communément appelé « le paquet hygiène ». Parmi les différents règlements du paquet hygiène, c'est le règlement (CE) N°178/2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, appelé « General Food Law », qui met en place l'analyse de risque comme démarche systématique dans la sécurité alimentaire (Commission des Communautés européennes, 2002). Le règlement (CE) n°2073/2005 recommande des révisions des critères microbiologiques concernant les denrées alimentaires en tenant compte de l'évolution dans le domaine de la sécurité et de la microbiologie des denrées alimentaires. Cette évolution comprend les progrès scientifiques, technologiques et méthodologiques, l'évolution des niveaux de prévalence et de contamination, l'évolution de la population de consommateurs vulnérables ainsi que les résultats éventuels d'analyses de risque (Commission des Communautés européennes, 2005).

## 5.2 Le risque alimentaire : définition et caractéristiques

Il est nécessaire de bien distinguer les notions de danger et de risque avant d'aborder l'analyse de risque. Un **danger** d'origine alimentaire est selon la définition du *Codex Alimentarius*, un « agent biologique, chimique ou physique présent dans un aliment ou état de cet aliment pouvant avoir un effet adverse pour la santé ». Les exemples des dangers présents dans les aliments sont répertoriés dans le tableau IV. La contamination des aliments par ces dangers peut avoir lieu aux différents stades de leur production, de leur transformation et de leur conservation.

Le **risque** est la probabilité d'être affecté par un danger. C'est la probabilité qu'un événement défavorable, un danger ou un dommage a de survenir ainsi que son impact potentiel. Cette probabilité est une fonction de plusieurs facteurs endogènes et exogènes. Le risque peut être immédiat dans le cas de toxi-infections alimentaires et des allergies, ou différé dans le temps dans le cas des cancers et dégénérescence de certains organes et fonctions physiologiques.

**L'analyse de risque** est définie comme une démarche scientifique établie dans le but d'identifier les dangers connus ou potentiels, d'en apprécier les risques, de les gérer et de communiquer à leur propos (Ahl *et al.*, 1993). Toma *et al.*, (1991) décrivent l'analyse de

risque comme une manière d'organiser les informations disponibles sur un événement potentiel donné, de les traduire en probabilités en tenant compte d'hypothèses, de la variabilité et de l'incertitude, et d'en déduire logiquement des décisions.

Les évaluations des risques utilisées pour définir les normes du Codex en matière de sécurité sanitaire des aliments sont effectuées par les trois organes mixtes FAO/OMS d'experts que sont le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA), la réunion conjointe FAO/OMS sur les résidus de pesticides (JMPR) et les Consultations mixtes FAO/OMS d'experts de l'évaluation des risques microbiologiques (JEMRA). D'autres évaluations des risques peuvent être fournies ponctuellement par des consultations d'experts *ad hoc* et par des gouvernements membres qui ont procédé à des évaluations pour leur propre compte.

**Tableau IV:** Exemples de dangers qui peuvent être présents dans les aliments

<b>Dangers microbiologiques</b>	<b>Dangers chimiques</b>	<b>Dangers physiques</b>
Bactéries infectieuses	Toxines présentes naturellement	Morceaux de métal, menus débris provenant des machines
Organismes produisant des toxines	Additifs alimentaires	Matière plastique
Moisissures	Résidus de pesticides	Verres
Parasites	Résidus de médicaments vétérinaires	Pierres
Virus	Produits chimiques dans l'environnement	Bois
Prions	Contaminants chimiques issus de matériaux d'emballage	Fragments d'os
	Allergènes	

(Source : Mühlemann & Aebischer., 2007)

### 5.3 Composantes de l'analyse du risque

L'analyse des risques sert à effectuer une estimation des risques pesant sur la santé et la sécurité des personnes, afin de définir et de mettre en œuvre des mesures appropriées visant à les maîtriser et à communiquer avec les parties prenantes au sujet des risques et des mesures à appliquer. L'une des difficultés rencontrées en santé animale et en santé publique vétérinaire est la coexistence de deux modèles de description et d'appellation des étapes de la démarche en analyse de risque (tableau V) : d'une part, le modèle de l'Organisation mondiale de la Santé animale (Office International des Epizooties OIE, 2001) et d'autre part, le modèle

du *Codex Alimentarius* issu du groupe de travail de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture et de l'Organisation mondiale de la Santé (FAO/OMS) (Organisation mondiale de la Santé, 1995). Des différences importantes sont à signaler dans les étapes de l'analyse de risque (tableau V). En effet si les deux organisations proposent quatre étapes pour l'appréciation du risque, leurs appellations sont sensiblement différentes. Néanmoins, si les noms et l'ordre des étapes proposées sont différents, la démarche reste la même.

Le modèle le plus largement utilisé en hygiène alimentaire est celui du *Codex Alimentarius*. L'analyse des risques est un mécanisme structuré de prise de décisions comportant trois volets distincts mais étroitement liés : l'évaluation du risque ou appréciation du risque, la gestion du risque et la communication du risque (*Codex Alimentarius Commission, 2007*).

**Tableau V:** Les étapes de l'analyse de risque : comparaison des modèles décrits par le Codex Alimentarius et l'OIE

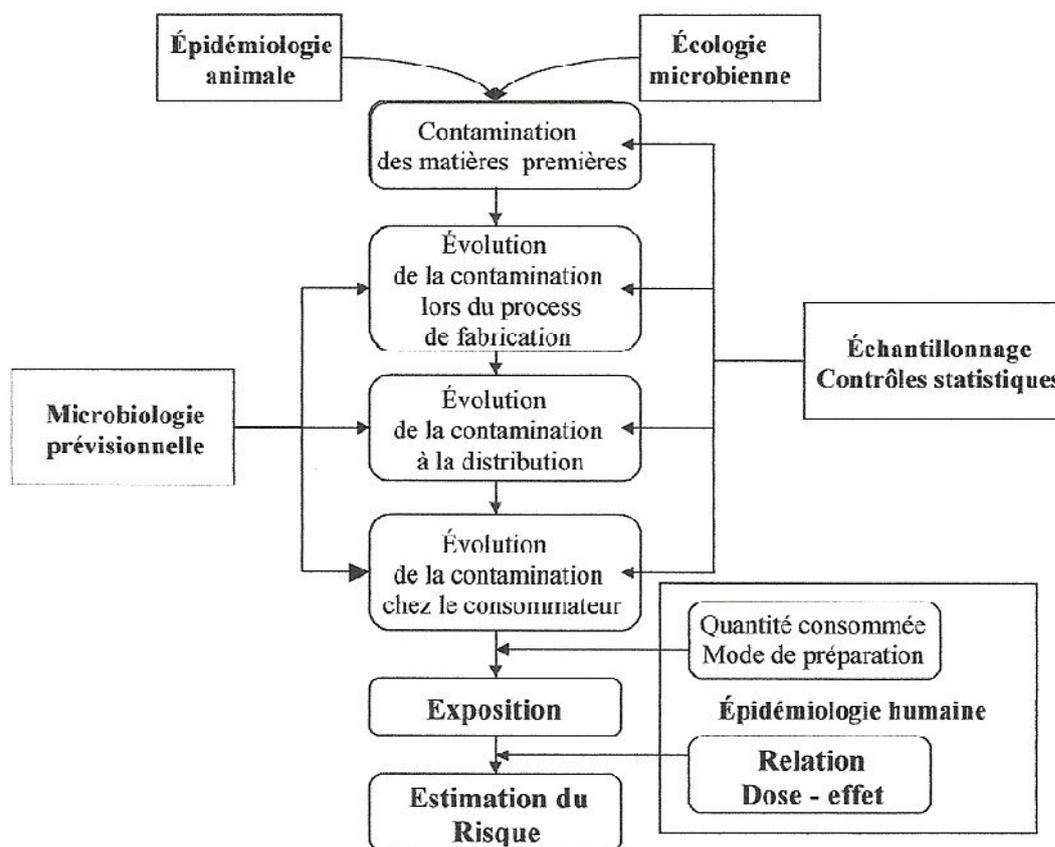
Étapes de l'analyse de risque	
Codex Alimentarius	OIE
1. Évaluation du risque	1. Identification du danger
	Appréciation de l'émission
	2. Appréciation du risque
	Appréciation de l'exposition
2. Gestion du risque	Appréciation des conséquences
	Estimation du risque
3. Communication relative au risque	3. Gestion du risque
	4. Communication relative au risque

(Source : Adapté de Vose et *al.*, 2001)

### 5.3.1 L'évaluation du risque ou appréciation du risque

L'évaluation du risque est le socle scientifique de l'analyse des risques, qui consiste à identifier et à caractériser des risques et à déterminer l'exposition. Il s'agit de modéliser la transmission de l'agent infectieux en tenant compte des différentes étapes de la filière alimentaire pour parvenir à une estimation du risque (Figure 2). Selon les normes adoptées par la Commission du *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius, 1995*), l'évaluation du risque est un processus scientifique comprenant les étapes suivantes : (i) identification du danger ; (ii) caractérisation du danger; (iii) évaluation ou appréciation de l'exposition et (iv)

caractérisation du risque. Suite à l'identification du danger, l'ordre dans lequel ces tâches doivent être conduites n'est pas fixe ; le processus est normalement très itératif et les différentes étapes sont répétées à mesure que les données et les hypothèses sont affinées.



**Figure 2 :** Schéma général de l'évaluation du risque (source : Sanaa et Cerf, 2002).

### 5.3.1.1 L'identification du danger

L'identification du danger est l'étape permettant de dresser la liste des dangers associés à un aliment. Elle dépendra de la disponibilité de données de surveillance épidémiologique et des investigations entreprises lors des toxi-infections alimentaires ou d'épidémies communautaires. Cette étape est purement qualitative ; c'est un exercice de synthèse et d'expertise des informations disponibles permettant de conclure s'il est opportun ou pas de mener une évaluation quantitative des risques liés à la consommation d'un aliment ou d'un groupe d'aliments. Les informations à rassembler dans cette étape concerneront selon Sanaa et Cerf (2002) :

- la définition du danger,

- les caractéristiques microbiologiques du danger,
- la pathogénie du danger,
- les méthodes d'isolement et d'identification du danger à partir des aliments,
- les traitements actuels des aliments permettent-ils d'éliminer ou de réduire la présence du danger dans les aliments ?
- la définition de l'effet néfaste et les méthodes de diagnostic chez l'homme,
- l'isolement et implication du danger dans des cas de maladie chez l'homme,
- la fréquence de contamination des aliments par le danger concerné,
- l'incidence de l'effet néfaste chez l'homme,
- le rôle des aliments dans la transmission du danger (enquêtes cas témoin et/ou investigations des poussées épidémiques ou des toxi-infections alimentaires collectives).

Lors de l'identification du danger, l'ensemble des informations énumérées n'est pas toujours nécessaire ; il s'agit ici d'apporter le maximum d'information permettant d'argumenter sur l'implication d'un aliment ou d'un groupe d'aliments dans la transmission de la maladie à l'homme.

#### 5.3.1.2 *La caractérisation du danger*

La caractérisation des dangers est l'évaluation qualitative et/ou quantitative de la nature des effets néfastes sur la santé associés aux agents biologiques, chimiques et physiques qui peuvent être présents dans les denrées alimentaires.

Pour les agents chimiques, il y a lieu de procéder à une détermination de la courbe dose-réponse. Pour les agents biologiques et physiques, on procédera à une détermination de la dose-réponse si les données sont disponibles. La caractérisation du danger correspond généralement à:

- l'établissement de la relation dose-réponse (ou effet) pour les effets adverses ou critiques (un effet critique est défini comme étant l'effet physiologique survenant à la plus faible dose (Klassen & Watkins, 2003).
- l'évaluation de la dose externe (administrée) contre la dose interne (absorbée).
- l'identification des espèces et des souches les plus sensibles.
- l'identification des différences potentielles qualitatives et quantitatives entre les différentes espèces.

- la caractérisation du mode d'action et les mécanismes de toxicité des effets adverses et des effets critiques.

#### *5.3.1.3 L'évaluation de l'exposition*

L'évaluation de l'exposition constitue l'évaluation qualitative et/ou quantitative de l'ingestion probable d'un agent biologique, chimique ou physique via l'alimentation et, le cas échéant, le contact par d'autres voies d'exposition. Elle caractérise la quantité de danger qui est consommée par des populations exposées. Cette analyse porte sur le taux de danger présent dans les matières premières, dans les ingrédients alimentaires ajoutés aux denrées primaires et dans l'environnement alimentaire en général et a pour objet de dépister les changements de taux tout au long de la filière de production alimentaire. Ces données sont combinées avec les modes de consommation alimentaire de la population des consommateurs cible pour évaluer l'exposition pendant un intervalle de temps donné au danger présent dans les aliments tels qu'ils sont réellement consommés. Le taux de présence d'un danger dans un aliment au moment où celui-ci est produit est souvent nettement différent du taux de danger au moment où il est consommé. S'il y a lieu, l'évaluation de l'exposition peut servir à évaluer scientifiquement les changements de niveau du danger tout au long du processus de production pour estimer le niveau probable au moment de la consommation (FAO/WHO, 2007). L'on cherchera à estimer l'ingestion probable du danger par le biais des aliments incriminés. La quantification de l'exposition est très complexe. Plusieurs composantes sont à estimer :

- la probabilité que le produit consommé soit contaminé,
- la concentration du danger dans l'aliment contaminé,
- la fréquence de consommation du produit alimentaire,
- la quantité d'aliment consommé.

Chacune de ces quatre composantes est une variable aléatoire.

#### *5.3.1.4 La caractérisation du risque*

Au cours de la phase de caractérisation des risques, les résultats des trois étapes précédentes sont intégrés pour produire une estimation du risque et produire un conseil approprié pour les gestionnaires du risque. Les estimations peuvent revêtir différentes formes, et l'incertitude et la variabilité doivent également être décrites si possible. Une caractérisation des risques comporte souvent une description d'autres aspects de l'évaluation des risques, tels que les

classements comparatifs avec des risques provenant d'autres aliments, les impacts sur les risques de diverses hypothèses prédictives par simulation et du travail scientifique ultérieur nécessaire pour combler les lacunes (FAO/WHO, 2007).

Elle est définie comme étant l'estimation qualitative et ou quantitative, compte tenu des incertitudes inhérentes à l'évaluation de la probabilité de survenue ainsi que de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé dans une population donnée (moyens et forts consommateurs) en se basant sur l'identification et la caractérisation du danger et l'évaluation de l'exposition (Delhalle et *al.*, 2008). La probabilité de survenue des effets adverses sur la santé est généralement difficile à estimer puisqu'elle va dépendre de la nature de l'effet, de l'importance ainsi que de la durée de l'exposition dépassant les valeurs toxicologiques de référence.

Le résultat de l'estimation du risque peut s'exprimer de la façon suivante : une probabilité de 95% que le nombre de morts liés à la consommation de l'aliment contaminé par le danger étudié dépasse 10 par an.

Le risque d'être malade pour un individu est calculé à partir de l'équation suivante (Sanaa et Cerf, 2002) :

$$\text{Probabilité (Malade)} = 1 - \prod_{i=1}^c (1 - f(D_i))$$

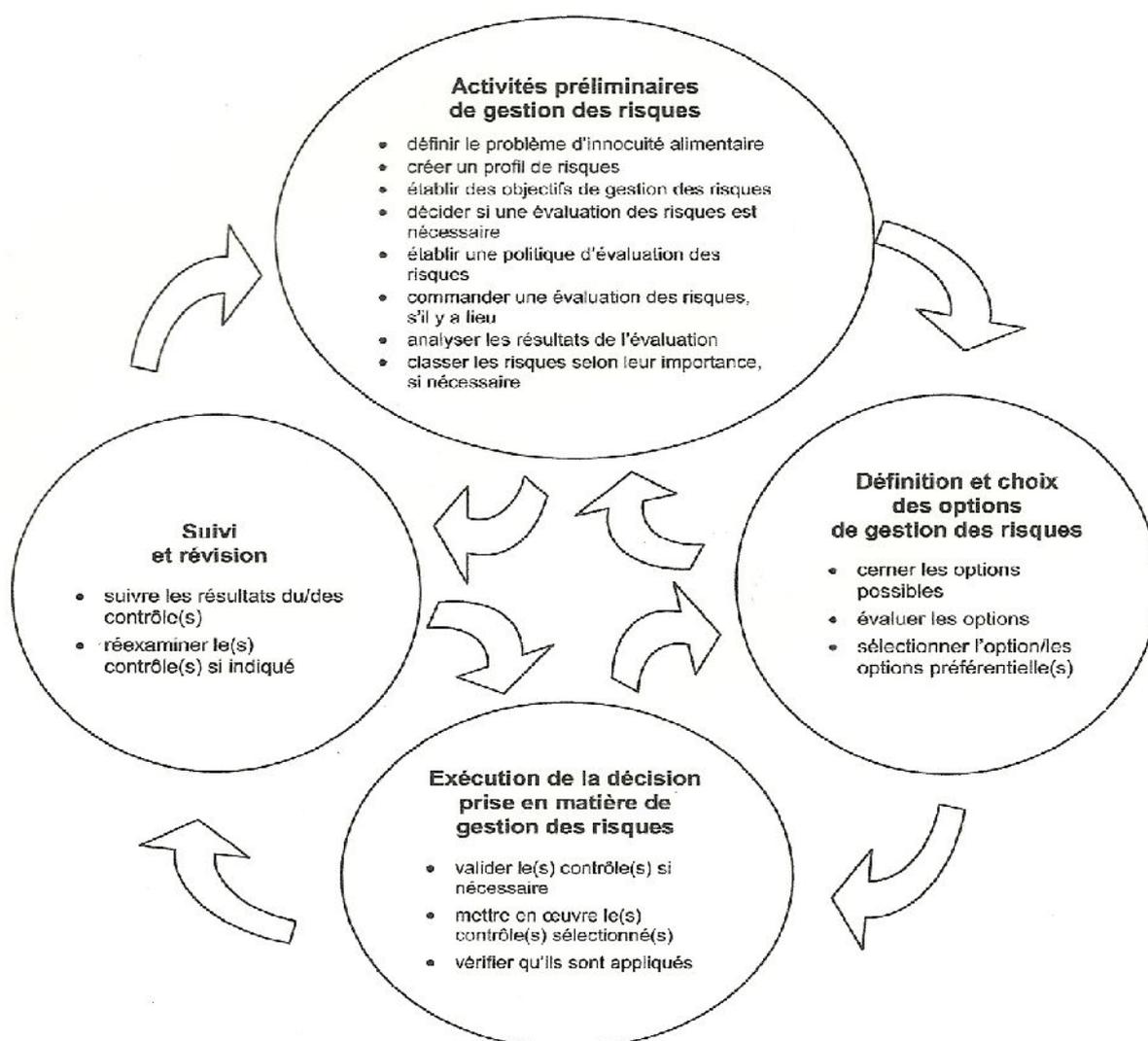
où **c** est la fréquence de consommation pour un individu donné, **D** la dose ingérée lors de la consommation **i**, et **f** la fonction dose/effet.

On obtient ainsi une distribution de la probabilité du risque de tomber malade par individu. A partir de cette distribution, on peut déduire la distribution du nombre attendu de malades pour une période de temps donnée.

### 5.3.2 Gestion du risque

L'évaluation des risques est considérée comme le volet « scientifique » de l'analyse des risques, tandis que la gestion des risques en est la composante où l'information scientifique et d'autres facteurs, comme par exemple des considérations d'ordre économique, social, culturel et éthique, sont intégrés et évalués s'agissant de choisir les options préférentielles en matière de gestion des risques. Une fois l'évaluation terminée, les gestionnaires de risques se basent sur les résultats pour décider des actions à entreprendre (Figure 3).

La gestion des risques consiste à mettre en balance les différentes politiques possibles en consultation avec l'ensemble des parties intéressées, en tenant compte de l'évaluation des risques et d'autres facteurs pertinents pour la protection de la santé des consommateurs et la promotion de pratiques commerciales loyales et, au besoin, à choisir les mesures de prévention et de contrôle appropriées. Les mesures de gestion du risque découlent du processus d'évaluation du risque. Les acteurs de la gestion du risque peuvent être, soit les pouvoirs publics, soit des organisations privées (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2006). La gestion des risques cible les facteurs de risque maîtrisables pour les réduire ou les éliminer.



**Figure 3 :** Cadre générique de gestion des risques (Source FAO/WHO, 2007)

### 5.3.3 La communication relative au risque

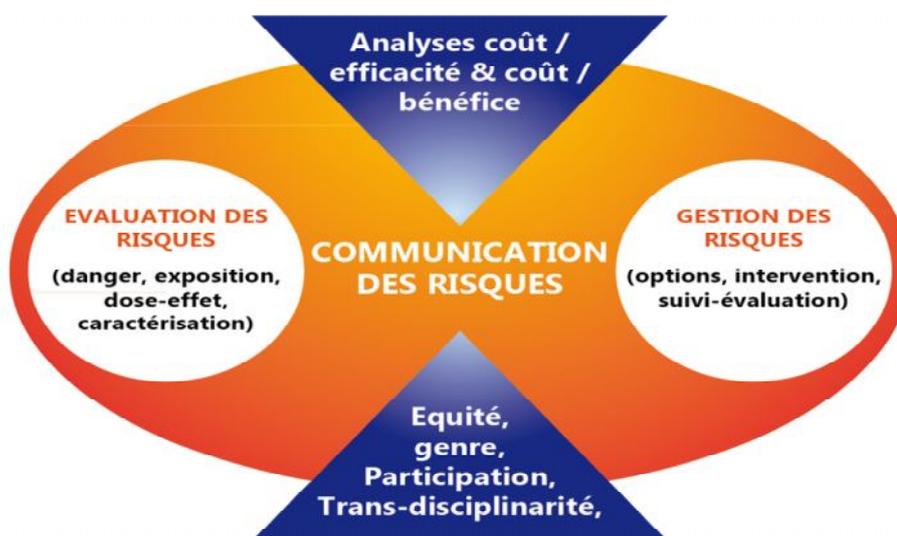
La communication du risque est un processus interactif d'échanges d'informations et d'opinions sur les risques entre les évaluateurs du risque, les gestionnaires du risque et les autres parties intéressées comme les consommateurs ou les industriels. C'est un processus continu permettant le partage d'informations entre les différents partenaires (FAO/WHO, 2006). Des discussions d'ordre technique ont lieu entre les experts et les gestionnaires des risques (autorités, politique, commerce et industrie). Lorsqu'il s'agit de choisir quelle est la meilleure façon d'agir avec un risque, la communication entre les gestionnaires des risques, le public et le secteur privé est très importante. Cette discussion est beaucoup moins technique et peut englober par exemple des aspects économiques, sociaux, éthiques et politiques. Initialement, les stratégies de communication sur les risques fonctionnaient de haut en bas : le législateur s'adressait au public. Plus récemment, une communication sur les risques sous forme de dialogue qui encourage le public et les personnes concernées à participer activement au processus de communication a été initiée. C'est le début du processus de participation.

### 5.4 Intégration des outils participatifs à l'analyse des risques

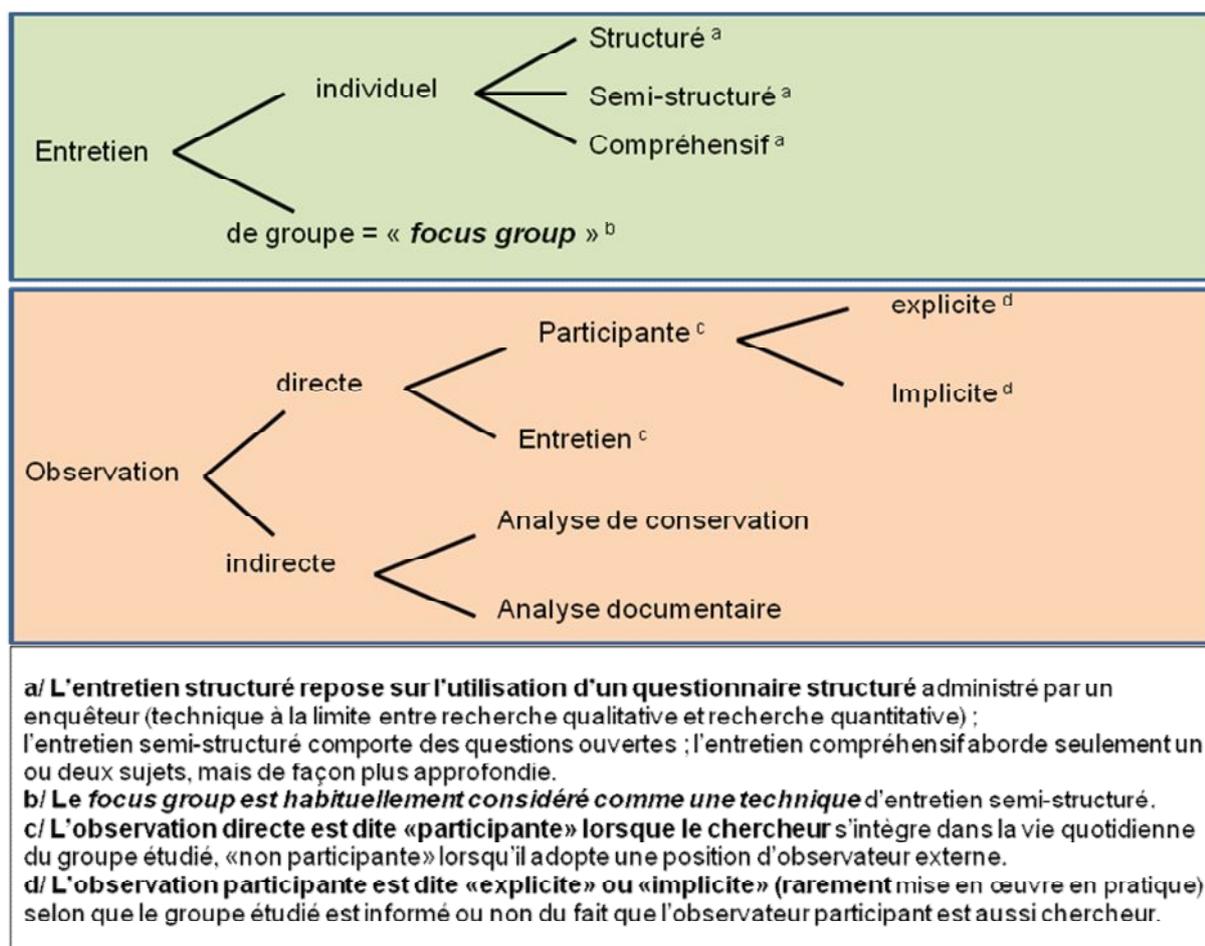
Bien que l'évaluation des risques soit la meilleure pratique actuelle et la clé de voûte du commerce international, son utilisation dans les pays en développement est limitée. Elle n'a pas été conçue pour les marchés intérieurs ayant des niveaux d'hygiène déplorables avec un taux élevé de vulnérabilité aux maladies d'origine alimentaire.

Depuis leur introduction dans les années 1970, les méthodes et les techniques participatives sont désormais au cœur du développement communautaire. Elles sont promues parce qu'elles sont plus efficaces, plus durables, moins coûteuses et plus éthiques (par rapport aux méthodes non-participatives), dans leur inclusion des pauvres dans la planification des décisions qui les concernent. Dans le domaine de la santé animale, les méthodes participatives ont été appliquées avec succès à des programmes communautaires de santé animale (Jost et *al.*, 2007). Une conclusion transversale des études de Grace et *al.*, (2008) a montré que les méthodes participatives sont plus faciles et moins coûteuses que les enquêtes classiques et génèrent des résultats comparables et des niveaux beaucoup plus élevés de participation et de satisfaction de recherche. L'application la plus importante de ces méthodes est la compréhension de l'exposition au risque. Les méthodes participatives sont excellentes pour la cartographie et la description des processus dynamiques.

L'Analyse participative des risques (APR) est une combinaison entre les approches participatives et les concepts HACCP (*Hazards Analysis of Critical Control Point*), et/ou *Codex Alimentarius* et de l'OIE/ OMS/ FAO qui prennent en compte la variabilité, l'incertitude, la relativité des risques et la complexité des prises de décisions face à ces risques (Bonfoh et al., 2013). Lorsqu'il n'existe pas de données (insuffisance des rapports sanitaires) ou lorsque le coût est une contrainte d'accès aux données, ces méthodes peuvent être utilisées conjointement avec la revue littéraire pour construire une évaluation du risque de premier passage. L'APR est une méthode adaptée à l'analyse du risque pour assurer la participation volontaire des communautés (Barker et al., 2010) dans la planification, les enquêtes, l'échantillonnage aléatoire, la collecte de données en vue de faciliter la surveillance, les études épidémiologiques et le contrôle des maladies (figure 4). Cette approche permet d'utiliser les méthodes statistiques de simulation de Monte Carlo pour situer ou prédire les risques. Avec l'APR, certains aspects comme l'identification des acteurs, le niveau d'implication des populations, des chercheurs, la place de l'État et les espaces de conflits de compétences sont indispensables. Les méthodes de participation les plus utilisées sont les groupes de discussions ou « *focus group* ». Le *focus group* est une technique d'entretien de groupe, un « Groupe d'expression », qui permet de collecter des informations sur un sujet ciblé. Il fait partie des techniques d'enquête qualitative par opposition aux enquêtes quantitatives reposant sur un questionnaire (figure 5) (Britten, 1995). Il est issu d'une technique marketing de l'après-guerre aux États-Unis qui permettait de recueillir les attentes des consommateurs et de rendre ainsi un produit plus attractif (Krueger & Casey, 2000). Il s'inspire des techniques de dynamique de groupe utilisées par C. Rogers, chef de file du courant de la psychologie humaniste. Cette technique a été récupérée dans les années 1980 par la recherche universitaire dans des domaines de l'éducation, la santé publique, l'environnement et les sciences sociales (Moreau et al., 2004). L'objectif est d'amener à une discussion spontanée, où les participants expriment leurs opinions, donnent des informations sur leurs habitudes. Ces entretiens servent donc à la fois à identifier, dans leur complexité, les comportements et opinions ainsi que leur représentation d'un danger ou d'un produit.



**Figure 4 :** Concept d'analyse participative des risques dans la chaîne de valeur informelle des produits d'origine animale (Source Bonfoh et al., 2013).



**Figure 5 :** Les différentes techniques de recueil de données dans le cadre de la recherche qualitative (Source Britten et al., 1995)

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

# 1 ÉTABLISSEMENT DU PROFIL DU RISQUE DE CONTAMINATION DU LAIT A TRAVERS LA DESCRIPTION DE LA FILIÈRE LAITIÈRE LOCALE

## 1.1 Zone d'étude

L'étude a été réalisée à Abidjan, capitale économique de la Côte d'Ivoire située au bord de l'océan atlantique (golf de Guinée) entre le 5°00' et 5°30' latitudes Nord et le 3°50' et 4°10' longitudes ouest. La ville jouit d'un climat de type subéquatorial, chaud et humide, qui comporte une grande saison des pluies (mai-juin-juillet), une petite saison des pluies (septembre-novembre) et deux saisons sèches, une grande (décembre-avril), une petite (août – septembre). Les exploitations laitières informelles ont été choisies dans la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan, en fonction de l'agrément des acteurs (propriétaires de bétail, gestionnaires de bétail, vendeurs de lait) à participer à l'étude. Cinq sites de production laitière ont été sélectionnés. Ce sont : le site de l'abattoir de Port-Bouët (4 fermes), le site de Lièvre rouge dans la commune de Yopougon (2 fermes), le site de Songon-té (1 ferme), le site de N'dotré (8 fermes) et le site d'Abobo Derrière Rails (Figure 6). Un pool de 15 fermes et 17 vendeurs ont été sélectionnés. L'étude s'est déroulée d'octobre 2008 à janvier 2010.



**Figure 6** : Carte de la zone d'étude avec les sites de production laitière et les marchés informels de vente du lait de vache.

## 1.2 Caractérisation du système de production

Avant la réalisation des analyses de laboratoire, une enquête avec un questionnaire à passage unique couvrant la filière laitière de la ferme à la vente a été réalisée auprès des éleveurs et des vendeurs de la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan (voir les fiches d'enquêtes en annexe I). Il s'agissait de recueillir des informations destinées à identifier et à caractériser les systèmes de production laitière, le fonctionnement des fermes et les pratiques des acteurs. Des données ont été collectées sur les caractéristiques des exploitations, sur l'état sanitaire du troupeau au cours des 12 derniers mois, sur l'alimentation des animaux, les conditions d'hygiène dans l'exploitation, les conditions de la traite du lait afin de déterminer les facteurs de risques de contamination du lait à la production selon les recommandations de l'Institut d'élevage de France (2000). Sur les lieux de vente du lait auprès des vendeurs installés autour des fermes de production, l'identification des acteurs, le circuit du lait après la traite, les différentes transformations du produit et les comportements à risques ont été identifiés.

## 1.3 Évaluation des perceptions et pratiques des acteurs de la filière

L'entretien avec les acteurs de la filière du lait s'est fait au travers d'une démarche participative basée sur l'organisation et sur l'évaluation de la perception qu'ont les acteurs de l'hygiène et de la qualité du lait cru ainsi que sur l'identification des sources potentielles de contamination à travers la description de leurs pratiques. Cela a été rendu possible par l'organisation des « focus group discussions ». Ce sont des discussions spontanées et contradictoires suscitées par le chercheur et qui donnent aux participants une opportunité d'exprimer leurs opinions et de donner des informations sur leurs habitudes. Les *focus group* ont ainsi permis d'identifier dans leur complexité, les comportements et opinions ainsi que la représentation de la qualité et de l'hygiène du lait et des produits laitiers par les acteurs de la filière laitière locale. Quatre *focus groups* ont été réalisés en janvier 2010 sur les sites de Lièvre-rouge, Port-Bouët, Abobo et N'dotré avec les producteurs et les vendeurs de la filière laitière. Au cours de ces rencontres, leur nombre variait entre six (06) et dix (10) personnes. Les participants étaient sélectionnés sur chaque site selon la répartition suivante : Lièvre rouge : 3 producteurs et 3 vendeurs ; Port-Bouët : 4 producteurs et 6 vendeurs ; Abobo derrière-rails : 8 vendeurs et N'dotré : 8 producteurs. La discussion s'est articulée autour de

trois points que sont (i) la relations entre les acteurs, (ii) la production et la commercialisation et (iii) l'hygiène du lait (voir la procédure du focus group en annexe V).

Un modérateur animait la discussion en langue Dioula pour une meilleure compréhension de tous les participants (les producteurs et les vendeurs de lait à Abidjan étant à majorité originaire du Nord de la Côte d'Ivoire ou des pays sahéliens). Chaque fois, le modérateur veillait à ce que tous les participants s'expriment en les encourageant à interagir entre eux (photographie 1). Le modérateur était accompagné d'un observateur du groupe qui s'occupait de l'enregistrement des débats à l'aide d'un dictaphone et de la prise de notes sur les aspects non verbaux et relationnels qui apparaissaient lors des réunions. Chaque séance durait environ 2 heures de façon à maintenir la concentration des participants. Après chaque *focus group* les acteurs ont été sensibilisés à l'hygiène et ont reçu des kits d'hygiène (photographie 2) composés de seaux de traite, 1 litre d'eau de javel, 500 g de poudre de savon.



**Photographie 1** : Déroulement du « focus group » à Lièvre rouge.



**Photographie 2** : Fin du « focus group » avec les producteurs de lait de N'Dotré.

## 2 ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DU LAIT DE VACHE PRODUIT LOCALEMENT

### 2.1 Matériel d'étude

Le matériel utilisé est constitué de lait cru de vache, d'eau utilisée pour les opérations de traite du lait, d'eau de rinçage des ustensiles de traite, d'écouvillons de la main des trayeurs et de la peau des mamelles des vaches et de l'eau stérile exposée aux contaminants de l'environnement.

### 2.2 Méthodes

#### 2.2.1 Échantillonnage

##### 2.2.1.1 Taille de l'échantillon

La taille de l'échantillon est calculée par l'équation de l'OMS (1991) :

$$N = PQ / (E / L)^2 \qquad N = P (1-P) / (E / 1,96)^2$$

Avec N : Taille minimale de l'échantillon, P : estimation de la proportion attendue (taux de Prévalence),

Q : la valeur de (1-P), E : la marge d'erreur tolérée (risque statistique en %), L : écart réduit pour le risque statistique admis (1,96 pour le risque 5%)

Un sondage préliminaire effectué sur 69 échantillons de lait de vache prélevé directement du pis et de 15 échantillons de lait de vente a donné les résultats suivants :

- Au moins un des pathogènes recherchés a été isolé dans 32 laits de pis soit une prévalence de 46,4%. La taille minimale de l'échantillon devrait être supérieure ou égale à 28.
- Au moins un des pathogènes recherchés a été isolé dans 13 laits de vente soit une prévalence de 82%. La taille minimale de l'échantillon devrait être supérieure ou égale à 16.

En prélevant 328 échantillons, la taille statistique de l'échantillon est respectée. Il s'agit de 150 échantillons de lait cru de vache (118 échantillons de lait de pis, 15 échantillons de lait de mélange et 17 échantillons de lait de vente), 15 échantillons de l'environnement, 15 échantillons d'eau de traite, 15 échantillons d'eau de rinçage des ustensiles de traite, 20 écouvillons de mains des trayeurs, 113 écouvillons de mamelles de vache.

#### *2.2.1.2 Prélèvements*

Les échantillons de lait de vache ont été prélevés dans de petites exploitations laitières informelles et sur les lieux de vente dans cinq sites (Port-Bouet, Lièvre rouge, Abobo, N'dotré, Songon). Pour connaître l'origine de la contamination du lait de vache, des échantillons de lait cru ainsi que des échantillons de l'environnement ont été prélevés au cours de la traite dans les fermes et aux lieux de vente à la périphérie des fermes. Avant la traite, 100 mL d'eau utilisée pour la traite, 100 mL d'eau de rinçage des ustensiles de traite, un écouvillon de la main du trayeur et de la peau des mamelles de chaque vache ont été prélevés. Pendant la traite, un flacon contenant 100 mL d'eau stérile est exposé pendant 15 minutes (échantillon de l'environnement) pour évaluer la pollution de l'environnement. Sur chaque site, un seul passage est effectué et 100 mL de lait cru pris directement du pis de la vache (lait individuel), du lait de mélange de toutes les vaches (dans le bidon du berger) et du lait en vente aux abords des fermes ont été collectés dans des flacons stériles (voir le détail du protocole de prélèvement des échantillons en annexe VI), conservés à + 4°C et analysés dans l'heure au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire.

#### 2.2.2 Analyse physico-chimique du lait cru de vache

La température ambiante et la température du lait ont été prises au moment des prélèvements à la ferme et chez chaque vendeur à l'aide d'un thermomètre digital (DT150

Summit). La mesure du pH (Microprocessor pH Meter, pH 211, HANNA Instruments), la recherche de la présence de résidus d'antibiotiques ou d'inhibiteurs de la fermentation (test de yoghourt), la densité du lait de vente et la contamination microbienne globale par le test à la résazurine ont été aussi réalisées (Bonfoh et *al.*, 2003c ; IDF, 1990). Le matériel et les méthodes utilisées pour l'analyse physico-chimique du lait cru de vache sont présentés en détail en annexe VII.

### 2.2.3 Dénombrement des germes de contamination

Tous les échantillons prélevés, ont été analysés par la méthode classique de bactériologie. Des dilutions décimales (1:10) de tous les échantillons ont été réalisées dans de l'eau peptonée tamponnée (BioRad) et dans tous les cas, les boîtes de gélose ont été préparées en double avec les dilutions appropriées.

Pour dénombrer *E. coli* (AFNOR NF V 08-017), 1 mL de la dilution appropriée ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) a été transféré dans une boîte de Petri stérile dans laquelle 15 ml de gélose Rapid *E. coli* 2 sont versés, mélangés et incubés à 44°C pendant 21 heures pour *E. coli* et à 37°C pendant 21 heures pour les coliformes totaux. Toutes les colonies bleues-vertes et les colonies violettes à roses ont été comptées. Ensuite la gélose EMB et la galerie API 20E ont été utilisées pour identifier les colonies.

Pour dénombrer *S. aureus* (AFNOR NF V 08-057), 0,2 mL de la dilution appropriée ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) a été étalé sur la gélose Baird-Parker (Oxoid) et incubée à 37°C pendant 24 heures. Les colonies noires brillantes ou grises foncées, entières, convexes, entourées de zones claires sont sélectionnées et testées pour la production de coagulase et la présence de DNase.

Pour dénombrer *Enterococci* (NF I90-461), 0,1 mL de la dilution appropriée ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) a été étalé sur la gélose Slanetz & Bartley et incubé à 36°C pendant 44 heures. Toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre ou sur l'ensemble de la colonie ont été comptées. Ces colonies sont prélevées et repiquées sur gélose bile-esculine-azide (BEA) et incubées à  $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$  pendant 24 h. Toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire ont été considérées. Le test de la catalase est ensuite réalisé avec ces colonies typiques et donne un résultat négatif pour *Enterococcus* (Hartman et *al.*, 2001).

Pour la recherche des *Salmonella* (NF EN ISO 6579), un pré-enrichissement a été réalisé dans de l'eau peptonée tamponnée (25 mL d'échantillon dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée) et incubé à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant  $18 \pm 2$  heures. Un enrichissement en milieu sélectif (bouillon rapport vassiliadis) est réalisé pour  $24 \pm 3$  h à  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  avec 0,1 mL de bouillon de pré-

enrichissement. Ensuite, 10 µl de chaque culture d'enrichissement sélectif sont ensemencées sur une gélose hektoen et incubées à  $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$  C pendant  $24 \pm 3$  heures. Sur la gélose hektoen, les colonies sont verdâtre avec ou sans centre noir. Cinq (5) colonies typiques sont testées pour l'identification biochimique (urée-indole, TDA, oxydase, catalase, ONPG, mobilité avec du BCC et portoir réduit de Le Minor). Les dénombrements ont été réalisés pour tous les échantillons selon les recommandations du manuel suisse des denrées alimentaires (2000) et de la fédération internationale du lait (1990). Le détail de la méthode peut-être consulté en annexe VII. La réglementation européenne 2073/2005/EC (CCE, 2005) a été utilisée pour déterminer la qualité microbiologique acceptable ou pas pour le lait cru destiné à la consommation humaine.

### **3 ISOLEMENT DES BIFIDOBACTÉRIES ET EVALUATION DE LEUR POTENTIEL ANTIBACTÉRIEN**

#### **3.1 Matériel d'étude**

Le matériel utilisé est constitué de lait cru de vache, d'eau utilisée pour les opérations de traite du lait, d'eau de rinçage des ustensiles de traite, d'écouvillons de la main des trayeurs et de la peau des mamelles des vaches et de l'eau stérile exposée aux contaminants de l'environnement.

#### **3.2 Echantillonnage**

Trois sites de production de lait de vache ont été choisis pour la recherche des souches de *Bifidobacterium* à divers niveaux de la chaîne de production. Il s'agit du site de Port-Bouët, du site de Lièvre -rouge et du site d'Abobo. La taille de l'échantillon a été calculée avec l'équation de l'OMS (1991) :

$$N = PQ / (E / L)^2 \qquad N = P (1-P) / (E / 1,96)^2$$

Selon les travaux de Delcenserie et *al.* (2005), 95% des échantillons de lait cru de vache analysés contenaient des bifidobactéries.

Avec cette prévalence, la taille minimum de l'échantillon doit être supérieure ou égale à 70.

Un total de 189 échantillons a donc été prélevé au cours de la traite du lait dans les fermes et à la vente (69 échantillons à Port-Bouet, 113 échantillons à Lièvre-rouge, 7 échantillons à Abobo). Il s'agissait de 14 écouvillons des mains des trayeurs et de 65 écouvillons de la peau des mamelles de chaque vache avant la traite, de 74 échantillons du lait cru pris directement

au pis de la vache (lait individuel) pendant la traite, de 6 échantillons de lait de mélange de toutes les vaches après la traite (dans le bidon de stock du berger) et de 30 échantillons de lait cru de vache en vente aux abords des fermes. Sur chaque site un seul passage a été effectué et 100 mL de lait cru (pour un échantillon) ainsi que les autres échantillons ont été collectés dans des flacons stériles, conservés à + 4°C et analysés dans l'heure au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (voir le protocole de prélèvement des échantillons en annexe VI).

### 3.3 Isolement des bifidobactéries

#### 3.3.1 Culture des échantillons

L'isolement des bactéries a été réalisé selon la méthode de Beerens (1998) modifiée par Delcenserie et *al.* (2005). Tous les échantillons prélevés ont été dilués dans de l'eau peptonée stérile (0,1%) contenant 0,05% de Cysteine-HCl. L'enrichissement a été réalisé avec 1 mL de dilution dans 9 mL de BHMup (BHI, 37 g/l (Oxoid, Angleterre), 5mL/l d'acide propionique, 0,5g/l Fe-citrate, 0,5 g/l cysteine chlorhydrate, 5g/l d'extrait de levure, 2g/l agar et de Mupirocine 80 mg/l). La mupirocine (GSK, Angleterre) est ajoutée à raison de 80 mg/l lors de l'utilisation du milieu. Le pH a été ajusté à 5 avec du NaOH 1 mol/l et les tubes ont été incubés 72h à 48°C en anaérobiose dans des jarres contenant des sachets générateurs d'anaérobiose (Anaer Gen, Oxoid). A partir de ce bouillon d'enrichissement, 0,1 mL a été prélevé, et cultivé sur la gélose CMup (Columbia blood agar, 0,5g/l Fe-citrate, 5 g/l glucose, 0,5 g/l cystein chlorhydrate et de 50 mg/l de mupirocine). L'incubation des boîtes s'est faite 72h à 37°C en anaérobiose dans des jarres contenant des sachets générateurs d'anaérobiose (Anaer Gen, Oxoid). Les bactéries Gram positif sont observées à immersion au microscope optique objectif à immersion X100 après la coloration de Gram. Pour séparer les bactéries anaérobies des bactéries aérobies, les isolats ont été cultivés sur gélose MRS et incubés 24h à 37°C en aérobiose.

Les bactéries anaérobies Gram positif ont été conservées dans une gélose MRS contenant 0,05% de Cystein-HCL, 20% de glycérol, recouverte de paraffine et transportées au Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires (LMDA) de la faculté de médecine vétérinaire, de l'Université de Liège, Belgique pour la suite des analyses. Ces bactéries ont été ensuite testées pour la recherche de la production intra-cellulaire de fructose-6-phosphate phospho ketolase (F6PPK).

### 3.3.2 Test de la fructose-6-phosphate-phospho-kétolase (F6PPK)

Les isolats de *Bifidobacterium* présomptifs (isolats anaérobies) ont été testés pour la recherche de la production intra-cellulaire de fructose-6-phosphate ketolase (F6PPK) selon la méthode de Scardovi (1986) modifiée par Orban & Patterson (2000). La formation d'acétyl-Phosphate à partir de fructose -6-Phosphate est visualisée par la formation d'une couleur rouge-violette (absorption maximum à 505 nm) due à la chélation du fer de la molécule  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (figure 7). (Voir le détail du protocole en annexe VIII).



**Figure 7:** Test F6PPK

Les souches F6PPK positifs ont été conservées dans un bouillon MRS contenant 0,05% de Cystein-HCL, recouvert de paraffine et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Identification des espèces de *Bifidobacterium*

La méthode utilisée pour l'identification des espèces de *Bifidobacterium* est la méthode moléculaire qui comporte trois étapes. Il s'agit de l'extraction de l'ADN chromosomique, de l'amplification de l'ADN codant pour les gènes hsp60 et 16S rDNA et de la séquençage du fragment amplifié. Les séquences résultantes sont analysées (voir le détail de toutes les étapes d'identification en annexe VIII). Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires (LMDA) de l'Université de Liège, Belgique.

#### 3.4.1 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait suivant les instructions du Kit DNeasy Blood and Tissue Handbook kit (Qiagen) avec les isolats de bifidobactéries F6PPK (+). Au spectrophotomètre, la pureté et la concentration ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) de l'ADN ont été mesurés. Les échantillons d'ADN purs obtenus ont été

dilués avec de l'eau pour biologie moléculaire Rnase free, afin d'obtenir une concentration comprise entre 25 et 50 µg/mL. Les échantillons contaminés sont jetés.

### 3.4.2 Détection du genre *Bifidobacterium* par PCR

Les isolats anaérobies ayant l'activité F6PPK ont été testés pour l'amplification des gènes hsp60 et 16S rDNA spécifiques au genre *Bifidobacterium* à l'aide d'amorces spécifiques (tableau VI). La détection de l'appartenance des isolats au genre *Bifidobacterium* a été réalisée selon la méthode de Delcenserie et al. (2005) dans un volume réactionnel de 25µl contenant 2 mM desoxynucleotide triphosphate (Eurogentec, Belgique), 5% (v/v) DMSO, 10X ThermoPol buffer (BioLabs, Nouvelle Angleterre), 0,2 µM de chaque amorce (Eurogentec, Belgique), 5U of Taq DNA polymerase (BioLabs, new England) et 1µl d'ADN chromosomique.

L'amplification a été réalisée dans un DNA thermal Cycler GeneAmp® PCR System 2700 (AB Applied Biosystems) selon le programme suivant: 95 °C pendant 5 min, suivi de 40 cycles pour le gène hsp60 ou 35 cycles pour le gène 16S rDNA de 95 °C pendant 30s, 56 °C pendant 30s et 72 °C pendant 1min30, suivie d'une élongation finale de 5 min à 72°C.

**Tableau VI :** Liste des amorces utilisées

Amorces	Séquence (5' à 3')	Spécificité	Taille des séquences (bp)
16S-f	AATAGCTCCTGGAAACGGGT	<i>Bifidobacterium 16S</i>	1050
16S-r	CGTAAGGGGCATGATGATCT	<i>Bifidobacterium 16S</i>	
P11-f	GTSCAYGARGGYCTSAAGAA	<i>Bifidobacterium hsp60</i>	217
P12-r	CCRTCCTGGCCACCTGT	<i>Bifidobacterium hsp60</i>	

### 3.4.3 Détection de *Bifidobacterium GC56 et GC61* par PCR en temps réel

La présence des espèces *B. crudilactis* et *B. vercorsense* a été associée au fromage au lait cru de vache d'une fromagerie française. Ces espèces étaient initialement dénommées respectivement *Bifidobacterium GC56* et *GC61* en relation avec le pourcentage de Guanine-Cytosine (GC%) de leur génome. Les souches de bifidobactéries de Côte d'Ivoire ont été testées par la PCR en temps réel GC56 et GC 61 pour déterminer leur appartenance ou non à ces espèces. Les analyses sur PCR en temps réel ont été effectuées en se basant sur le protocole décrit par Delcenserie et al., en 2005.

#### 3.4.4 Séquençage des produits d'amplifications et analyse des séquences

A partir des fragments amplifiés des gènes *Bifidobacterium* hsp60 et 16S rDNA, une étape de séquençage s'impose pour connaître la séquence génétique de ces gènes et identifier les espèces auxquelles appartiennent ces isolats. Les fragments amplifiés ont été purifiés avec le kit wizard SV® gel et le kit PCR clean-up system (Promega, USA) selon les instructions des fabricants et séquencés par la société DNA vision Agrifood (Belgique) (voir protocole séquençage en annexe VIII). Le séquenceur fournit les résultats exprimés en pics sur un graphique. Les séquences assemblées (voir liste des séquences consensus en annexe VIII) sont ensuite comparées aux séquences bactériennes (base de données nucléotidiques) présentes dans le programme BLAST disponible sur le web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ensuite, les séquences ont été alignées avec le programme ClustalX (Tompson et al., 1997). Un arbre phylogénétique avec *E. coli* comme racine a été construit en utilisant la méthode des plus proches voisins (neighbour-joining method) (Saitou & Mei, 1987) avec les séquences hsp60. L'arbre a été dessiné avec les séquences des gènes de référence (tableau VII) en utilisant le programme ClustalX (National Center for Biotechnology Information) et visualisé avec le programme TreeView.

Toutes les souches de bifidobactéries confirmées ont été conservées en double (dans un bouillon MRS contenant 0,05% de Cystein-HCL, recouvert de paraffine et stocké à -80°C) dans la souche-thèque du LMDA en Belgique et dans la souche-thèque du CSRS en Côte d'Ivoire.

**Tableau VII:** Liste des souches de référence utilisées et leurs numéros correspondant dans la banque de données GenBank.

Espèces	N° souche	N° GenBank
<i>B. asteroides</i>	JCM <sup>a</sup> 8230	AF240570
<i>B. breve</i>	JCM 1192	AF240566
<i>B. magnum</i>	JCM 1218	AF240569
<i>B. minimum</i>	JCM 5821	AY004284
<i>B. pullorum</i>	JCM 1214	AY004278
<i>B. angulatum</i>	JCM 7096	AF240568
<i>B. animalis</i>	JCM 1190	AY004273
<i>B. bifidum</i>	JCM 1255	AY004280
<i>B. boum</i>	03 - 4 - 8	AY166562
<i>B. catenulatum</i>	JCM 7130	AY166565
<i>B. choerinum</i>	JCM 1212	AY013247
<i>B. cuniculi</i>	JCM 1213	AY004283
<i>B. dentium</i>	JCM 1195	AF240572
<i>B. gallinarum</i>	JCM 6291	AY004279
<i>B. gallicum</i>	JCM 8224	AF240575
<i>B. indicum</i>	JCM 1302	AF240574
<i>B. longum subsp. infantis</i>	bb52	AY004288
<i>B. longum subsp. suis</i>	JCM 7139	AY166575
<i>B. merycicum</i>	JCM 8219	AY004277
<i>B. pseudocatenulatum</i>	JCM 7040	AY166552
<i>B. pseudolongum</i>		AF240573
<i>B. pseudolongum subsp. globosum</i>	1 - 25 - 3	AY166545
<i>B. ruminatum</i>	JCM 8222	AF240571
<i>B. thermophilum</i>	JCM 1207	AF240567
<i>Bifidobacterium sp. GC61</i>		EF990664
<i>Gardenerella vaginalis</i>	ATCC <sup>b</sup> 14018	AY123673
<i>Escherichia coli</i>	K-12	AE000487

### 3.5 Évaluation du pouvoir antibactérien des bifidobactéries

Les isolats de bifidobactéries confirmés par PCR et séquençage, ont été analysés pour la recherche d'une activité antagoniste contre une variété de microorganismes pathogènes. Cette recherche a été réalisée selon deux méthodes dont le spot test et la méthode de diffusion sur gélose. **La méthode de spot** a été réalisée selon la procédure de Bernet et *al.* (1993). Quinze (15) mL de gélose MRS contenant 2g/l de bicarbonate de sodium, sont coulés dans une boîte de Pétri stérile. Ensuite la surface de la gélose a été tachée avec 2µl d'une culture active de bifidobactéries de 18h en bouillon MRS à 37°C. Les boîtes sont séchées pendant 30 min à la

température de la pièce (25°C) et incubées en anaérobiose dans des jarres contenant des sachets générateurs d'anaérobiose (Anaer Gen, Oxoid) pendant 18h. Un Bouillon de culture de 18h en BHI (Breat heart Infusion) de la souche pathogène à tester (tableau VIII) a été réalisé. Un (1)% (v/v) du bouillon BHI (concentration finale 10<sup>6</sup>UFC/mL) a été versé dans 10 mL de TSB (Bouillon Trypticase Soja) contenant 0,8% d'agar à 45°C et homogénéisé. Le mélange a ensuite été utilisé pour recouvrir la gélose MRS de bifidobactérie de 18h et la gélose est incubée à 37°C pendant 18h en anaérobiose pour l'observation d'éventuelles zones d'inhibition. Les bifidobactéries montrant une activité antagoniste vis-à-vis de la souche pathogène sont sélectionnées pour le **test de diffusion sur gélose** selon la méthode de Tagg et *al.* (1976). Pour réaliser ce test de diffusion sur gélose, une culture de 18h en bouillon MRS de bifidobactérie a été centrifugée à 7000g pendant 10 min. Les bactéries lactiques peuvent produire des substances inhibitrices différentes des bactériocines telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine et le diacétyl. Pour éliminer l'effet des acides organiques, le pH du surnageant a été mesuré puis ajusté à pH 7,0 ±0,1 avec 1mol/l de NaOH et filtré avec un filtre Millex GP Millipore de 0,22µm (Carrigtwahill, Usa). Le surnageant neutralisé a été testé par la méthode de diffusion sur gélose. Vingt cinq (25) mL de TSB contenant 0,8% d'agar et 0,6% d'extrait de levure à 45°C, ont étéensemencés par 1% (v/v) de culture de 18h de la souche pathogène (concentration finale de 10<sup>6</sup> UFC/mL) en BHI. Le TSBensemencé est versé dans une boîte de Pétri stérile et laissé sécher à la température de la pièce. Ensuite, six puits de 7 mm de diamètre ont été creusés dans la gélose solidifiée avec un métal stérile et chaque puits est rempli de 80µl de surnageant neutralisé. Les boîtes ont été laissées à 5°C pendant 2h pour permettre la diffusion du surnageant et incubées à 37°C pendant 18h en anaérobiose. L'activité antibactérienne est déterminée par la présence d'une zone d'inhibition de plus de 3 mm.

**Tableau VIII:** Microorganismes pathogènes testés

Espèces	N° souche LMDA*
<i>Listeria monocytogenes</i>	S0154
<i>Listeria monocytogenes</i>	S0580
<i>Staphylococcus aureus</i>	S0155
<i>Staphylococcus aureus</i>	S0156
<i>Salmonella typhimurim</i>	S0157
<i>Salmonella Hadar</i>	S0066
<i>Escherichia coli O157 :H7</i>	S0231
<i>Escherichia coli O26</i>	S0347

\*LMDA : Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires, Université de Liège, Belgique

## 4 ÉVALUATION DES RISQUES DE CONTAMINATION DU LAIT LOCAL

### 4.1 Choix des microorganismes à étudier lors de l'évaluation des risques

Les contraintes budgétaires n'ont pas permis de faire des investigations sur un nombre plus important de dangers (microorganismes potentiellement pathogènes). Les pathogènes ont été choisis en fonction de leur importance probable. Dans des études antérieures (Garg & Mital, 1991 ; De Buyser et *al.*, 2001), des microorganismes pouvant causer des infections et intoxications chez les consommateurs (Murinda et *al.*, 2004 ; Olivier et *al.*, 2005), à savoir *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus* spp. ont été isolés de lait cru et de produits laitiers. Ces microorganismes peuvent pénétrer directement dans le lait cru par les vaches laitières atteintes de mammite subclinique ou clinique, à partir de l'environnement des fermes, de la fourniture d'eau utilisée pour le lavage des mains, des ustensiles ou des récipients, ou par les ustensiles utilisés pour la traite, à la suite d'une production dans des conditions insalubres et peu hygiéniques ou lors du traitement à la ferme ou pendant le transport (Garg et *al.*, 1991; Adesiyun et *al.*, 2007). Ils sont capables de se multiplier rapidement lorsqu'ils sont exposés à des températures ambiantes élevées, comme c'est le cas à Abidjan dans la chaîne de la production laitière traditionnelle.

### 4.2 Identification de la chaîne des valeurs du lait et des pratiques de consommation

Une enquête par questionnaire a été réalisée sur tous les sites de vente (marchés informels) et de production de lait de la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan (figure 5) pour déterminer la quantité totale de lait cru disponible sur les marchés informels de la ville d'Abidjan par jour. Pour les vendeurs de lait, les questions portent sur l'origine du lait, la quantité moyenne de lait vendu par jour, les pratiques d'ébullition, le mode de transport ainsi que la destination finale du lait (vente au détail).

Une autre enquête a été réalisée sur le mode de consommation du lait local auprès de 188 consommateurs aux différents points de vente à l'aide d'un questionnaire individuel à passage unique sur les sites de Port-Bouët, Lièvre rouge et Abobo (voir la fiche d'enquête en annexe IV).

### 4.3 Évaluation des risques

L'évaluation du risque de consommation du lait cru local à Abidjan a été réalisée selon les deux premières étapes de la nomenclature du *codex alimentarius* (Codex Alimentarius Commission, 2007) qui comporte quatre étapes. Ce sont l'identification du danger et l'évaluation de l'exposition. L'évaluation du risque de consommation du lait cru local n'a pas été réalisée de façon complète à cause du manque de données sur les effets dose-réponse.

#### 4.3.1 Identification du danger

Le lait de vache non pasteurisé a, depuis toujours, été associé à de nombreuses maladies graves. Les bactéries qui peuvent contaminer le lait cru sont associées à des maladies d'origine alimentaire (FAO, 1998). Dans cette étude, nous avons identifié comme danger dans le lait local, les bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterococcus* spp. Ces dangers microbiologiques ont été mis en cause dans des intoxications alimentaires en Côte d'Ivoire (Dosso et al., 1998, Dadié et al., 2000, Anonyme 1, 2010).

Ces bactéries peuvent entraîner de graves problèmes de santé, comme de la fièvre, des vomissements, de la diarrhée, une insuffisance rénale potentiellement mortelle, des fausses couches, voire la mort. Les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées sont particulièrement à risque. Dans notre étude, le danger est constitué des germes contaminants le lait local et le risque qualifie la probabilité de consommé du lait cru contaminé.

#### 4.3.2 Évaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition comprend une description et une quantification de l'exposition au danger étudié. L'évaluation de l'exposition estime la probabilité d'exposition d'un individu à un danger microbien et la charge de micro-organismes susceptibles d'être ingérés.

Dans la présente étude, la probabilité d'ingestion de pathogènes par le biais du lait local a été estimée en utilisant des paramètres tels que la concentration des pathogènes dans le lait contaminé ( $C_p$ ), la quantité journalière de lait cru contaminé ( $Q_c$ ), la proportion de consommation de lait cru ( $P_{cc}$ ), le nombre de consommateurs quotidiens de lait cru à Abidjan

( $N_A$ ), la quantité totale de vente quotidienne de lait cru dans les marchés informels dans les zones urbaines et péri-urbaines d'Abidjan ( $Q_{mi}$ ) et la probabilité d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique ( $P_i$ ) (tableau IX). La probabilité d'ingestion de lait cru contaminé ( $P_i$ ) est le produit de la proportion de la population d'Abidjan qui consomme du lait cru (non chauffé) ( $P_{cc}$ ) et la prévalence de lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique ( $P > N$ ) (tableau IX). Le nombre moyen des consommateurs journalier ingérant du lait contaminé à Abidjan a été calculé en divisant la quantité totale de vente quotidienne de lait cru dans les marchés informels ( $Q_{mi}$ ) par la moyenne de la quantité de lait consommé par jour. La quantité journalière moyenne (en litre) des ventes de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique a été estimée (c'est le produit de la prévalence du lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique ( $P > N$ ) selon le règlement 2073/2005/CE et de la quantité totale de ventes quotidiennes de lait cru dans les marchés informels ( $Q_{mi}$ ). Des simulations de Monte Carlo ont été exécutées pour 5000 itérations en utilisant le logiciel de statistique Model Risk 3.0 (Vose Software) (voir annexe IX). Les valeurs des paramètres ont été estimées sur la base des résultats de terrain et de laboratoire.

**Tableau IX:** Description et distribution des variables et des modèles pour l'évaluation des risques

	<b>Variabiles</b>	<b>Paramètres</b>	<b>Distribution/modèle</b>
<b>Probabilité observée</b>	$N_A$	Nombre de consommateurs quotidiens de lait cru à Abidjan	$Q_{mi}$ / quantité journalière de lait cru consommée
	$Q_c$	Quantité journalière de lait cru contaminé à Abidjan	$Q_{mi} * P_p$
	$P_{E.coli}$	Probabilité de contamination du lait vendu par <i>E. coli</i>	Beta (s +1, n- s +1)
	$P_{S.aureus}$	Probabilité de contamination du lait vendu par <i>S. aureus</i>	Beta (s +1, n- s +1)
	$P_E$	Probabilité de contamination du lait vendu par <i>Enterococcus</i>	Beta (s +1, n- s +1)
	$P_p$	Probabilité de contamination du lait vendu par les pathogènes	Beta (s +1, n- s +1)
	$C_p$	Concentration des pathogènes dans le lait contaminé	Discrete Uniform (data)
	$P_{cc}$	Proportion de consommation de lait cru (lait non bouilli)	Beta (s +1, n- s +1)
	$P_{>N}$	Prévalence de lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique	Beta (s +1, n- s +1)
	$P_i$	Probabilité d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique	$P_i = P_{cc} * P_{>N}$

s : nombre de succès c.-à-d. nombre d'échantillons positifs

n : nombre total d'échantillons

#### 4.4 Scenarii de réduction du risque

Des simulations de réduction du risque ont été réalisées pour déterminer la probabilité future d'ingestion de lait ne respectant pas les standards de qualité microbiologique ( $P_{if}$ ) après la mise en œuvre de mesures de contrôle du lait. Deux scenarii ont été simulés (tableau X) :

- Mise en œuvre d'une option de contrôle du lait pour diminuer la prévalence du lait contaminé sur le marché (par le rejet du lait ne respectant pas les normes de qualité microbiologique ( $P_{>N}$ ) dans les fermes ou sur les points de vente);

- Mise en œuvre d'une campagne de sensibilisation sur le chauffage du lait pour diminuer la proportion de la population d'Abidjan consommant du lait cru ( $P_{cc}$ ).

La réduction du risque d'ingestion de lait contaminé a été calculée en soustrayant la probabilité d'ingestion de lait cru contaminé après la mise en œuvre de l'option de contrôle ou des campagnes de sensibilisation ( $P_{if}$ ), de la probabilité d'ingestion de lait contaminé ( $P_i$ ) en l'absence de mesure de contrôle ou de campagne de sensibilisation. Les scénarii ont été simulés après 5000 itérations par la simulation de Monte Carlo à l'aide du logiciel Model Risk 3.0.

**Tableau X :** Paramètres d'atténuation du risque par des simulations

Variables	Description	Distribution/modèle					
		Options de contrôle			Campagnes de sensibilisation		
$P_i$	Probabilité d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique (probabilité observée)						
$P_{>N}$	Prévalence de lait ne respectant pas les normes de qualité microbiologique	5 %	10%	20%			
$P_{cc}$	Proportion de consommation de lait cru				5%	10%	20%
$P_{if}$	Probabilité future d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique (probabilité prédite après 5000 itérations)	$P_{cc} * 0.05$	$P_{cc} * 0.1$	$P_{cc} * 0.2$	$P_{>N} * 0.05$	$P_{>N} * 0.1$	$P_{>N} * 0.2$
$R_r$	Taux de réduction du risque	$P_i - P_{if}$					

## 5 Analyses statistiques

Les données ont été saisies avec le logiciel Epi info version 3.5.1 et analysées avec le logiciel R version 2.11.1. Les fréquences ont été calculées pour les variables quantitatives ainsi que les moyennes, l'écart-type, le minimum et le maximum. Les moyennes géométriques des dénombrements des germes de contamination ont été effectuées et les dénombrements transformés en  $\text{Log}_{10}$  pour subir une régression avec les points critiques (pis, ferme, vendeur). Les statistiques descriptives ont été effectuées pour toutes les variables. Le test de Chi carré et le Modèle Linéaire Généralisé (GLM) avec les erreurs binomiales ont été utilisés pour tester les relations entre les variables (présence de bifidobactéries par type d'échantillons, par site, par acteurs). Les intervalles de confiance à 95% ont été calculés pour les proportions (Newcombe, 1998). La différence entre les variables a été considérée comme significative à  $p < 0,05$ . La probabilité d'ingestion de lait cru contaminé a été déterminée en faisant le produit de la proportion de consommation de lait cru non traité et de la proportion de lait en vente de qualité microbiologique non satisfaisante. En guise d'entrée pour le programme ModelRisk 3.0 (vose software), les données (dénombrement des pathogènes dans le lait cru) recueillies lors des analyses de laboratoire ont été utilisées pour réaliser les simulations de Monte Carlo. Les enregistrements audio des focus group ont été transcrits en français sur papier et les données analysées de façon manuelle à travers une analyse de contenu thématique. Les données ont été compilées en s'appuyant sur les thèmes suivants : l'organisation et relation entre les acteurs ; la production et la commercialisation du lait ; les modes de consommation ; la perception du bon lait par les acteurs ; la perception des maladies liées à la consommation du lait par les acteurs.

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## 1 LE SYSTÈME DE PRODUCTION LAITIÈRE

### 1.1 Caractéristiques des éleveurs et de la production laitière

Les éleveurs sont tous de sexe masculin et majoritairement Peuls (87,5%) originaire du Mali et du Burkina Faso. L'âge moyen est de  $34,3 \pm 9,3$  ans (min: 28 ans ; max: 45 ans). Ils pratiquent un élevage traditionnel et vivent sur place auprès du troupeau. Les fermes appartiennent à des hommes d'affaires Ivoiriens et étrangers et ces éleveurs assurent juste le gardiennage et la conduite du troupeau sur les pâturages. Le cheptel est constitué de taurins (*Bos taurus*) (N'Dama, Baoulé), de zébus (*Bos indicus*) et de métis issus de croisements entre zébus et taurins. Le Ndama est compacte, courte sur pattes. C'est une race sans bosse et à longues cornes. Un écornage à l'âge d'un mois permet d'obtenir des adultes sans cornes. La robe typique est fauve avec des extrémités pouvant être plus sombres. Les baoulés sont des bovins de petite taille à tête massive. Les cornes sont courtes et la robe est noire surtout ou jaune, rarement fauve ou froment. Les extrémités sont foncées, noires ou marquées de noir. Quant au zébu, c'est un grand animal robuste possédant une bosse juste après l'encolure et existe en couleurs rouge et gris clair majoritairement. Les animaux vivent dans des enclos de fortune en bois à aire non paillée et non couverte. La moyenne de l'effectif des vaches en lactation est de  $8,2 \pm 4,6$  par ferme (min : 1, Max : 20) et la moyenne de production de lait par vache est de  $1,3 \pm 0,65$  litres (min : 0,5 l ; max : 3 l). La quantité de lait produite par ferme (tableau XI) après la traite était de  $10 \pm 7,97$  litres (min 3L, max 20L). Le lait produit dans les fermes est destiné à la vente et l'argent utilisé pour les besoins de l'alimentation des animaux et le salaire du berger. Après chaque traite, le lait est acheté sur place par des vendeurs ou des collecteurs qui l'acheminent vers les marchés informels. Sur l'ensemble des fermes, il n'y a pas de système de stockage des déjections. Les déchets sont laissés sur le sol.

### 1.2 Facteurs de risque de contamination du lait à la ferme

#### 1.2.1 Proximité d'autres ateliers de production animale

Dans les fermes, la séparation physique entre les animaux n'est pas adaptée avec une cohabitation entre les animaux d'espèces différentes. Il y a présence de volailles, de chèvres et de moutons (tableau XII). Il n'y avait pas de différence significative entre les fermes et les

fermes du voisinage concernant la présence d’animaux autres que les vaches (P=1 ; (OR=0,91 : [0,37 ; 2,26])). Par contre, il y a une différence significative dans la proportion des espèces présentes sur les fermes (P=0,001<0,01) de même que dans les fermes du voisinage (P=0,01<0,05) par le Modèle Linéaire Généralisé.

**Tableau XI** : Production moyenne de lait par vache par traite

Site	N° de fermes	Nombre de vaches laitières	Litrage livré par traite (litre)	Production moyenne de lait/vache/traite (L)
Port-Bouët	1	5	4	0,8
	2	4	7	1,7
	3	12	20	1,6
	4	6	5	0,8
Songon-té	5	9	12	1,3
Lièvre rouge	6	20	20	1,0
	7	12	15	1,3
N'Dotré	8	7	6	0,9
	9	8	10	1,3
	10	1	3	3,0
	11	7	6	0,9
	12	4	3	0,8
	13	13	30	2,3
	14	8	4	0,5
	15	7	5	0,7
Total	12	3	150	1,3

**Tableau XII**: Présence d’autres espèces animales dans l’environnement des fermes bovines

Variables	Présence d’autres animaux sur les fermes* (N=15)			Présence d’autres animaux dans les fermes du voisinage*(N=15)		
	n	%	95% IC	n	%	95% IC
Production de taurillons	0	0,0%	0,0 - 25,3%	1	06,7%	0,3 - 33,9%
Production de volailles	6	40,0%	17,4 - 67,1%	8	53,3%	27,4 - 77,7%
Production de chèvres	6	40,0%	17,4 - 67,1%	6	40,0%	17,4 - 67,1%
Production de Moutons	2	13,3%	2,3 - 41,6%	2	13,3%	2,3 - 41,6%

\*Variables quantitatives : moyennes du groupe ; IC : intervalle de confiance ; n : nombre de fermes ;

% : pourcentage ; N=nombre total de fermes

### 1.2.2 État sanitaire des animaux

Dans les fermes, aucune analyse de laboratoire n'avait été réalisée depuis une année. Pour les pathologies animales, les éleveurs pratiquent l'automédication avec des médicaments de rue. Généralement c'est le déparasitage qui est le plus pratiqué. En ce qui concerne la production laitière elle a baissé dans 20% des fermes en 1 an et dans 33,3% des fermes les deux derniers mois précédant l'enquête. Les vaches dans 13,3% (1 an) et 6,7% (depuis 2 mois) des fermes étaient atteintes de mammites cliniques. On a enregistré des vaches et des veaux souffrant de diarrhées, des morts de vaches et de veaux, des vélages avant termes, des suspicions d'infections pathogènes et des infections respiratoires des vaches au cours de l'année précédant l'enquête dans les fermes. Cette étude de l'état sanitaire des animaux (tableau XIII) a montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans les variables étudiées concernant la période, 2 mois ( $p=0,27$ ) ou 1 an ( $p=0,35$ ). En utilisant le modèle simplifié de GLM, il n'y avait aucune interaction significative entre les périodes concernant l'état sanitaire des animaux ( $p=0,207$ ).

### 1.2.3 Alimentation des animaux

Le mode d'élevage dans la zone d'étude est de type traditionnel sédentaire avec le recours aux pâturages ou aux herbes fauchées comme principale source d'alimentation (100% des fermes). Le manque de pâturage en milieu urbain oblige les éleveurs à aller de plus en plus loin à la recherche de pâturage. En complément, des vaches reçoivent des épiluchures de manioc (100%), la coque de coco (100%) et du sel (complémentation minérale). Seulement trois fermes (20%) utilisent en plus du son de maïs vendu dans le commerce. Concernant les conditions de stockage des aliments des vaches dans 33,3% des fermes, ces aliments sont accessibles aux rongeurs et aux oiseaux (tableau XIV) et 40% des fermes utilisent de l'eau provenant des étangs pour abreuver les vaches. Dans 13,3% des fermes qui utilisent des bacs comme réservoirs à eau pour l'abreuvement des vaches, ceux-ci ne sont pas régulièrement lavés.

**Tableau XIII:** État sanitaire des vaches et des veaux dans les fermes

État sanitaire des animaux	Cas depuis 2 mois (N=15)			Cas depuis 1 an (N=15)		
	n*	%	[95%IC]	n*	%	[95%IC]
Vaches laitières traitées pour mammites cliniques	1	06,7%	[0,3- 33,9%]	2	13,3%	[2,3- 41,6%]
Chute de production laitière importante (non due à des causes alimentaires)	5	33,3%	[12,9- 61,3%]	3	20,0%	[5,3 - 48,6%]
Diarrhées des vaches laitières	5	33,3%	[12,9- 61,3%]	4	26,7%	[8,9 - 55,2%]
Vaches mortes ou reformées pour maladie	1	06,7%	[0,3 - 33,9%]	3	20,0%	[5,3 - 48,6%]
Diarrhée de veaux	5	33,3%	[12,9- 61,3%]	3	20,0%	[5,3 - 48,6%]
Veaux morts	4	26,7%	[8,9- 55,2%]	5	33,3%	[12,9 - 61,3%]
Avortements	2	13,3%	[2,3- 41,6%]	7	46,7%	[22,3- 72,6%]
Vêlages avant terme	2	13,3%	[2,3- 41,6%]	3	20,0%	[22,3 - 72,6%]
Cas de suspicion d'infection pathogène	5	33,3%	[12,9- 61,3%]	1	06,7%	[0,3- 33,9%]
Affections respiratoires	3	20,0%	[5,3 - 48,6%]	2	13,3%	[2,3 - 41,6%]

\*Variables quantitatives : moyenne du groupe ; n=nombre des fermes ; N=nombre total de fermes

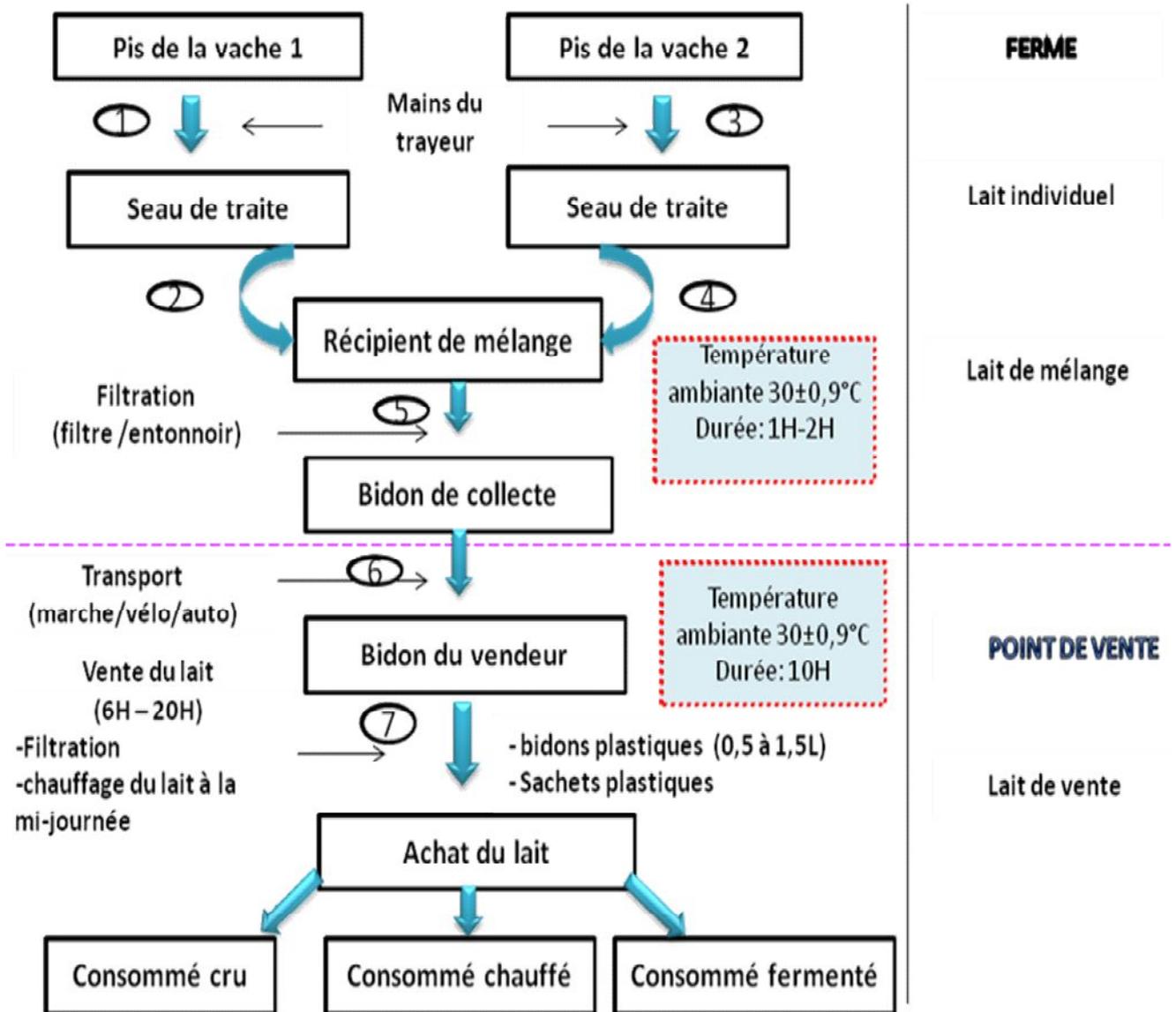
**Tableau XIV:** Conditions d'alimentation des vaches laitières en lactation

	<b>Variables</b>	<b>Effectif des fermes (n)</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>
Conditions de stockage des aliments	Accessible aux oiseaux	1	6,6%	[0,3 - 33,9%]
	Accessible aux rongeurs	9	60%	[32,9 - 82,5%]
	Accessible aux oiseaux et aux rongeurs	5	33,3%	[12,9 - 61,3%]
Mode de distribution des aliments	risque de souillure par les bouses	15	100%	[74,6 - 100%]
Origine de l'eau utilisée dans les fermes	Étang	6	40%	[17,4 - 67,1%]
	Puits	4	23,5%	[7,8 - 50,2%]
	Réseau	5	29,4%	[11,4 - 55,9%]
Mode de distribution de l'eau aux vaches laitières en lactation	Bac	9	52,9%	[28,5 - 76,1%]
	étang	6	40%	[17,4 - 67,1%]
Matériau des abreuvoirs	Ciment	3	20%	[5,3 - 48,6%]
	Fer	5	33,3%	[12,9 - 61,3%]
	Plastique	1	6,7%	[0,3 - 33,9%]
Fréquence de nettoyage des abreuvoirs	aucun	2	13,3%	[2,3 - 41,6%]
	Tous les matins	1	6,7%	[0,3 - 33,9%]
	1 fois par semaine	2	13,3%	[2,3 - 41,6%]
	1 fois par mois	4	26,7%	[8,9 - 55,2%]
Environnement de la ferme	Proximité d'une décharge ou d'une déchèterie	7	46,7%	[22,3 - 72,6%]

IC : Intervalle de confiance ; n=nombre des fermes où les variables sont observées

#### 1.2.4 Conditions de la traite du lait de vache

Concernant les paramètres entraînant la contamination du lait, les conditions de la traite sont très importantes. Avant de commencer la traite, dans 87%, les trayeurs ne se lavent pas les mains, dans 100% il n'y a aucun lavage des mamelles des vaches et dans 87% des fermes les ustensiles de traite ne sont pas bien lavés (les seaux sont suspendus aux enclos des vaches et utilisés directement au moment de la traite (tableau XV). La figure 8 décrit le circuit du lait local de la ferme au consommateur. La traite du lait se déroule les matins entre 5h 30 et 9h ou le soir à 16 h 30 et le tableau 5 décrit les conditions de la traite. Il s'agit d'une traite manuelle. L'amorce de la descente du lait est effectuée suite à la tétée d'un veau, la vache est immobilisée et le lait est traité manuellement dans une calebasse ou un seau en plastique (seau de traite). Ce lait est transféré dans un bidon ou un récipient du berger (lait de mélange). Le même seau de traite est utilisé pour traire une deuxième vache et le lait recueilli est transféré dans le récipient de mélange et filtré (entonnoir, tamis). Le processus continue jusqu'à la traite de toutes les vaches en lactation. Pendant la traite, il n'y a pas de lavage des mains du trayeur d'une vache à une autre et dans 53% des fermes, les vaches produisent de la bouse pendant la traite (tableau XVI). Après la traite seulement 40% des fermes filtrent le lait avant sa vente. Le lait obtenu (lait de mélange) est ensuite collecté par le vendeur dans des bidons de 1,5 à 20 litres et acheminé au lieu de vente. Le transport du lait se fait à pied, à vélo, en charrette ou en automobile à la température ambiante (autour de 30°C). Au point de vente, le lait est filtré, et vendu à température ambiante dans les bouteilles plastiques de 0,5 à 1,5 litre ou dans des sachets plastiques de 0,5 litre. A la mi-journée entre 11h et 14h, le lait est chauffé par les vendeurs dans de grandes marmites au charbon de bois pour stopper sa fermentation (tableau XVI), puis revendu jusqu'à 20h.



**Figure 8 :** Diagramme descriptif du processus de production, de transport et de vente du lait local à Abidjan

**Tableau XV:** Conditions de la traite du lait dans les fermes

Caractéristiques	Variables	Nombre de fermes (n)	%	IC 95%
Fréquences de la traite	1 fois par jour	12	80,0	[51,4 - 94,7%]
	2 fois par jour	3	20,0	[22,3 - 72,6%]
Avant de commencer la traite	La tenue du trayeur est sale	10	66,7	[38,7 - 87,0%]
	Le trayeur se lave les mains	2	13,3	[2,3 - 41,6%]
	Lavage et désinfection des mamelles	0	00,0	[0,0 - 25,3%]
	Ustensiles de traite bien lavés et en bon état	2	13,3	[2,3- 41,6%]
Pendant la traite	Production de bouses par la vache	8	53,3	[27,4- 77,7%]
	Lavage des mains du trayeur d'une vache à l'autre	0	00,0	[0,0 - 25,3%]
Après la traite	Filtration du lait après la traite	6	40,0	[17,4 - 67,1%]
	Réfrigération du lait	0	00,0	[0,0 - 25,3%]
	Stockage du lait destiné à la vente sur le sol	15	100	[74,6 - 100%]
	Vente sur place aux revendeurs	13	86,7	[58,4 - 97,6%]

n=nombre des fermes où les variables sont observées

IC : Intervalle de confiance

### 1.3 Les conditions de la vente du lait

#### 1.3.1 Identification des vendeurs

Après la traite, le lait est acheté à la ferme auprès du producteur directement par le vendeur ou par un collecteur qui le livre aux vendeurs sur les différents points de vente. Le lait est acheminé dans des bidons de 20 litres ou dans des bouteilles plastiques de 1,5 litre. Les moyens de transport utilisés pour l'acheminement du lait au lieu de vente étaient la marche (47%), l'automobile (41,2%) et la bicyclette (11,8%). Sur les 17 vendeurs interviewés aux différents points de vente, 2 sont des femmes (site d'Abobo derrière les rails). L'âge des

vendeurs varie de 15 à 73 ans avec une moyenne de  $29,5 \pm 12,5$  ans. Avant de devenir des vendeurs de lait, 35,2% étaient des éleveurs, 23,5% des commerçants, 5,8% des boulangers, 5,8% des bouviers, 5,8% des cultivateurs, 5,8% des ménagères et 5,8% des sans emploi. Ils ont tous démarré cette activité entre 2001 et 2009. Ils sont majoritairement de l'ethnie Peulh à 94,1% et originaires du Mali (11 vendeurs), du Burkina Faso (4 vendeurs) et de la Guinée (1 vendeur). Parmi ces vendeurs on retrouve aussi un de l'ethnie Bambara (5,9%) du Burkina Faso. La vente se tient tous les jours de la semaine et toute l'année ; elle débute à 6h pour prendre fin à 20h.

### 1.3.2 Caractéristiques de la vente de lait dans la zone étudiée

La vente de lait est une activité familiale chez 29,4% des vendeurs, et 70,6% travaillent pour leur propre compte (Tableau XVI). La quantité moyenne de lait livré par jour est de  $19,1 \pm 17,7$  litres par vendeur avec un prix moyen d'achat au fournisseur qui est de 400 F CFA le litre. Ce lait est payé à l'achat ou par semaine ou après la vente au fournisseur. La moyenne de lait écoulé par jour par vendeur est de  $16,4 \pm 18,6$  litres. Le temps d'écoulement du lait peut s'étendre chez certains vendeurs (5,9%) de 1 à 3 jours à une température ambiante de  $30 \pm 0,9^\circ\text{C}$ . Le prix moyen de vente au consommateur est de 650 F CFA. Une partie du lait cru est mis en bouteille et laissée dans un coin jusqu'au soir pour obtenir du lait fermenté. Ce lait fermenté se fait sur commande pour des clients. Une partie du lait non vendu à la fin de la journée est réfrigéré pour être revendu le lendemain. L'autre partie est soit offerte aux amis ou aux parents, soit autoconsommée par les vendeurs eux-mêmes ou subit aussi une fermentation spontanée pour obtenir du lait fermenté, du beurre solide ou du beurre liquide traditionnel. Les bonnes ventes se font les lundi, jeudi, vendredi, dimanche et pendant le mois de ramadan.

**Tableau XVI:** Caractéristiques de la vente de lait

<b>Caractéristiques</b>	<b>variables</b>	<b>Données*</b>
Commerce	Activité individuelle	12 /17
	Activité familiale	5/17
Achat du lait par des revendeurs	Oui	2 /17
Approvisionnement	Moyenne de la quantité de lait reçu par jour/vendeur	19,1±17,7 Litres min : 8L max : 83L
	Prix moyen d'achat du litre de lait au fournisseur	400 F CFA Min : 350 F CFA Max : 500 F CFA
	Vente	Vêtements du vendeur
	Conservation du lait pendant la vente	Température ambiante : 30±0,9°C min : 28,4°C ; max : 32°C
	Traitement du lait avant la vente	Aucun : 12 /17 Filtration : 5 /17
	Traitement du lait à la mi-journée	Chauffage : 17/17
	Prix de vente du litre de lait au consommateur (F CFA)	650 Min : 500 ; max : 800
	Quantité moyenne de litres vendu par jour/vendeur	16,4±18,6 Litres Min : 5L; max : 83L
	Vente de la quantité totale par jour	Oui : 2/17 Non : 15/17
	Temps d'écoulement du lait	1 jour: 6 /17 1 à 2 jours : 10/17 1 à 3 jours : 1/17
Après la vente : devenir du lait non vendu	Conservation /transformation	Réfrigérateur : 12 /17 Lait fermenté : 2 /17 Beurre solide : 2 /17 Offert : 1 /17

\*Les nombres sans unités indiquent le nombre de vendeurs.

## 1.4 Les perceptions des acteurs de la filière

Les « focus group » ont permis de faire ressortir les aspects positifs de l'interaction et de la dynamique des acteurs. Les discussions avec les catégories d'acteurs de la filière laitière locale à Abidjan ont permis de mettre en lumière des connaissances, opinions et expériences des différents acteurs impliqués dans la production, transformation et commercialisation du lait à Abidjan. Les cinq thèmes qui ont émergé des analyses sont les suivants : (i) organisation et relation entre les acteurs, (ii) production et commercialisation du lait, (iii) mode de consommation des acteurs, (iv) perceptions du bon lait par les acteurs et (v) perceptions des maladies liées à la consommation du lait.

### 1.4.1 Organisation et relation entre les acteurs

Durant les discussions avec les acteurs de la filière laitière à Abidjan, il est ressorti que le métier de producteur et de vendeur de lait a été appris dans le pays d'origine (Mali, Burkina Faso, Guinée). Les activités de l'éleveur consistent à veiller sur les animaux (gardiennage), assurer leur alimentation en les conduisant sur les pâturages ou en leur procurant du fourrage ou des compléments alimentaires. L'éleveur veille aussi sur l'état sanitaire du troupeau. Il peut être soit le propriétaire des animaux, soit un employé commis pour l'administration de la ferme. Dans tous les cas, il est le principal gestionnaire de la ferme. Les animaux d'un parc à bétail peuvent appartenir à une seule ou plusieurs personnes. Dans le dernier cas, il s'agit d'une association ou d'une entente. A la fin de chaque mois les copropriétaires ou associés évaluent les dépenses à engager et partagent les frais. Les soins des animaux sont cependant individuels. Sur un parc, la gestion du troupeau est assurée par plusieurs personnes. Ce qui permet aux éleveurs de se relayer et de se rendre dans leur pays d'origine régulièrement (chaque 2 ou 3 mois) pour rendre visite à leur famille et leur apporter de l'argent. Ils sont pour la plupart mariés dans leur pays respectifs ou s'y rendent si nécessaire pour se marier. Ils disent être en Côte d'Ivoire uniquement pour se faire de l'argent avant de retourner au pays d'origine. Cela se justifie par le genre de relations qu'ils disent entretenir avec les femmes à Abidjan : *« les femmes que nous avons ici ne sont pas nos épouses, elles sont plutôt nos copines. Car nous ne sommes pas venus ici pour les femmes. Nous sommes plutôt ici pour gagner notre pain »*. En ce qui concerne la vie associative, aucune coopérative, ni association des éleveurs ou vendeurs de lait n'existe. Une entraide naturelle se met en place en cas de maladies ou de problèmes graves. Pour les ressortissants des ces pays voisins qui arrivent

pour la première fois en Côte d'Ivoire et qui aimeraient faire ce métier, ils sont aidés et formés par les anciens.

Malgré l'intérêt de nombreux chercheurs pour cette activité, les éleveurs d'Abidjan reconnaissent qu'aucune structure d'encadrement gouvernementale ne s'intéresse à leur activité, tout comme aucune ONG n'a été mise en place pour aider les producteurs. Les entretiens révèlent que : « *souvent des personnes viennent et on leur dit ce qu'elles veulent savoir et c'est tout. Elles prennent des notes et s'en vont* » ou encore « *qu'on ne nous soutient pas on est livré à nous même ici en Côte d'ivoire* ».

Dans la zone de production, aucune laiterie n'existe pour organiser la collecte et la transformation quotidienne du lait. Ce sont producteurs qui vendent le lait sur place à des consommateurs, des collecteurs-vendeurs, et des vendeurs de lait.

#### 1.4.2 Production et commercialisation du lait

Au cours des discussions, les étapes de la traite ont été décrites. Les seaux et les récipients de la traite sont lavés le soir de la veille de la traite du lait (avec du pain ou de la poudre de savon). Le lendemain, après l'alimentation des vaches, la tétée du veau quelques minutes assure la descente du lait. La quantité de lait produite est variable et dépend des saisons et de l'abondance de l'alimentation. La totalité du lait produit, hormis celui réservé à l'autoconsommation, est vendue. Pour rendre la vente moins aléatoire, les éleveurs fidélisent leur clientèle surtout constituée de revendeurs en leur livrant souvent du lait à crédit ou en leur cédant certaines quantités gratuitement. Par ces moyens, ils parviennent toujours à écouler toute leur production. Le lait est filtré par l'acheteur avec un tamis ou des tissus en nylon pour enlever les contaminants de toute sorte. Ceux-ci peuvent être des poils, des mouches ou des brins de pailles qui tombent dans le lait au cours de la traite.

Quant aux vendeurs, ils commercialisent le lait en fonction des désirs des clients. Certains préfèrent le lait cru, d'autres le lait bouilli. L'un deux rencontré sur le site d'Abobo Derrière-rails reconnaît que : « *nous ne faisons pas bouillir tout le lait. Car il ya certains clients qui demandent le lait cru et d'autres veulent plutôt celui qui est bouilli* ». Généralement le lait fermenté est vendu sur commande ou il s'agit du lait non vendu qui est soumis à une fermentation spontanée dans un bidon sans ajout de ferments.

A la mi-journée entre 11h et 14h, le lait est chauffé pour éviter sa fermentation. Le lait bouilli est le plus demandé selon les vendeurs parce que les consommateurs ne veulent pas perdre du temps à le chauffer avant consommation. En cas de mévente, le lait frais et le lait caillé sont conservés au réfrigérateur et revendus le lendemain. Un lait peut se conserver pendant 3 jours au réfrigérateur à +4°C.

#### 1.4.3 Mode de consommation des acteurs

Pour les producteurs du site de Lièvre rouge, 1 litre de lait est réservé pour l'autoconsommation après chaque traite. En réalité la quantité de lait autoconsommée par jour dépend de la production et de la demande. Certains producteurs préfèrent du lait bouilli et lient cette préférence aux campagnes de sensibilisation des autorités médicales. Ainsi, un informateur rencontré sur ce site reconnaît que « *chez nous on fait bouillir le lait avant de boire car nous avons été sensibilisés à l'hôpital qu'il faut bouillir le lait avant de le consommer* ». Il convient de reconnaître que ce comportement marque un changement radical chez ces éleveurs en provenance des socio-cultures où le lait cru est perçu non seulement comme présentant vertus nutritionnelles, mais aussi des valeurs symboliques. Dans ces sociétés, le « *le vrai Peul est celui qui aime le lait cru* ». Cette diversité des préférences dans les formes de consommation du lait (cru, bouilli, fermenté) est aussi le reflet de la diversité des usages et des perceptions que la population urbaine a de ce produit à la fois prisé et craint. En fait, certaines personnes préfèrent le lait cru non seulement pour des besoins magico-religieux (sacrifices), mais aussi parce qu'elles trouvent que le lait cru est celui qui garde toutes ses propriétés nutritives que le chauffage contribuerait à altérer. Une autre catégorie par contre pense que le lait doit être systématiquement chauffé pour éviter les maladies que ce produit pourrait contenir.

Les producteurs du site de N'Dotré consomment le lait parce que c'est la première chose qui est à portée de main. Le lait qu'il soit cru ou bouilli est servi au petit-déjeuner avec du pain étant donné qu'ils sont éloignés du centre ville et n'ont pas d'autres choix. Le lait est consommé par tous les acteurs du fait de ses vertus thérapeutiques et par habitude. Après chaque repas (riz), le lait est consommé « pour se sentir bien ». Selon eux, un homme doit boire 62 litres de lait par année pour être en bonne santé.

#### 1.4.4 Perception du bon lait par les acteurs

Pour les peuls il n'y a pas de mauvais lait. Le lait est toujours de bonne qualité parce que le lait qu'ils proposent aux consommateurs est aussi consommé par eux-mêmes. Ils n'ont pas encore reçu de plaintes sur la qualité de leur lait. Ils le justifient par le fait que « *Personne n'est venue se plaindre de maux de ventre parce que nos vaches sont vaccinées chaque année* ». Cette affirmation montre que pour ces producteurs, la contamination du lait provient plus des pathologies animales que la vaccination contribuerait à éradiquer, plutôt que de l'hygiène et l'environnement de traite. De plus le lait de vache est préféré parce qu'on le trouve naturel par opposition aux autres laits manufacturés. Ainsi, « *le lait de vache est naturel parce que la vache mange de l'herbe* » par opposition au lait importé dont on ignore la provenance et le mode de production. Le bon lait est reconnu à sa couleur et à son goût.

Le goût du lait permet de faire la différence entre le lait de vache et celui d'autres animaux, entre le lait de vache qui consomme de l'herbe ou des épluchures de bananes ou manioc : « *le goût du lait de vache qui mange de l'herbe et celui de la vache qui mange des épluchures de banane ne sont pas les mêmes car dans l'herbe il ya pas de produits chimiques mais avec les épluchures de bananes c'est rempli de produits chimiques donc cela agit sur la qualité du lait* ». De plus l'expérience dans le métier permet de reconnaître à la seule vue un lait de bonne ou de mauvaise qualité. Pour les vendeurs de lait pour évaluer la qualité d'un lait, il faut assister à la traite pour être sûr qu'il est de bonne qualité. Cela témoigne d'un manque de confiance entre les producteurs et les vendeurs car les premiers cherchent souvent à augmenter leurs marges bénéficiaires en ajoutant de l'eau au lait. Cette méfiance est renforcée par le fait que les vendeurs ne sont pas originaires d'une culture pastorale. L'enquête dans la zone d'étude a montré qu'ils sont pour la plus plupart des commerçants (23,5%) ; boulangers (5,8%) ; cultivateurs (5,8%) ; ménagères (5,8%) ou sans emplois (5,8%). De ce fait, ils ne peuvent pas reconnaître le bon lait uniquement à partir des critères sensoriels. Les expériences passées avec les éleveurs suscitent en eux beaucoup de méfiance sur la qualité du lait qui leur est livrée par ces derniers.

#### 1.4.5 Perceptions des maladies liées à la consommation du lait

Pour tous les acteurs, le lait en lui-même ne peut rendre malade. Pour certains d'entre-eux, le lait consommé, sans être chauffé par manque de temps avant le travail, est capable de donner le paludisme. Cependant ces personnes reconnaissent que : « *le lait simple à lui seul ne peut pas donner le paludisme, ce sont plutôt les microbes qu'il contient* ». Il s'agirait ici des agents

pathogènes contractés lors de la manipulation du lait et non le lait en soi. Pour d'autres, la maladie proviendrait des aliments consommés en même temps que le lait. Ainsi le paludisme serait lié au pain qui accompagne souvent la consommation du lait qui de leur avis est pas de mauvaise qualité. Il est scientifiquement impensable que le lait fut-il de mauvaise qualité puisse transmettre le paludisme. Mais le lien fait par ces consommateurs avec cette maladie dont le mode de transmission est clair et indiscutable, renvoie aux symptômes (vomissements, fièvre, maux de tête) que présentent souvent ceux qui consomment un lait de qualité microbiologique médiocre. Ces symptômes s'apparentent à ceux d'une maladie telle que la brucellose dont le taux de prévalence à Abidjan est de 3,6% et 4,3% respectivement dans les fermes laitières et dans les élevages traditionnels (Thys et *al.*, 2005). En tout état de cause, cette conception de la maladie liée au lait démontre l'insuffisance des informations sur les pathologies. Les trayeurs disent que les mamelles ne sont pas lavées parce qu'il y a plusieurs vaches à traire et donc ce travail est laissé au veau. De plus la queue de l'animal peut projeter du sable ou de la paille dans le lait au cours de la traite. Ces impuretés sont de nature à contaminer le lait si l'environnement de traite est souillé. Pour avoir un lait de bonne qualité, il faut être propre et filtrer le lait pour enlever les débris, le sable etc...

En plus du paludisme, les éleveurs pensent que la consommation du lait peut donner la toux si la mamelle de la vache est mal manipulée ou si le lait n'est pas filtré. Pour les informateurs de Port-Bouët, le lait peut donner la diarrhée si on n'en prend pas soin et s'il n'est pas bouilli parce qu'il peut contenir des microbes ou provenir d'un animal malade. Le lait d'un animal malade n'est pas traité, c'est après la guérison que le lait est traité. Sur l'ensemble des sites, les acteurs pensent qu'il existe certaines personnes qui ne supportent pas le lait et qui ont la diarrhée après consommation malgré le traitement du lait (chauffage et filtration).

## **2 QUALITÉ CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DU LAIT LOCAL**

Maintenant que les perceptions des acteurs de la filière sur la qualité du lait sont connues, quelle est la qualité réelle du lait produit dans la zone d'étude ?

### **2.1 Caractéristiques physico-chimiques du lait**

Dans cette étude, il n'y a pas eu de différence significative entre les pH du lait pris aux différentes étapes de la production à la vente ( $P > 0,05$ ). Les moyennes étaient respectivement

de 6,7 ; 6,8 et 6,9 pour le lait pris directement du pis, le lait de mélange et le lait de vente. Cependant, 29,33% seulement des échantillons de lait prélevés respectaient les standards pH du lait normal ( $6,6 < \text{pH} < 6,8$ ). La température moyenne du lait cru est de  $31,9^{\circ}\text{C}$  ( $\text{min}=27^{\circ}\text{C}$  ;  $\text{max}=34,7^{\circ}\text{C}$ ) à la vente, avec une température ambiante moyenne de  $29^{\circ}\text{C}$  ( $\text{min}=24,1^{\circ}\text{C}$  ;  $\text{max}=34,2^{\circ}\text{C}$ ). Par ailleurs, la mesure de la densité du lait a montré que 50% des échantillons de lait cru en vente aux abords des fermes avaient une densité inférieure à 1,028 ( $1,028 < \text{densité normale} < 1,033$ ). C'est donc du lait mouillé à l'eau.

### 2.2 Présence d'inhibiteurs dans le lait

Sur 150 échantillons de lait cru analysés, 24,7% contenaient des inhibiteurs dont 25,2% du lait cru de ferme et 17,6% du lait de vente. La fréquence varie significativement selon les sites ( $P < 0,05$ ). A Songon, tous les échantillons de lait contenaient des inhibiteurs alors qu'aucun des échantillons analysés à Abobo n'en contenait (tableau XVII).

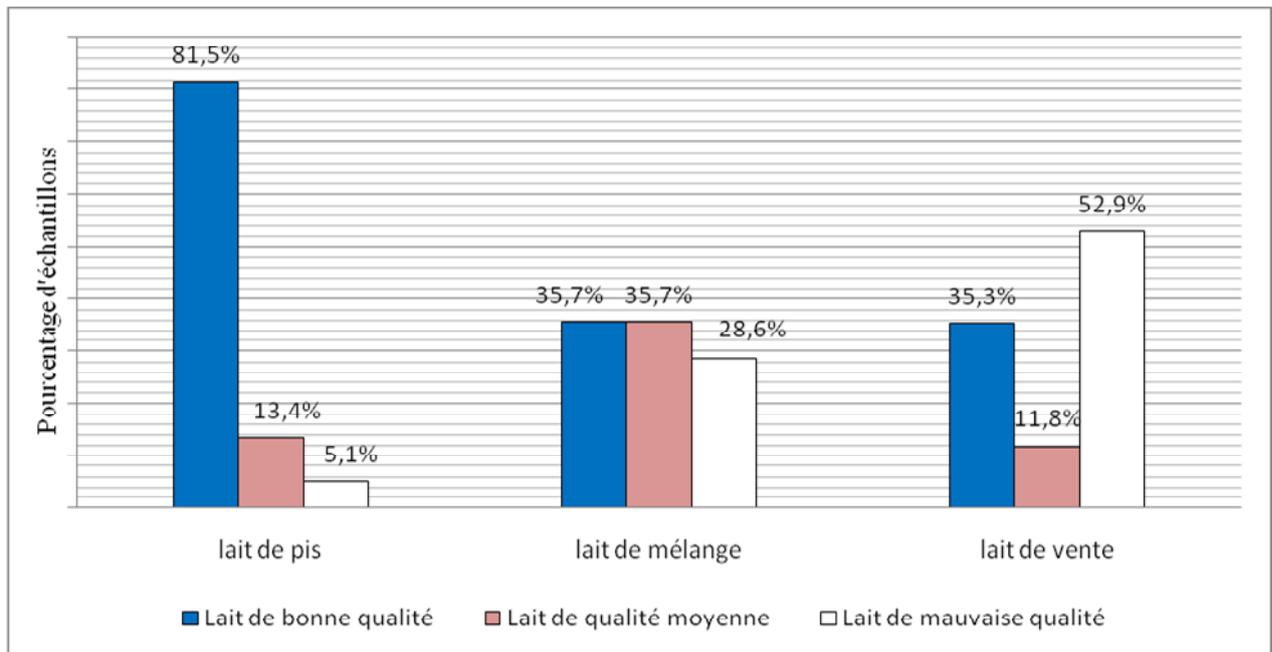
**Tableau XVII** : Présence d'inhibiteurs dans le lait par site

Site	Total des échantillons	Nombre d'échantillons contenant des inhibiteurs	Prévalence des échantillons de lait contenant des inhibiteurs %	[95%IC]
Abobo	7	0	0,0	[0,0 - 43,9%]
Lièvre rouge	39	17	43,6	[28,2 - 60,2%]
N'dotré	65	3	4,6	[1,2 - 13,8%]
Port-Bouët	29	7	24,1	[11,0 - 43,9%]
Songon	10	10	100	[65,5 - 100%]
Total	150	37	24,7	[18,2 - 32,5%]

### 2.3 Qualité globale du lait

Le test à la résazurine permet d'apprécier la charge microbienne d'un lait par l'observation d'une durée de décoloration. En se développant, les bactéries diminuent le potentiel d'oxydo-réduction du lait, ce qui provoque la perte de couleur de l'indicateur coloré bleu. Ce test donc a révélé que 12,7% des échantillons de lait avaient une charge microbienne très élevée (mauvais lait), 15,3% une charge moyenne (lait de qualité moyenne) et 72% avaient une

charge faible (bon lait). Le lait de bonne qualité est le lait pris directement au pis des vaches (81,50%) par opposition au lait en vente dont 52,90% étaient de mauvaise qualité (figure 9).



**Figure 9:** Qualité du lait cru selon le test de la résazurine

La couleur obtenue est fonction de la charge bactérienne du lait.

Couleur bleue : lait faiblement contaminé (moins de 100 000 germes/mL); Couleur rose : lait contaminé (plus de 1 million de germes/mL); Couleur blanche : lait très contaminé (plus de 10 millions de germes/mL).

## 2.4 Les sources de contamination du lait

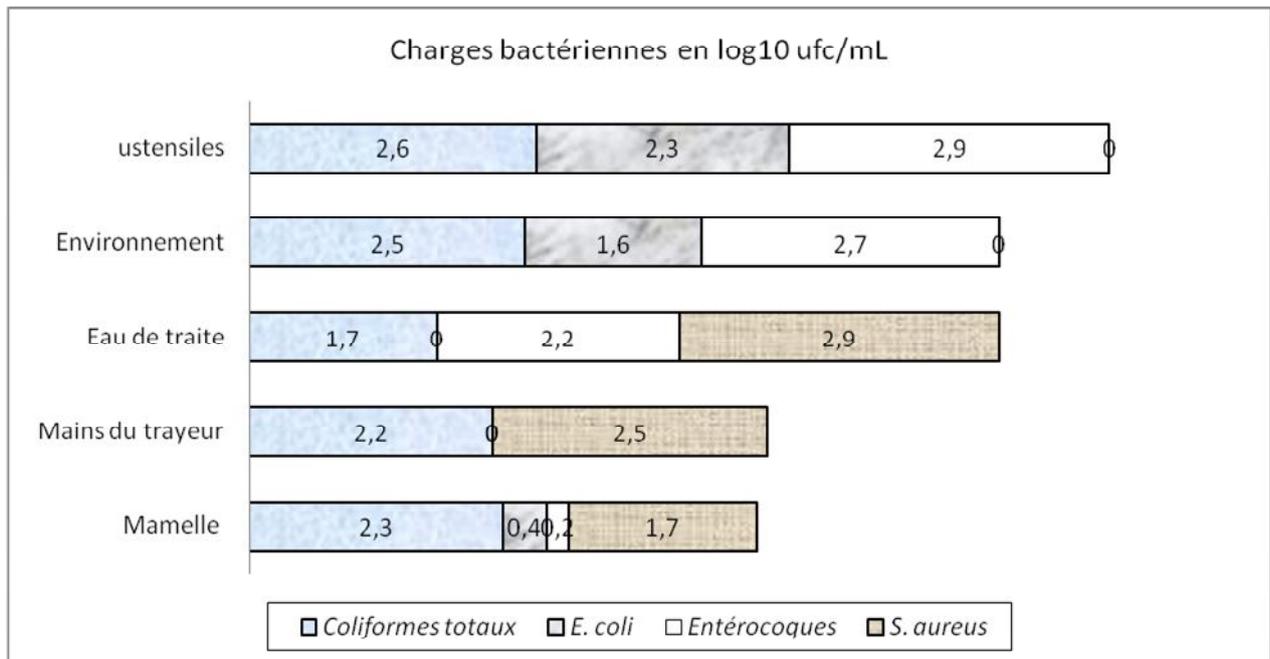
### 2.4.1 Origine de la contamination du lait à la ferme

Les sources de contaminants microbiens du lait sont les ustensiles, l’environnement de la ferme, l’eau de traite, les mains des trayeurs et la mamelle des vaches (Tableau XVIII). Les prévalences d’échantillons contaminés par les bactéries étudiées (*Coliformes totaux*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus*) variaient de 40% pour les mains des trayeurs à 66,7% pour les ustensiles. Les coliformes totaux étaient présents dans tous les types d’échantillons à des charges moyennes variant entre 2,6 log<sub>10</sub>ufc/mL dans les échantillons des ustensiles et 1,7 log<sub>10</sub>ufc/mL dans l’eau de traite (figure 9). *Escherichia coli* et les entérocoques n’avaient pas été détectés dans les prélèvements des mains des trayeurs, mais ont été le plus trouvés dans les prélèvements d’ustensiles (2,3 log<sub>10</sub>ufc/mL et 2,9 log<sub>10</sub>ufc/mL respectivement), d’environnement (1,6 log<sub>10</sub>ufc/mL et 2,7 log<sub>10</sub>ufc/mL respectivement) et à des charges plus faibles (0,4 log<sub>10</sub>ufc/mL et 0,2 log<sub>10</sub>ufc/mL

respectivement) sur les mamelles. Quant aux *Staphylococcus aureus*, ils provenaient essentiellement de l'eau de traite, des mains des trayeurs et des mamelles (figure 10).

**Tableau XVIII:** Prévalence de contaminants microbiens dans les échantillons de l'environnement

	Nombre d'échantillons contaminés	Total des échantillons	Prévalence d'échantillons contaminés [95%CI]
Environnement	5	15	33,3% [13,0-61,3%]
Eau de traite	9	15	60,0% [32,9-82,5%]
Ustensiles	10	15	66,7 % [38,7-87,0%]
Mains des trayeurs	8	20	40,0% [20,0-63,6%]
Mamelles	50	113	44,2% [35,0-53,9%]
Total	82	178	46,1% [38,6-53,7%]



**Figure 10 :** Log<sub>10</sub> des moyennes des charges des contaminants microbiens des échantillons de l'environnement

#### 2.4.2 Points de contaminations du lait

Il y avait une différence significative de la présence de contaminants microbiens dans le lait ( $P < 0,05$ ) de la ferme à la vente. Sur l'ensemble des échantillons de lait cru analysés, aucune *Salmonella* sp. n'avait été isolée. Dans le lait prélevé au pis des vaches, 22,26% des échantillons contenaient des coliformes totaux, 8,40% des *E. coli*, 6,7% des *S. aureus* et 4% des entérocoques fécaux. Dans le lait en vente, les fréquences étaient respectivement de 94,1%, 70,5%, 17,6% et 58,8%. Dans le lait de mélange le nombre d'échantillons contenant les germes étudiés étaient supérieurs à ceux observés dans le lait prélevé au pis des vaches (Tableau XIX).

**Tableau XIX** : Prévalence des contaminants microbiens aux différentes étapes de la chaîne de production

	<b>Nombre d'échantillons contaminés par les bactéries étudiées</b>			
	Présence de Coliformes totaux	Présence de <i>E. coli</i>	Présence de <i>S. aureus</i>	Présence de Entérocoques
Lait de pis (n=118)	27	10	8	5
<b>Prévalence (%)</b>	<b>(22,8%)</b>	<b>(8,4%)</b>	<b>(6,7%)</b>	<b>(4,2%)</b>
Lait de mélange (n=15)	12	6	3	5
<b>Prévalence (%)</b>	<b>(80,0%)</b>	<b>(40,0%)</b>	<b>(20,0%)</b>	<b>(33,3%)</b>
Lait de vente (n=17)	16	12	3	10
<b>Prévalence (%)</b>	<b>(94,1%)</b>	<b>(70,5%)</b>	<b>(17,6%)</b>	<b>(58,8%)</b>
Total (n=150)	55	28	14	20
<b>Prévalence (%)</b>	<b>(36,6%)</b>	<b>(18,6%)</b>	<b>(9,3%)</b>	<b>(13,3%)</b>

#### 2.4.3 Évolution de la charge microbienne du lait de la ferme à la vente

Les charges moyennes en coliformes totaux ( $3,2 \cdot 10^5$  ufc/mL), *Escherichia coli* ( $1,5 \cdot 10^3$  ufc/mL), *Staphylococcus aureus* ( $7,05 \cdot 10^3$  ufc/mL) et Entérocoques fécaux ( $3,1 \cdot 10^3$  ufc/mL) des échantillons de lait de mélange étaient supérieures à celles du lait pris au pis des vaches et

inférieures à celles des échantillons de lait mis en vente. La charge en germes de contamination augmentait progressivement du lait cru du pis au lait de vente (tableau XX).

**Tableau XX :** Charges moyennes (ufc/mL) des germes de contamination du lait cru

	Lait de pis		Lait de mélange		Lait de vente	
	Moyenne (ufc/mL)	Ecart-type	Moyenne (ufc/mL)	Ecart-type	Moyenne (ufc/mL)	Ecart-type
<b>Coliformes</b>	$8,7.10^3$	$54,5.10^3$	$3,2.10^5$	$8,7.10^5$	$9,9.10^5$	$11,8.10^5$
<i>E. coli</i>	$5,5.10^2$	$31,7.10^{2A}$	$1,5.10^3$	$3,7.10^3$	$1,0.10^5$	$1,7.10^5$
<i>S. aureus</i>	$2,1.10^3$	$10,3.10^3$	$7,1.10^3$	$43,8.10^3$	$1,7.10^4$	$1,88.10^4$
<b>Entérocoques</b>	$6,7.10^2$	$3,3.10^2$	$3,1.10^3$	$9,2.10^3$	$3,1.10^4$	$7,8.10^4$

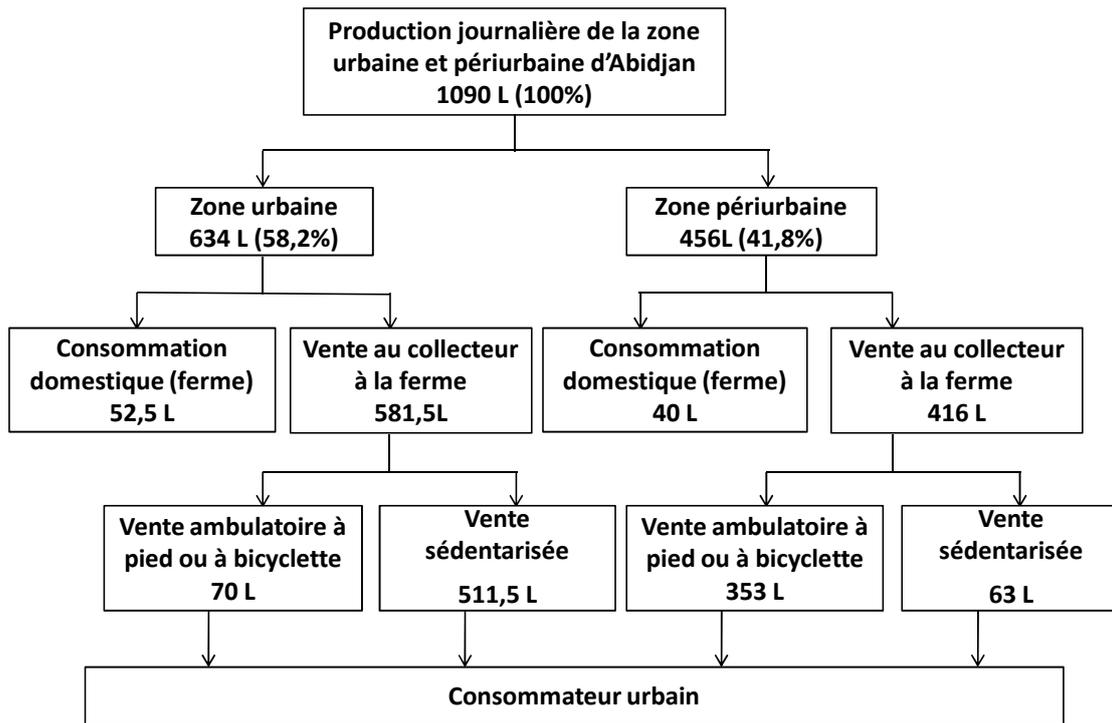
### 3 ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ À LA CONSOMMATION DU LAIT CRU

#### 3.1 Description de la chaîne de production informelle du lait à Abidjan

Hormis le lait consommé à la ferme, tout le lait produit (zone urbaine et périurbaine) est transporté sur les marchés urbains informels de vente d'Abidjan. Les investigations sur les marchés informels de vente de lait cru ont permis de connaître la quantité de lait cru disponible par jour qui est de 1090 litres (tableau XXI). Le lait proposé au consommateur urbain provient pour 58,2% de la zone urbaine et pour 41,8% de la zone périurbaine d'Abidjan. Le lait produit à la ferme que ce soit dans la zone urbaine ou périurbaine d'Abidjan est vendu sur place au collecteur et une partie est autoconsommée. Le lait du collecteur est livré aux vendeurs sédentaires ou vendu directement par le collecteur lui-même. Plusieurs modes de vente sont observés : la vente ambulante à bicyclette ou à pied dans les domiciles ou dans la rue et la vente sédentaire aux abords des routes (Figure 11). Le lait est vendu en absence de système de refroidissement à la température ambiante.

**Tableau XXI** : Estimation de la quantité de lait disponible sur les marchés informels d'Abidjan

<b>Communes</b>	<b>Sites de production</b>	<b>Marchés informels</b>	<b>Quantité estimée par jour (litre)</b>
<b>Port-Bouet</b>	Abattoir	Abattoir	<b>413</b>
	Adjouffou	Adjouffou	
	Bendekosso	Bendekosso	
		Koumassi	
<b>Yopougon</b>	Azito	Azito	<b>390</b>
	Béago	Béago	
	Lièvre rouge	Lièvre rouge	
		yopougon	
<b>Songon</b>	Songon-té	Yopougon	<b>37</b>
		Adjamé	
		Treichville	
<b>Abobo</b>	Abobo Baoulé	Abobo Baoulé	<b>230</b>
	Derrière les rails	Derrière rails	
	Entrée d'Abobo	Entrée d'Abobo	
	N'dotré	N'dotré	
<b>Bingerville</b>	Bingerville	Cocody- Riviera II	<b>20</b>
<b>Total de lait /jour (Litre)</b>			<b>1090</b>



**Figure 11 :** Diagramme présentant la chaîne des valeurs du lait de la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan

### 3.2 Habitudes de consommation du lait

L'enquête sur les habitudes de consommation du lait cru local a montré que la proportion de personnes qui consomment le lait cru directement après achat sans traitement thermique, ni fermentation ( $P_{cc}$ ) est de 51,6% (IC 90%: 45,7 à 57,4%) (Tableau XXII). Parmi les personnes interviewées, 28% consomment le lait quotidiennement et la quantité moyenne de lait consommé est de 0,5 litres /jour / personne (tableau XXII). Plusieurs modes de consommation des ménages ont été observés : dans 58,0% des ménages le lait est consommé par toute la famille, dans 10,6% des ménages, les jeunes consomment seul le lait, dans 4,3% des ménages le lait est destiné uniquement aux enfants et 25,0% des personnes interrogées consomment le lait seul. En se basant sur la moyenne de consommation, et l'estimation de la consommation totale de lait, le nombre ( $N_A$ ) de consommateurs quotidiens de lait local à Abidjan par jour est estimée à 2180 personnes.

**TableauXXII** : Habitudes de consommation du lait

Variables	Caractéristiques	Nombre de consommateurs*	
		(N=188)	(%)
Fréquence d'achat du lait	1 fois par jour	53	(28,2%)
	1 fois par semaine	26	(13,8%)
	2 -3-4 fois par semaine	94	(50,0%)
	>Tous les 15 jours	15	(08,0%)
Quantité de lait consommée par personne par jour	De 100 mL à 0,5l/j	152	(80,9%)
	0,6 à 1l/j	22	(11,7%)
	>1l à 2l/j	14	(07,4%)
	Moyenne 0,5 litre/pers/jour		
Mode de consommation	Direct (seul)	175	(93,1%)
	Lait fermenté	3	(01,6%)
	Mélangé à d'autres aliments (riz, mil, maïs)	10	(05,3%)
Traitement du lait avant consommation	Pas de Chauffage	97	(51,6%)
	Chauffage	91	(48,4%)
Membres du ménage qui consomment le lait acheté	Seul	47	(25,0%)
	Enfants	8	(4,3%)
	Jeunes	20	(10,6%)
	Vieillards	3	(1,6%)
	Toute la famille	110	(58,5%)

\* nombre de répondants « oui » aux caractéristiques ; N=nombre total de répondants

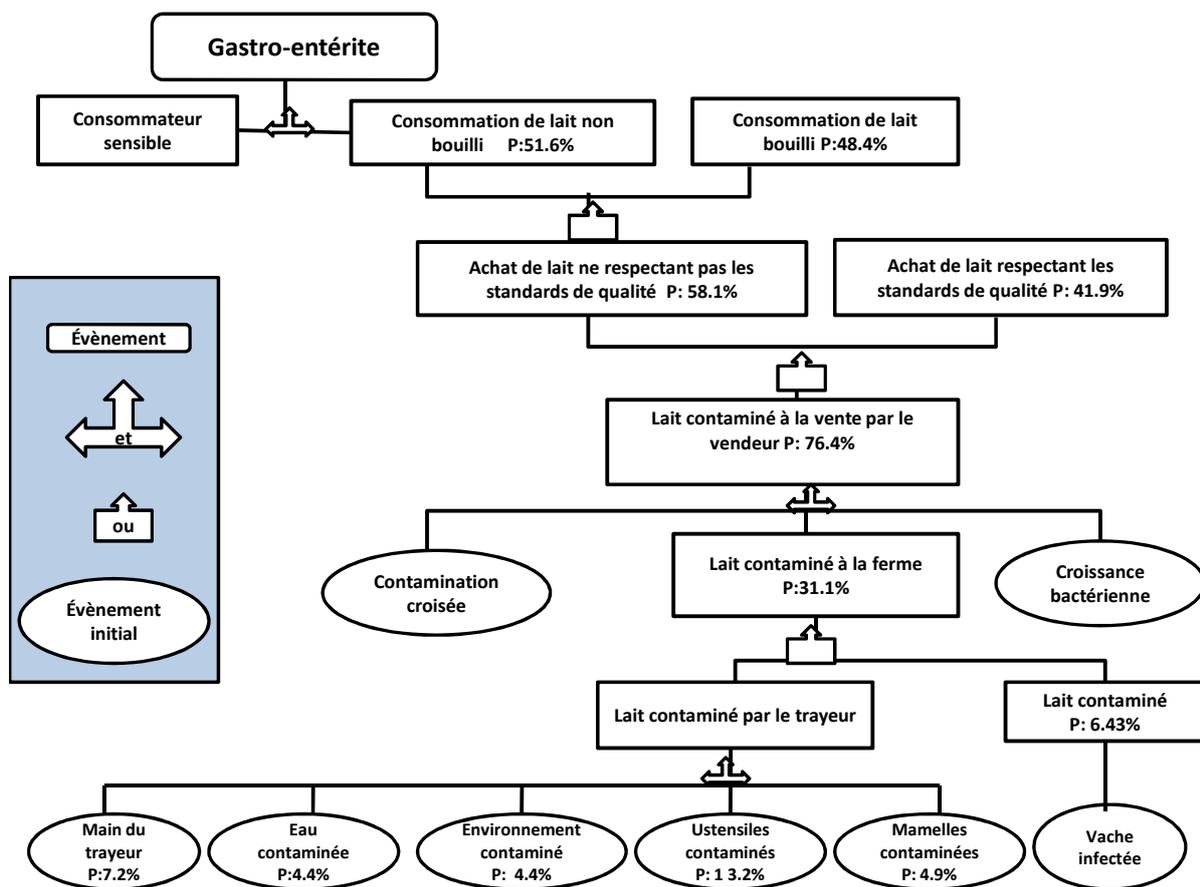
### 3.3 Évaluation du risque

#### 3.3.1 Arbre des défaillances des évènements conduisant à une gastro-entérite après la consommation du lait

La figure 12 présente les évènements intervenants de la ferme au consommateur et qui peuvent aboutir à une gastroentérite après la consommation du lait local. Les bactéries

pathogènes étudiées (*E. coli*, *S. aureus*, *Enterocoques*) interviennent dans la contamination du lait à partir de la vache infectée, des mains des trayeurs (7,2%), de l'eau (4,4%), de l'environnement (4,4%), des ustensiles de traite (13,2%), et des mamelles des vaches (4,9%). Ce sont les évènements déclencheurs de la maladie qui ont été identifiés à la ferme.

Par la suite, une série de contaminations croisées au point de vente (mélange de lait provenant de fermes différentes, les mains sales des collecteurs / fournisseurs, les conteneurs ou bidons sales, les agents pathogènes de l'environnement) conduit à l'achat d'un lait de qualité microbiologique non satisfaisante. L'absence de réfrigération ou de traitement thermique permet la croissance bactérienne, cependant une fermentation naturelle réduira ce phénomène. Ce lait est consommé de deux façons. Il est bouilli dans 48,4% et les risques pour le consommateur sont réduits dans ce cas. Pour le lait non bouilli (51,6% des cas) le risque de gastro-entérite est proportionnel à la sensibilité du consommateur.



**Figure 12** : Arbre des défaillances indiquant les évènements menant à une gastroentérite (crampes abdominales, diarrhée, nausées, vomissements) après la consommation du lait.

Les prévalences (P) sont mentionnées en pourcentage.

### 3.3.2 Identification du danger

Les échantillons de lait de vente analysés montrent la présence des trois pathogènes (*E. coli*, *S. aureus* et *Enterococcus*) dans 76,5% des échantillons (prévalence observée). Les prévalences respectives de *E. coli*, *S. aureus* et *Enterococcus* sont de 70,5%, 17,6% et 58,8% (Tableau XXIII).

**Tableau XXIII** : Prévalence observée de bactéries dans le lait en vente

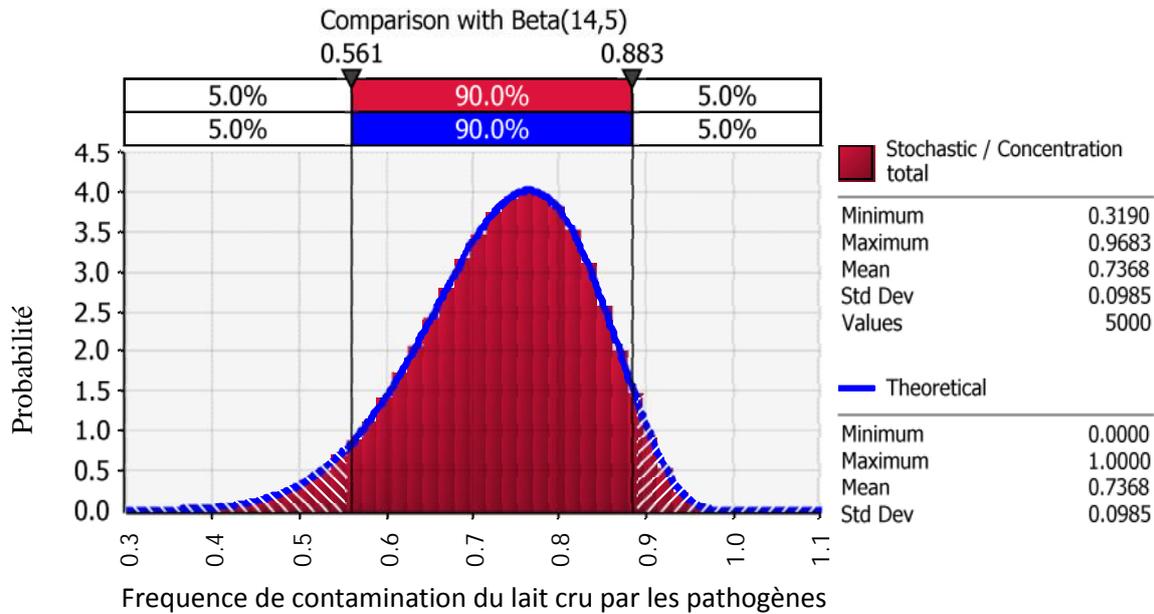
Bactéries	Prévalence de contamination du lait
<i>E. coli</i>	70,5%
<i>S. aureus</i>	17,6%
<i>Enterococcus</i>	58,8%
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Enterococcus</i>	76,5%

Sur la base des résultats de la fréquence de contamination du lait (observée), des simulations de Monte Carlo ont été réalisées avec 5000 itérations à partir des données et des distributions du tableau XXIV.

Après les simulations, la probabilité de lait en vente contaminée avec au moins l'un des pathogènes est de 73,7% (90% IC: 56,1 – 88,3%) (figure 13). Les probabilités spécifiques de contamination par *E. coli*, *S. aureus* et *Enterococci* sont 68,4% (90% IC: 50,2 % – 84,4%), 21,5% (90% IC: 8% – 37,7%) et 57,9% (90% IC: 39,2% – 75,6%) (tableau XXV). La moyenne de la charge bactérienne du lait commercialisé est de  $10^5$ UFC/mL.

**TableauXXIV** : Données d'entrée du modèle pour les simulations de Monte Carlo

<b>Variables</b>	<b>Distribution/modèle</b>
$N_A$	$Q_{mi}$ / quantité journalière de lait cru consommée
$Q_c$	$Q_{mi} * P_p$
$P_{E.coli}$	Beta (12+1, 17-12+1)
$P_{S.aureus}$	Beta (3+1, 17-3+1)
$P_E$	Beta (10+1, 17-10+1)
$P_p$	Beta (13+1, 17-13+1)
$C_p$	Discrete Uniform (data)
$P_{cc}$	Beta (97+1, 188-97+1)
$P_{>N}$	Beta (10+1, 17-10+1)
$P_i$	$P_i = P_{cc} * P_{>N}$



**Figure 13:** Simulation de la fréquence de contamination du lait cru par les pathogènes (5000 itérations)

### 3.3.3 Evaluation de l'exposition

La prévalence de lait cru commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique ( $P_{>N}$ ) est de 58,1% (90% IC : 44,0% - 75,8%). La probabilité d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique ( $P_i$ ) pour ce groupe de microorganismes (*E. coli*, *S. aureus* et *Enterococcus*) est de 29,9% (90% IC: 20,1%- 39,5%). En tenant compte de cette probabilité ( $P_i$ ), et du nombre de consommateurs quotidiens de lait de vache local à Abidjan ( $NA$ ), environ 652 (90% IC : 458- 881) consommateurs par jour à Abidjan ingèrent du lait ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique (tableau XXV).

### 3.3.4 Risque de gastro-entérite

L'enquête de consommation a aussi révélé que 12,8% (25/188) des consommateurs ont déjà été malades suite à la consommation de lait local n'ayant subi aucun traitement (tableau XXVI). Ayant environ 2180 consommateurs de lait local par jour dans la zone d'étude, environ 261 d'entre eux sont susceptibles d'avoir contracté une gastro-entérite par jour.

La survenue de la maladie ou gastro-entérite après la consommation du lait local était significativement liée au traitement du lait (ni chauffé, ni fermenté) ( $P= 0,025$   $P<0,05$ ). Les symptômes développés après la consommation du lait étaient la diarrhée, les vomissements, la

fièvre, les crampes d'estomac (tableau XXVII). La diarrhée était le symptôme le plus rencontré avec une prévalence de 7,4% chez les consommateurs.

**Tableau XXV** : Les prédictions obtenues après les simulations (5 000 itérations)

<b>Paramètres</b>	<b>Moyenne</b>	<b>90% IC</b>
Probabilité de lait en vente contaminé par <i>E. coli</i>	68,4 %	50,2 – 84,4%
Probabilité de lait en vente contaminé par <i>S. aureus</i>	21,5%	8,0 – 37,7%
Probabilité de lait en vente contaminé par <i>Enterococcus</i>	57,9%	39,2 – 75,6%
Probabilité de lait en vente contaminé par les pathogènes	73,7%	56,1 – 88,3%
Concentration des pathogènes dans le lait contaminé	10 <sup>5</sup> UFC/mL	0 - 5,2. 10 <sup>5</sup> UFC/mL
Prévalence de lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique ( $P_{>N}$ )	58,1%	44,0 – 75,8%
Proportion de consommation de lait cru (lait non bouilli) ( $P_{cc}$ )	51,6%	45,7 – 57,4%
Probabilité d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique ( $P_i$ )	29,9%	20,1 – 39,5%

IC: intervalle de confiance

**Tableau XXVI** : Effet du traitement thermique du lait sur la survenue de la maladie

	<b>Effectif des personnes malades après consommation du lait</b>	<b>Effectif des personnes saines après consommation du lait</b>
Consommation sans traitement thermique, ni fermentation	18	79
Consommation après traitement thermique ou fermentation	6	85
Total	24	164

**Tableau XXVII:** Symptômes de gastro-entérite développés après ingestion du lait cru

Symptômes	Réponse positive/population totale	Prévalence	
		(%)	[95%IC]
Diarrhées	14/188	7,4%	[4,28 – 12,42%]
Vomissements	1/188	0,5%	[0,02 – 3,38%]
Fièvre	1/188	0,5%	[0,02 – 3,38%]
Fièvre + vomissements	1/188	0,5%	[0,02 – 3,38%]
Crampes d'estomac	4/188	2,1%	[0,68 – 5,71%]
Diarrhées + fièvre + vomissements	3/188	1,6%	[0,41– 4,96%]

IC : Intervalle de confiance

#### 4 GESTION DES RISQUES DE CONSOMMATION DU LAIT

##### 4.1 Réduction du risque par le contrôle de la qualité du lait

###### 4.1.1 Simulation de la réduction du risque de contamination au point de vente

Le tableau 28 indique les probabilités d'ingestion de lait cru contaminé ( $P_{if}$ ) après que l'option de contrôle de la qualité du lait ait été mise en œuvre. Le contrôle aboutira au rejet du lait ne respectant pas les normes, ce qui entrainera une diminution de la prévalence de lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique ( $P_{>N}$ ). Si nous simulons une baisse de prévalence ( $P_{>N}$ ) de 20%, 10% et 5%, il y aura respectivement une baisse de la probabilité ( $P_{if}$ ) de 10,3% (90 % IC : 9.1 à 11.4%), 5,2% (90 % IC : 4,8 - 5,7%) et 2,5% (90 % IC : 2,2 - 2,8%) après 5000 itérations.

Avec ces options, le taux de réduction de la  $P_{if}$  sera respectivement de 19,5% (90 % IC : 9,9 - 29,2%), 24,6% (90 % IC : 14,6 - 34,4%) et 27,2% (90 % IC : 17,1 - 37,2%). La réduction du risque serait plus grande (27,2%) à 5% de  $P_{>N}$  par les rejets de lait ne respectant pas les normes de qualité microbiologique (tableau XXVIII).

#### 4.1.2 Impact économique

Après simulation, la quantité de lait cru en vente contaminé quotidiennement à Abidjan par au moins une des trois bactéries de ce groupe (*E. coli*, *S. aureus* et *Enterococcus*) est de 801 Litres (90% IC : 619,3 - 956,7 L). En prenant en compte le lait contaminé au-delà des niveaux d'acceptabilité pour la consommation humaine (règlement 2073/2005/CE) pour les trois pathogènes étudiés, on a estimé que 624,6 litres (90% IC: 424,6 - 778 L) de lait cru destiné à la commercialisation devraient être jetés tous les jours si le lait est contrôlé. La destruction du lait contaminé entraînerait une perte potentielle par jour de 409252 F CFA (90% IC: 281209 – 504497 F CFA) chez tous les producteurs de la zone d'étude.

#### 4.2 Réduction du risque par les campagnes de sensibilisation

La seconde option de réduction des risques est la mise en œuvre de campagnes de sensibilisation recommandant aux consommateurs de faire bouillir le lait avant sa consommation. Si les campagnes de sensibilisation sur le chauffage du lait conduisent à la diminution de la proportion de la consommation de lait cru ( $P_{cc}$ ) de 20%, 10% et 5%, cela permettrait de réduire la probabilité d'ingestion de lait contaminé ( $P_{if}$ ) de 18,3% (90% IC: 11,7- 25,5%), 24,0% (90% IC: 15,8 - 32,5%) et 27,1% (IC 90%: 17,8 à 34,1%) respectivement (tableau XXVIII).

**Tableau XXVIII:** Probabilités prédites par simulation après les options de contrôle du lait et les campagnes de sensibilisation.

Option de réduction du risque		Probabilité prédite ( $P_{if}$ ) (90% IC)	Taux de réduction (90% IC)
Option de contrôle par le rejet du lait et les bonnes pratiques d'hygiène	$P_{>N} = 20\%$	10,3% (9,1 – 11,4%)	19,5% (9,9 – 29,2%)
	$P_{>N} = 10\%$	5,2% (4,8 – 5,7%)	24,6% (14,6 – 34,4%)
	$P_{>N} = 5\%$	2,5% (2,2 – 2,8%)	27,2% (17,1 – 37,2%)
Campagne de sensibilisation sur le chauffage du lait	$P_{rmc}=20\%$	11,6% (7,7 – 15,1%)	18,3% (11,7 – 25,5%)
	$P_{rmc}=10\%$	5,7% (3,8 – 7,5%)	24,0% (15,8 – 32,5%)
	$P_{rmc}=5\%$	2,9% (1,5 – 3,5%)	27,1% (17,8 – 34,1%)

#### **4.3 Réduction du risque par le potentiel d'inhibition des bifidobactéries**

Les analyses moléculaires ont permis d'identifier 17 souches de bifidobactéries soit une prévalence de 8,9% dans les échantillons. L'évaluation du pouvoir antibactérien de ces bifidobactéries a montré avec le spot test, que 11 souches de bifidobactéries sur 17 (64,7%) avaient une zone d'inhibition allant de 8 à 35 mm de diamètre vis-à-vis des bactéries pathogènes testées (tableau XXIX). L'inhibition est liée à l'acidité du pH du surnageant de culture ; elle est importante entre les pH variant de 3,7 à 4,3. A partir des valeurs de pH égal à 4,42 aucune inhibition n'a été détectée. Après la neutralisation du surnageant de culture de bifidobactéries et son application directe sur gélose par la méthode de diffusion, aucune inhibition des bactéries pathogènes n'a été détectée. Les bifidobactéries testées ne présentaient donc pas d'activités inhibitrices vis-à-vis des bactéries pathogènes liées à la production de bactériocines, mais plutôt à celles d'acides organiques.

**Tableau XXIX** : Potentiel d'inhibition des bifidobactéries vis-à-vis d'une sélection de bactéries pathogènes.

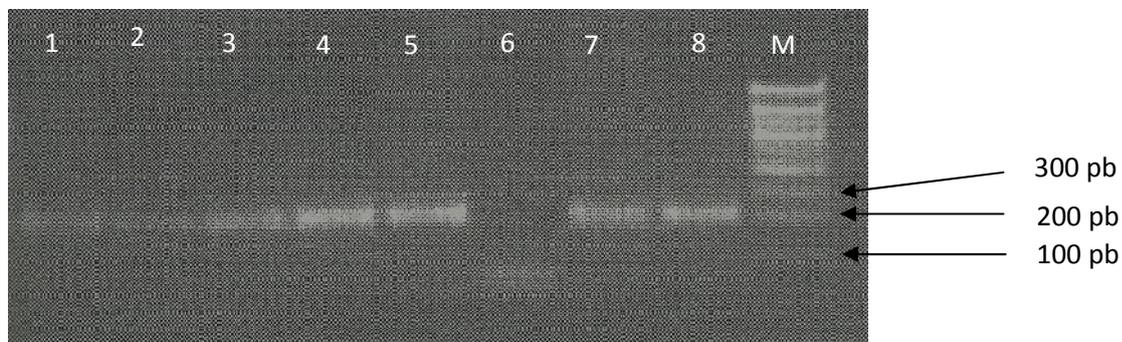
Bifidobacteria isolées	pH du surnageant de culture en MRS	Diamètre d'inhibition (mm) des pathogènes par les bifidobactéries							
		<i>Salmonella</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Escherichia</i>		<i>Listeria</i>	
		<i>hadar</i> (S066)	<i>typhimurim</i> (S0157)	<i>aureus</i> (S0156)	<i>aureus</i> (S0155)	<i>coli O26</i> (S0347)	<i>coli O157:H7</i> (S0231)	<i>monocytogenes</i> (S0580)	<i>monocytogenes</i> (S0154)
*CI 6	3,75	35	27	28	30	22	12	20	23
CI 16	3,76	23	28	23	28	20	30	20	23
CI 22	3,76	30	30	24	24	22	24	33	25
CI 21	3,77	21	26	22	25	22	30	20	29
CI 40	3,77	17	22	18	32	20	26	21	23
CI 42	3,77	22	27	16	32	20	22	28	23
CI 14	3,81	20	20	22	30	22	28	28	23
CI 34	3,86	21	26	19	28	21	23	25	20
CI 13	4,09	25	30	22	31	26	25	20	22
CI 31	4,11	22	20	14	30	29	12	20	26
CI 36	4,33	16	8	8	19	16	9	20	18
CI 46	4,42	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 43	4,43	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 35	4,55	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 20	4,64	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 38	4,78	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 53	4,90	0	0	0	0	0	0	0	0

\*CI : Numéro de laboratoire des souches de bifidobactéries de Côte d'Ivoire

## 5 DIVERSITÉ GÉNOTYPIQUE DES ESPÈCES DE BIFIDOBACTÉRIES

### 5.1 Identification moléculaire

Les 17 souches de Bifidobactéries c-à-d les isolats ayant l'activité F6PPK ont été confirmées par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes hsp60 (heat shock proteins de 60 KDa) et 16s rDNA. Les fragments de 217 pb (figure 14) caractéristiques du gène hsp60 et 1050 pb (figure 15) du gène 16s rDNA du genre *Bifidobacterium* ont été observés dans toutes les souches présomptives.



**Figure 14:** Gel d'agarose 2% présentant le fragment de 217 pb du gène hsp60

Lignes 1 à 5 et 7 : souches positives de *Bifidobacterium* de CI ; ligne 6 : Blanc, témoin négatif ; ligne 8 : Témoin positif ; M : Marqueur de poids moléculaire SmartLadder SF (100 à 1000 pb)



**Figure 15 :** Gel d'agarose 2% présentant le fragment de 1050 pb du gène 16s rDNA

Ligne 1 : Blanc, témoin négatif ; ligne 2 et 6 : souches négatives ; ligne 3 à 5 et 7 et 8 : souches positives de *Bifidobacterium* de CI; M : Marqueur de poids moléculaire SmartLadder (200 à 10000 pb)

## 5.2 Séquences consensus du gène hsp60 des Bifidobactéries isolées

Pour les 17 souches de bifidobactéries isolées, les séquences du gène hsp60 sont conservées avec une similitude allant de 89 à 100% (moyenne de 97,24%). Pour *B. minimum*, au sein de la même espèce, il existe une similitude entre les séquences de hsp60 qui varient de 95 à 99% avec une moyenne de 97,56%. En ce qui concerne les espèces de *B. pseudolongum*, les séquences ont été très conservées. La similitude allait de 95 à 100% avec une moyenne de 98,2%. *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum* et *B. magnum* ont respectivement montré une similitude de 98%, 97% et 89% des séquences.

Certaines régions du gène hsp60 sont spécifiques des souches de Côte d'Ivoire. Ces spécificités ont conduit à déterminer par rapport aux souches de références (Genbank), des séquences consensus pour chaque espèce identifiée (Figure 16).

>Consensus CI 13

TGGTATTGAGCTTGCAAGCGAAGCAATTGTTAAGGAATTGCTCGCAGCAGCTAAGGATGTAGAAACCAAG  
GAGCAGATTGCTGCAACTGCAACAATTTCTGCTGCAGATCCAGAAGTGGGCGAGAAGATCGCTGAGGCTT  
TGGACAAGGTCGGCCAGGACGGA

>Consensus CI 14

CGTGGCCGGATCCAACCCCATCGCCCTTCGTTCGTGGCATCGAGAAGGCTTCGGCGGCCATCGTCAAGGAG  
CTCATAGCCAGCGCCAAGGACGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCGACGGCCACGATCTCCGCCGCG  
GACCCCGAGGTCGGAGAGAAGATCGCCGAGGCTCTGGACAAGGTCGGCCAGGACGGA

>Consensus CI 16

TTTGTGCATGAGGGTCTCAAGAACGTCGTGGCCGGATCCAACCCCATCGCCCTTCGTTCGTGGCATCGAGAA  
GGCTTCGGCGGCCATCGTCAAGGAGCTCATAGCCAGCGCCAAGGACGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGC  
GGCGACGGCCACGATCTCCGCCGCGGACCCCGAGGTCGGAGAGAAGATCGCCGAGGCTCTGGACAAGGT  
CGGCCAGGACGGA

>Consensus CI 20

CCAACCCGATTGCCCTGCGTCGCGGCATCGAGAAGGCTGCCGACGAAATCGTCAAGGAACTGGTCGCTTC  
CGCCAAGGATGTGGAGACCAAGGACCAGATCGCAGCCACCGCAGACGATTTCTGCTGCTGATCCTGAGGT  
CGGCGAGAAGATCGCCGAGGCGCTTGACAAGGTCGGCCAGGACGGA

>Consensus CI 21

GGGTTCCAAAAGGGAAGCTCCATAAGCCACGCGCCAAGGACGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCGA  
CGGCCACGATCTCCGCTGCGGACCCCGAGGTCGGAGAGAAGATCGCCGAGGCTCTGGACAAGGCGGGCC  
AGGACGGAG

>Consensus CI 22

TTTGTGCATGAGGGTCTCAAGAACGTCGTGGCCGGATCCAACCCCATCGCCCTTCGTTCGTGGCATCGAGAA  
GGCTTCGGCGGCCATCGTCAAGGAGCTCATAGCCAGCGGCCAAGGACGTCGGAGACCAAGGAGCAGATC  
GCGGCGACGG

>Consensus CI 31

GGGCAGGAGGGTTTGAAGAACGCTGTGGCCGCTTCGAACCCGATCGCCGTGCCGCGCGGCATCGAGAAGG  
CCTCCGACGCGATCGTCAAGGAACTCGTGGCCTCCGCCAAGCCGGTGGAGACCAAGGAGCAGATCGCCGC  
GACCGCGACGATCTCCGACGCCGACCCCGAGGTCGGCGGAAGATCGCACGAGGCGCTCGACAAGGTTCG  
GCCAGGATGGTGTGGTGACCGTCGAGGACAACAAGCGCTTCGAA

>Consensus CI 34

CCCCCGTACCTCGGGGGGCCGAGCGGAGAGCGTGGCCGTCGCCGCGATCTGCTCCTTGGTCTCGACGTCC  
TTGGCGCTGGCTATGAGCTCCTTGACGATGGCCGCCGAAGCCTTCTCGATGCCACGACGAAGGGCGATGG  
GGTTGGATCCGGCCACGACGTTCTTCAGACCCTCATGCAC

>Consensus CI 35

GTTGTGGCCGGTTCGAACCCGATCGCGCTGCGCCGTGGCATCGAGAAGGCCTCCGACGCGATCGTCAAGG  
AACTCGTGGCCTCCGCCAAGCCGGTGGAGACCAAGGAGCAGATCGCCGCGACCGCGACGATCTCCGCAGC  
CGACCCCGAGGTCGCGGAGAAGATCGCCGAGGCGCTCGACAAGGTCGGCCAGGATGGTGTGGTGACCGT  
CGAGGACAACAAGCGCTTCGAA

**Figure 16 :** Liste des séquences consensus du gène hsp60 des espèces de *Bifidobacterium* de Côte d’Ivoire. (Les séquences consensus des espèces qui ne figurent pas ici sont en annexes VIII)

### 5.3 Profil phylogénique

Une analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène *hsp60* des souches d'Abidjan ainsi que celles des séquences de la GenBank de chaque espèce et sous-espèces reconnues du genre *Bifidobacterium* a été réalisée. Cette analyse a débouchée sur la construction d'un arbre phylogénétique (figure 17).

Cet arbre phylogénétique confirme l'identification phylogénétique des 17 souches de bifidobactéries de Côte d'Ivoire. Les souches isolées forment 3 groupes différents.

Le premier groupe contient plusieurs sous-groupes dont trois sous-groupes formés par les souches de bifidobactéries de Côte d'Ivoire.

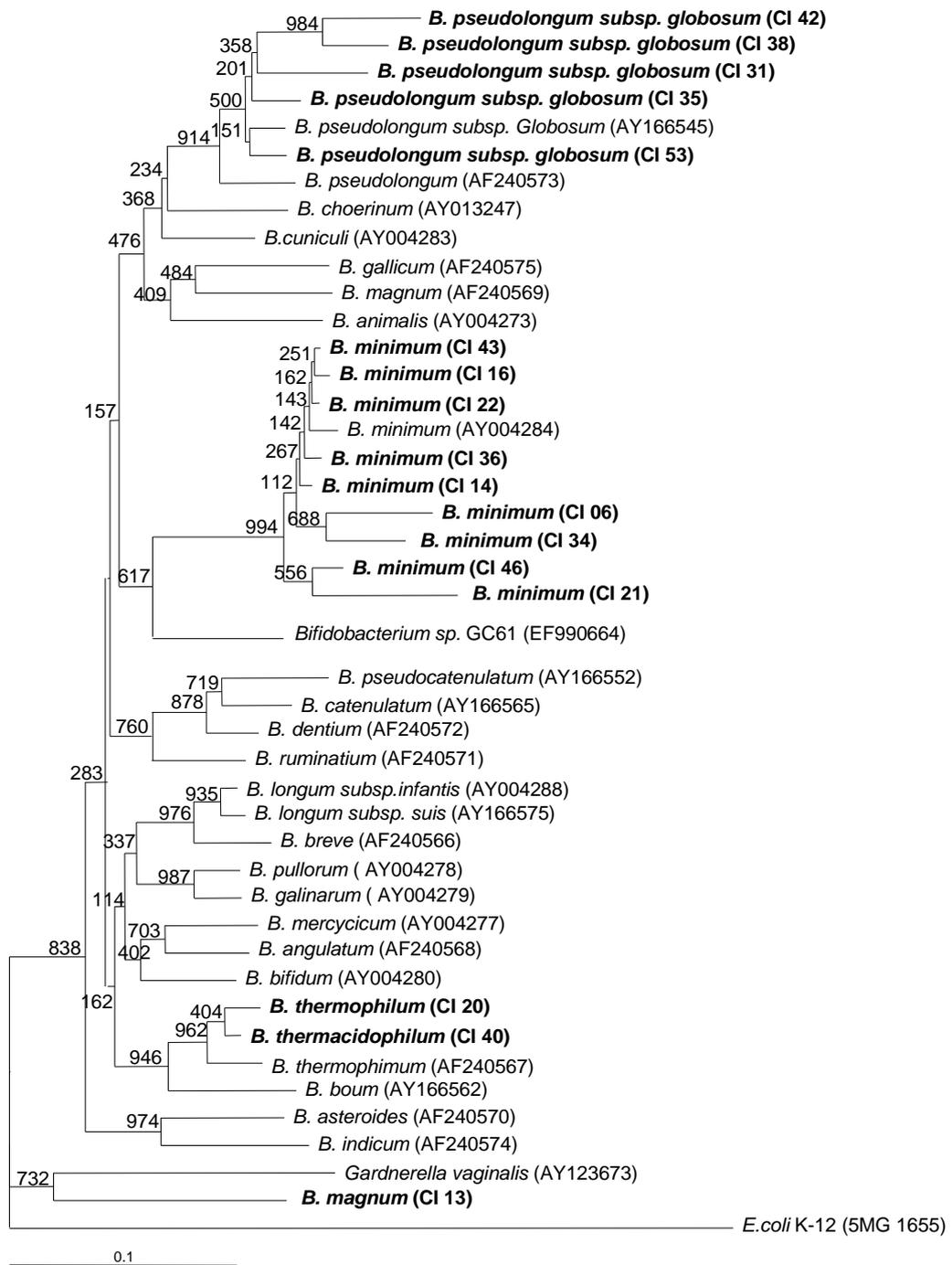
-*B. pseudolongum* subsp. *globosum* CI 42, CI 38, CI 31, CI 35 et CI 53 forment un sous-groupe avec les souches de référence *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (AY166545) et *B. pseudolongum* (AF240573). Ces souches *B. pseudolongum* subsp. *globosum* CI 42, CI 38, CI 31, CI 35 et CI 53 ont été isolées spécifiquement des mamelles des vaches sur le site de Lièvre rouge.

-*B. minimum* CI 43, CI 16, CI 22, CI 36, CI 06, CI 34, CI 14, CI 46, CI 21 et la souche de référence *B. minimum* (AY004284) forment un autre sous-groupe. Ces souches de *B. minimum* d'Abidjan ont été isolées sur toute la chaîne de production (mamelles de la vache, mains du trayeur, lait de pis, lait de vente) et aussi bien sur le site de Port-Bouët que sur celui de Lièvre rouge.

-*B. thermophilum* CI 20, *B. thermacidophilum* CI 40 et *B. thermacidophilum suis* (AY166560) forment un même sous-groupe avec *B. thermophilum* (AF240567) et *B. boum* (AY166562). Ces souches CI 20 et CI 40 proviennent respectivement du lait de vente prélevé sur le site de Port-Bouët et de la mamelle provenant du site de Lièvre rouge.

Le groupe 2 est formé par les souches de référence *B. asteroides* (AF240570) et *B. indicum* (AF240574).

*B. magnum* CI 13 et *G. vaginalis* (AY123673) forment un groupe indépendant (le groupe 3).



**Figure 17:** Arbre phylogénétique basé sur la séquence partielle du gène hsp60.

L'arbre est enraciné avec *Escherichia coli* et construit en utilisant l'algorithme neighbour-joining. Les valeurs données à chaque nœud expriment le taux de similitude sur 1000 bases (bootstraps method). Les chiffres entre parenthèses correspondent aux numéros de la GenBank. Les souches de la Côte d'Ivoire sont en gras et précédées de CI.

L'échelle 0,1 correspond aux divergences de séquences.

#### 5.4 Origine de la contamination du lait par les bifidobactéries

L'origine de la contamination du lait par les bifidobactéries a été déterminée (tableau XXX). En tenant compte du nombre (n) d'échantillons analysés, les mains des trayeurs ont été les plus contaminées par *Bifidobacterium* avec une prévalence de 14,3%. Par contre, il n'y avait pas de différence significative dans la prévalence des *Bifidobacterium* ( $P=0,3$ ) par type d'échantillons selon le Modèle Linéaire Généralisé (GLM) avec les erreurs binomiales.

Au cours de l'étude, des prélèvements ont été réalisés sur trois sites de production laitière qui sont Port-Bouët, Lièvre rouge et Abobo. Le tableau XXXI montre les opérateurs de la filière laitière chez lesquelles des souches de bifidobactéries ont été isolés. Dans 100% des fermes de Lièvre rouge, les bifidobactéries ont été isolées, contre 0% chez les vendeurs de ce site. Par contre sur le site de Port-Bouët, dans 50% des fermes, les bifidobactéries ont été isolées et identifiées.

En utilisant le modèle simplifié de la régression multiple par la GLM avec les erreurs binomiales, il n'y avait aucune interaction significative entre la prévalence des bifidobactéries et les facteurs comme le site d'échantillonnage et les opérateurs (producteurs, vendeurs) ( $p=0,065$ ). Le site n'avait pas été un facteur influençant la prévalence de bifidobactéries dans le lait ( $p=0,24$ ).

Par contre, le type d'opérateur a été un facteur qui influe sur la présence de bifidobactéries dans le lait. La prévalence de bifidobactéries dans le lait chez les vendeurs (13,3%) était significativement inférieure à celle obtenue chez les producteurs (66,7%,  $p=0,026$ ).

**Tableau XXX** : Distribution des souches de *Bifidobacterium* à différents niveaux de la chaîne de production

Type de prélèvement	Total des échantillons (n)	Echantillons <i>Bifidobacterium</i> positifs	Prévalence de <i>Bifidobacterium</i> % (95% IC)
Mains des trayeurs	14	2	14,3% (2,5 - 43,8%)
Mamelle	65	9	13,8% (6,9 - 25,2%)
Lait de pis	74	4	5,4% (1,7 - 13,9%)
Lait de mélange	6	0	0,0% (0,0 - 4 8,3%)
Lait en vente	30	2	6,7% (1,2 - 23,5%)
<b>Total</b>	<b>189</b>	<b>17</b>	<b>8,9% (5,5 - 14,2%)</b>

95% IC: 95% d'intervalle de confiance

**Tableau XXXI**: Sites d'isolement de bifidobactéries

Site	Opérateurs	Effectif des acteurs	Sites de détection de bifidobactéries
Port-Bouët	Vendeurs de lait	6	2 (33%)
	Producteurs	4	2 (50%)
Lièvre rouge	Vendeurs de lait	2	0 (0%)
	Producteurs	2	2 (100%)
Abobo	Vendeurs de lait	7	0 (0%)
<b>Total des acteurs</b>		<b>14</b>	<b>6 (42,9%)</b>

### 5.5 Distribution des espèces de *Bifidobacterium* isolées à différents niveaux de la chaîne de production

Sur 189 échantillons analysés dans la chaîne de production du lait, 17 (8,9%) contenaient des souches de *Bifidobacterium*. Après l'analyse des séquences nucléotidiques des fragments amplifiés des gènes hsp60 (figure 14) et 16s rDNA (figure 15), cinq (5) espèces différentes de bifidobactéries ont été identifiées. Ce sont : 9 souches de *B. minimum* (52,9%) dont 3 ont été isolées du lait pris au pis, 3 autres sur les mamelles des vaches, 2 sur les mains des trayeurs et 1 dans le lait en vente ; 5 souches de *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (29,4%) ont été isolées seulement sur les mamelles ; une souche (5,88%) de chacune des espèces suivantes: *B. thermophilum* isolée du lait en vente, *B. thermacidophilum* subsp. *suis* isolée sur la mamelle et *B. magnum* isolée du lait pris au pis.

## **6. LA COMMUNICATION DU RISQUE DE CONSOMMATION DU LAIT LOCAL**

La communication sur les risques liés à la consommation du lait local s'est faite tout le long du processus d'analyse des risques par un procédé interactif d'échanges d'informations et d'opinions entre notre équipe et les éleveurs, les vendeurs et les parties prenantes de la filière laitière à Abidjan. Cet échange d'informations a été d'abord réalisé lors de l'atelier du 29 Janvier 2009 organisé par le projet « Safe Food Fair Food » sur « l'analyse situationnelle de la gestion de la sécurité sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale en Côte d'Ivoire », qui rassemblait les acteurs gouvernementaux, les techniciens d'élevage et les organismes en charge de la sécurité sanitaire des aliments en Côte d'Ivoire. De plus au cours des focus group et de l'enquête sur les habitudes de consommation du lait à Abidjan, les producteurs, les vendeurs et les consommateurs ont été sensibilisés sur les dangers présents dans le lait local, sur les pratiques à risques à bannir, les bonnes pratiques d'hygiène et sur la pasteurisation du lait avant toute consommation. Un colloque national été aussi organisé par le projet du 2 au 4 Juin 2010 au CSRS sur le thème « Analyse participative des risques des denrées alimentaires d'origine animale ». Ce colloque avait pour ambition de faire le bilan de l'analyse des risques et de partager les expériences. C'était aussi un espace de réflexion sur les cadres réglementaires, les stratégies nationales et les outils d'une meilleure pratique de l'analyse des risques dans la production des aliments en vue de réduire les risques de maladies chez les populations et améliorer l'accès au marché.

## 7. DISCUSSION

L'évaluation du risque associée à la consommation du lait produit dans la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan a été réalisée à travers une analyse de la filière laitière bovine, de la contamination du lait par les pathogènes et du comportement des consommateurs.

Le diagnostic de la filière laitière de la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan révèle un système d'élevage laitier traditionnel avec des fermes laitières de petites tailles et de faible production. Cette faible productivité est propre aux races locales de la sous-région ouest africaine. Ce niveau de rendement est pratiquement le même dans 98,5% des élevages traditionnels de la zone périurbaine de Bobo-Dioulasso au Burkina Faso, avec une production de lait variant de 0,72 à 1,5 litre par vache et par jour (Hamadou et *al.*, 2003). Par contre, pour les fermes du Projet Laitier Sud installées dans la région d'Abidjan, constitué d'élevages semi-intensifs et bénéficiant d'un encadrement, la moyenne de production était plus importante, soit  $27,6 \pm 10,63$  litres par ferme ( $4,3 \pm 0,8$  litres/vache/jour) (Yapi-Gnaoré et *al.*, 2009). Ces élevages semi-intensifs s'appuyaient sur des projets de développement laitier alors que pour les deux premiers cas, il s'agit d'élevage informel inspiré par la demande du marché mais qui repose davantage sur des investissements effectués soit par des commerçants ou des hommes d'affaires sur le bénéfice généré par leurs activités principales, soit par des particuliers sur leurs épargnes personnelles.

L'analyse du comportement des acteurs de la filière locale est un outil important de caractérisation des facteurs de risques de contamination du lait. La gestion traditionnelle des fermes favorise la production de lait contaminé en raison des mauvaises pratiques des producteurs au nombre desquelles l'on peut citer la libre circulation dans les parcs à bétail des animaux de différentes espèces comme les volailles, les caprins, les ovins, les chiens, l'absence de système de nettoyage des déjections et de gestion des déchets. De plus, 46,7% des parcs à bétail étaient situés à proximité d'une décharge ; si l'on peut voir dans cette proximité une tendance urbaine à pousser cette activité marginale vers la périphérie (Kouakou et *al.*, 2010), il faut aussi penser que la présence des parcs à cet endroit relève de la volonté des éleveurs à faire profiter à leurs animaux des détritiques qui sont régulièrement déversés dans ces décharges. Par ailleurs, dans 60% des fermes, l'eau utilisée pour l'abreuvement des vaches et pour les opérations d'hygiène lors de la traite n'est pas désinfectée et s'est avéré contaminée par des germes lors de nos analyses au laboratoire.

La mauvaise qualité du lait et la chute de la production laitière dans les fermes étaient également dues aux mauvais résultats de l'évaluation sanitaire des animaux. En effet au cours des deux mois précédant l'enquête il y a eu des symptômes d'infections bactériennes telles que les mammites cliniques, les avortements et les diarrhées des vaches, la mort de veaux, les affections respiratoires ect... Toutes ces affections sont significativement associées aux risques de contamination du lait produit. Par ailleurs, la brucellose est souvent confondue chez le bétail avec d'autres causes fréquentes d'avortements qui, davantage baissent la fertilité déjà faible du bétail de race africaine. Selon Bonfoh *et al.* (2002), la diminution de la fertilité des vaches dans la zone périurbaine de Bamako (Mali) a été évaluée à environ 18% chez les vaches séropositives (*Brucella melitensis* et *Brucella abortus*). La prise en charge sanitaire des animaux n'avait pas changé dans les fermes une année avant le démarrage de notre étude. Les éleveurs n'ont pas pris de mesures adaptées pour améliorer la santé des animaux afin de produire du lait de bonne qualité. Des travaux précédents ont montré qu'au sein d'un élevage, les principales sources de contamination par les *Salmonella*, sont les fèces des animaux malades ou des porteurs asymptomatiques, les aliments d'animaux souillés comme l'eau d'abreuvement, les fourrages et les compléments alimentaires (Heuchel *et al.*, 2001). Les traitements antibiotiques permettent de limiter ou de guérir les signes cliniques mais pas l'excrétion des bactéries qui peut durer 6 mois. Les vaches atteintes de Salmonellose ont une production laitière diminuée, un taux d'avortement de 3,4% et un taux de mortalité de 4% (Vallet & Marly, 1995). De plus, la contamination inter-espèces est possible surtout avec la cohabitation existante entre les vaches dans les fermes et d'autres animaux d'espèces différentes. L'environnement des fermes de l'étude aura donc un impact certain sur la qualité du lait produit. La traite du lait dans les fermes à Abidjan est manuelle et les mauvaises pratiques hygiéniques des trayeurs (eau de traite de mauvaise qualité, ustensiles de traite mal lavés, mains sales des trayeurs, particules de bouses passant dans le lait lors de la traite, mamelles sales non nettoyées) constituent un risque évident de contamination microbienne.

La qualité globale du lait a été évaluée par le test à la résazurine qui permet d'apprécier la charge microbienne du lait à travers l'observation de la durée de décoloration. De la traite à la vente, la qualité du lait s'altère rapidement. La proportion de lait de bonne qualité avait chuté de 81,50% à 35,30%. Le dénombrement des microorganismes a révélé que la peau des mamelles portait tous les germes recherchés (Coliformes totaux, *E. coli*, *S. aureus*, et Entérocoques fécaux). Les mamelles de certaines vaches seraient plus contaminées que d'autres et l'effet additif contribue à la baisse de la qualité du lait de mélange.

En plus des contaminations liées aux mamelles, *S. aureus* était apporté secondairement dans le lait par l'eau de traite et les mains des trayeurs ; *E. coli* par l'environnement et les ustensiles ; les Entérocoques par l'environnement, l'eau de traite et les ustensiles. Cette altération rapide de la qualité microbiologique du lait est en partie liée aux conditions hygiéniques de la traite, notamment la qualité hygiénique des mamelles et des ustensiles de récolte (calebasse, bidon du berger) et des conditions de vente (bidons du vendeur, température ambiante). La présence de chiens et de rongeurs dans l'environnement des vaches peut constituer une source de contamination des ustensiles qui ne sont pas rangés hors de portée de ces animaux. Généralement, dans les élevages, les déjections des bovins constituent le principal réservoir des coliformes, en particulier de l'espèce *E. coli* mais aussi des Entérocoques fécaux. Cette contamination a été étudiée par Smoot & Pierson (1997) sur des échantillons de lait de mauvaise qualité bactériologique, dans lesquels la teneur en coliformes est élevée. En dehors de la source fécale, des mains des trayeurs et des ustensiles, la contamination du lait peut être aussi due à l'excrétion mammaire en cas d'infection à *E. coli* (Sommelier & Heuchel, 1999 ; Gran et al., 2002). *S. aureus* et *Enterococcus* peuvent aussi avoir une origine intra-mammaire due aux mammites sub-cliniques des vaches. Les infections mammaires à *S. aureus* constituent la principale source de contamination du lait à la production (FIL, 1991). Cette bactérie est responsable d'une proportion importante des mammites sub-cliniques et chroniques chez la vache laitière, et d'environ un tiers des mammites cliniques. Les quantités de *S. aureus* excrétées dans le lait des quartiers infectés peuvent être considérables, de  $10^3$  à  $10^5$  bactéries/mL en moyenne, mais pouvant atteindre  $10^6$  bactéries/mL en cas d'infection sub-clinique, et jusqu'à  $10^8$  bactéries/mL en cas d'infection clinique (FIL, 1991). De plus, le pH ou la densité de 50% des échantillons de lait cru en vente montrent à l'évidence que ces échantillons étaient mouillés à l'eau par les vendeurs pour augmenter leur revenu. Cette eau de mouillage, qui n'est pas toujours potable est une source de contamination non négligeable. Cette pratique est plus fréquente sur les sites de lièvre rouge. Elle est aussi rencontrée à Bamako, au Mali en 2003, où 22% du lait frais local étaient mouillés à l'eau (Bonfoh et al., 2003b). Un lait ne doit normalement pas contenir d'antibiotiques et/ou de résidus de médicaments. Mais sur 150 échantillons de lait cru analysés, 24,7% contenaient des inhibiteurs de la fermentation qui pourraient être des résidus antibiotiques ou de médicaments vétérinaires. Ces chiffres traduisent l'ampleur de l'utilisation des ces produits dans les fermes laitières à Abidjan. Généralement c'est l'oxytétracycline qui est utilisée pour traiter les vaches malades. La présence de ces inhibiteurs de la fermentation dans le lait est le fait du non respect des délais d'attente légaux, au déficit de sensibilisation et

de contrôle par les services en charge de la qualité. Les résidus d'antibiotiques peuvent induire une antibiorésistance des pathogènes et entraîner chez le consommateur des perturbations de la flore intestinale normale et des troubles digestifs (Brady & Katz, 1988 ; Sraïri & Hamama, 2006). D'autre part, un lait contenant des concentrations trop importantes d'antibiotiques est impropre à la fabrication de dérivés du lait pour lesquelles une fermentation intervient (yaourt, fromage, beurre). La filtration du lait après la traite permet d'éliminer dans le lait les impuretés ce qui n'est réalisée que dans 40% des fermes. L'émission de bouses par la vache pendant la traite peut entraîner la souillure du lait et l'inexistence de chaîne de froid, la multiplication microbienne. Les bonnes pratiques de production sont un garant de qualité du lait. Selon Häni (2003) la production et la mise en valeur du lait nécessitent un savoir faire et un professionnalisme à tous les niveaux de la filière. Pour y arriver, les producteurs doivent appliquer certaines règles et bonnes pratiques que sont le lavage des mains avant la traite, le nettoyage des mamelles, l'élimination des premiers jets, la filtration et le refroidissement, le lavage des ustensiles après leur emploi, et l'égouttage des ustensiles après le lavage. Une étude similaire sur l'hygiène de la traite en Gambie a montré que très peu d'éleveurs nettoient la mamelle des vaches avant la traite soit 5,7% et ce sont les veaux qui assurent la descente du lait (Hempfen et *al.*, 2003). L'amélioration de la qualité sanitaire du lait local dépend donc de la propreté de la traite, des trayeurs, des animaux et de la bonne séparation physique entre les animaux d'espèces différentes pour éviter les contaminations croisées.

Concernant l'approvisionnement du marché urbain, l'étude a montré que la quantité de lait disponible par jour sur les marchés informels à Abidjan est faible environ 1090 litres. Le lait produit dans les zones périurbaines est acheminé dans la zone urbaine pour être vendus sur les marchés informels de la ville. Après l'achat du lait à la ferme, le lait est acheminé au point de vente à pied ou en bicyclette sans chaîne de froid. Le lait subit une forte détérioration surtout s'il était déjà contaminé par les mauvaises pratiques d'hygiène lors de la traite. A Abidjan la majorité des vendeurs sont des hommes (88,2%), qui en font leur principale activité professionnelle et 17,6% une activité secondaire. La proportion des vendeurs pour qui la commercialisation du lait est une activité principale contraste avec la situation dans la zone urbaine de Bamako au Mali où 47% des collecteurs-distributeurs ou vendeurs ambulants de lait font de ce travail leur principale activité. Ce sont essentiellement des hommes (81%) (Bonfoh et *al.*, 2003a) comme à Abidjan. L'écart entre Bamako et Abidjan pour ce qui concerne la pratique de l'activité de collecte et de vente de lait comme activité principale

s'explique par le fait qu'au Mali, ces personnes vivent dans leur pays et près de leurs familles, ce qui leur donnent plus de possibilités de diversification qu'en Côte d'Ivoire. De plus au Mali, ils ont une clientèle déjà fidélisée par la confiance en la bonne qualité des produits offerts ou par de longues années d'échanges commerciaux (Kouyaté, 2007 ; Schneider et *al.*, 2007). A Abidjan cette étude a permis de noter une faiblesse du réseau social chez les vendeurs, due au fait qu'ils sont essentiellement des étrangers (ressortissants des pays de la sous-région ouest-africaine comme le Mali, le Burkina Faso ou la Guinée). De ce fait, ils passent plus de temps sur les lieux de vente dans l'attente d'une clientèle encore méfiante sur la qualité des produits proposés. Contrairement à leurs homologues de Bamako qui vendent le lait de 7 heures à 11 heures et le soir de 17 à 20 heures (Bonfoh et *al.*, 2003a), le lait est vendu à Abidjan sans interruption, de 6 heures à 20 heures et sous des hangars de fortune. Dans ces conditions, le lait est chauffé (par 100% des vendeurs) à la mi-journée pour stopper la multiplication microbienne. La moyenne de vente de lait par jour par vendeur est de  $16,4 \pm 18,6$  litres et environ trois litres de lait ne sont pas vendus. 70,6% des restes sont conservés au réfrigérateur pour être revendu le lendemain, 11,8% sont fermentés dont 23,6% sont transformés en beurre solide ou « narré » utilisé pour les soins médicaux et cosmétiques et en beurre liquide pour l'alimentation. Cette pratique de conservation se retrouve aussi en Éthiopie. On y trouve trois types de beurres fabriqués à base de lait cru local: le beurre fermier ou « qebé », le beurre artisanal et le beurre pasteurisé (Duteurtre, 2003). Le beurre fermier est réalisé par les femmes avec du lait de zébu. Il est vendu sur les marchés sous deux formes : le *beurre sauce* (cuisine) et le *beurre cosmétique*. Le marché du beurre est beaucoup plus important que celui de la Côte d'Ivoire étant entendu que le *beurre sauce* est un ingrédient de base de la cuisine éthiopienne. Contrairement à Bamako où le système de collecte, de distribution, de vente et de transformation du lait est bien établi et développé avec l'installation de mini-laiteries, à Abidjan le système n'est pas encore bien établi. Tout reste à faire. En effet, Bamako, capitale du Mali, possède plusieurs centres de collecte de lait appartenant à des organisations d'agriculteurs des différentes communautés périurbaines. Ces centres de collecte sont équipés de réservoirs avec un système de réfrigération, de générateurs et d'équipements pour mesurer la qualité du lait. Chaque centre recueille entre 200 et 250 litres de lait par jour et certains recueillent plus de 1000 litres/jour. Ce lait est vendu sur le site très rapidement en quelques heures aux revendeurs qui le distribuent à Bamako, ou vendu sur le site aux consommateurs locaux. Les excédents sont parfois bouillis ou transformés en caillé (Anonyme 2, 2008). Au Mali, c'est une petite partie de l'excédent commercialisable de lait local qui va aux unités de transformation industrielle.

La distribution de lait local et des produits dérivés est essentiellement le domaine du secteur informel (collecteurs, vendeurs de rue, détaillants, petites et moyennes entreprises, les producteurs individuels). La transformation du lait dans les principales zones urbaines du Mali (Bamako, Ségou - Niono, Sikasso - Koutiala et Mopti) se fait principalement par (i) de petites entreprises artisanales spécialisées dans le lait caillé, le beurre et de l'huile de beurre (ii) des mini-laiteries et des petites entreprises de pasteurisation. Plus que le Mali, le Burkina Faso et le Niger, le Sénégal a une riche expérience dans le traitement aussi bien du lait frais local tant la poudre de lait.

Malheureusement pour le consommateur, les facteurs liés en l'occurrence à la contamination du lait sont exacerbés par les pratiques à risques des vendeurs. Ce sont : l'inexistence d'un moyen de refroidissement du lait (chez 100% des vendeurs), l'environnement de vente insalubre, le manque de traitement du lait avant la vente (70,6%) et le temps d'écoulement du lait qui est en moyenne de 1 à 2 jours chez 58,8% des vendeurs. Un contexte similaire existe en Gambie où 68,5% des vendeuses de lait écoulent le lait dans la journée alors que 31,5% ne vendent la totalité qu'après deux jours (Hempfen et *al.*, 2003). L'exposition du lait à la température ambiante au cours de la vente, son chauffage à la mi-journée et sa réfrigération à la fin de la journée (lait non vendu), sa réexposition à la chaleur ambiante lors de la vente le lendemain ont un impact sur la qualité microbiologique et nutritionnelle du lait proposé au consommateur à Abidjan.

La chaîne de production locale du lait suit un environnement complexe marqué dans la plupart des cas, par l'absence de la chaîne de froid et des pratiques encore basées sur les traditions locales. Ces pratiques des acteurs entraînent la contamination du lait. La traite traditionnelle et le système de vente, explique le pourcentage élevé de lait cru commercialisés ne répondent pas aux normes de qualité pour des agents pathogènes microbiologiques (*S. aureus*, *E. coli* et Entérocoques). L'analyse du fault-tree indiquant les événements menant à une gastroentérite de la ferme au consommateur, nous informe que le point le plus important de contamination est la ferme plutôt que le transport ou la vente. Les sources de contamination sont les vaches, les mains des trayeurs, l'eau de traite, l'environnement des exploitations et les ustensiles de traite. Selon la Commission du Codex Alimentarius (1995) et Rohrbach et *al.* (1992), la prévalence de ces agents pathogènes dans le lait pourrait être influencée par plusieurs facteurs tels que la zone géographique, la saison, la taille des exploitations, nombre d'animaux à la ferme, l'hygiène et les pratiques de gestion agricole. Dans la zone d'étude, la production laitière se fait suivant les pratiques traditionnelles. Ceci

est cohérent avec les résultats de notre arbre de défaillance (fault-tree) indiquant l'origine de la contamination du lait. Le nombre de consommateurs de lait local est faible à Abidjan. La consommation de lait ne fait généralement pas parti des habitudes alimentaires des personnes à Abidjan. En Côte d'Ivoire, les groupes ethniques des régions nordiques consomment beaucoup de lait (FAO, 1998; Gidel *et al.*, 1974), et partagent la même tradition pastorale que le Mali, le Burkina Faso et le Sénégal. Les simulations de Monte Carlo ont montré une forte probabilité de contamination du lait vendu au consommateur par les agents pathogènes étudiés et une forte probabilité d'ingestion de lait cru ne respectant pas les normes de qualité microbiologique. La présence de *E. coli*, *Entérocoques* et *Staphylococcus aureus* dans le lait indique la présence possible d'autres agents pathogènes qui n'ont pas été étudiés dans cette étude. Ce lait cru proposé au consommateur pourrait contenir des bactéries comme *Brucella*, *Mycobacterium bovis* (Faye *et al.*, 2005), *E. coli O157* (Kang'ethe *et al.*, 2007), *Salmonella* (Nero *et al.*, 2008) et *Campylobacter* (Heuvelink *et al.*, 2009). Malgré le risque lié à la consommation de lait cru, la moitié des consommateurs à Abidjan consomme directement le lait cru après son achat sans traitement thermique. La consommation de lait insuffisamment pasteurisé ou cru a été associée à des maladies entériques dans la zone d'étude chez 12,8% des consommateurs. Les symptômes rapportés par les consommateurs interviewés sont des nausées, des vomissements, des crampes d'estomac et la diarrhée. L'association entre lait cru et maladies gastro-intestinales ont été rapportés par plusieurs auteurs dont Smoot & Pierson (1997), Carmo *et al.*, (2002), Haeghebaert *et al.*, (2002 a, b) et Belomaria *et al.*, (2007). Les principales zoonoses potentielles transmises entre autres par la consommation de lait cru provenant d'une vache infectée respectivement par *Mycobacterium sp* ou *Brucella sp.* sont la tuberculose et la brucellose. Lors des «*focus group*», pour les producteurs et les vendeurs de lait, la consommation du lait entraîne le paludisme ou la toux. Cette corrélation entre le paludisme et la consommation du lait est curieuse quand on sait que la consommation du lait ne pourrait entraîner le paludisme. Cependant, il a été démontré que ce le lait cru peut être responsable de la brucellose dont certains symptômes s'apparentent à ceux du paludisme. La brucellose humaine, est souvent confondue avec d'autres maladies, notamment le paludisme, et des poussées grippales (Blétry *et al.*, 2009). Au Mali, dans environ 30% des échantillons de lait de vache en zone rurale et périurbaine contiennent des anticorps anti-*Brucella* (Bonfoh *et al.*, 2002). En 2004 dans la zone forestière périurbaine d'Abidjan, la prévalence de brucellose bovine était de 3,6% dans les fermes laitières (Thys *et al.*, 2005) et estimée à 8,8% dans les fermes bovines du centre de la Côte d'Ivoire en 2005 (Sanogo *et al.*, 2008). La consommation de ces produits laitiers n'est donc pas sans conséquence sur la santé de la population. Les trois

principales options de lutte contre la brucellose et la tuberculose sont la pasteurisation du lait, la vaccination du bétail et l'élimination d'animaux infectés. Dans tous les cas, il est démontré que la pasteurisation du lait reste le seul moyen de rupture de la transmission des zoonoses à l'homme.

L'évaluation du risque n'est pas allée à son terme à cause du manque d'informations sur l'effet dose/réponse. Malgré la quantité de lait cru consommé quotidiennement, les toxi-infections alimentaires collectives sont relativement rares. Aucun foyer de maladie d'origine alimentaire bactérienne associé à la consommation de lait cru n'a été signalé à Abidjan. Cependant, il est probable que de nombreux cas ne soient pas signalés. De plus, les effets à long terme de l'exposition continue aux agents pathogènes du lait local sur la santé humaine sont largement méconnus.

Dans le but de gérer le risque pour le consommateur, des stratégies de baisse de la probabilité d'ingestion de lait contaminé à Abidjan ont été envisagées. Deux scénarii d'atténuation des risques ont donc été simulés. Le premier scénario développé est la mise en œuvre d'une option de contrôle du lait en vue de baisser la prévalence de la commercialisation du lait contaminé, et la seconde est la mise en œuvre d'une campagne de sensibilisation sur le chauffage du lait. L'option de contrôle basée sur le rejet du lait non conforme aux normes microbiologiques réduit considérablement le risque d'ingestion de lait contaminé. Cependant, le coût de cette option de contrôle, notamment la perte financière pour les producteurs et le coût de la mise en application représentent des défis majeurs pour leur mise en œuvre effective. En outre, elle serait susceptible d'entraîner probablement une augmentation du prix du lait au détail, ce qui rendrait cette mesure impopulaire auprès des consommateurs. L'autre stratégie d'atténuation des risques considérée est la mise en œuvre de campagnes de sensibilisation sur l'ébullition du lait. Avec ce scénario, le risque d'ingestion de lait contaminé serait réduit de 27,1% légèrement en dessous du taux de réduction de l'option de contrôle. Faire bouillir le lait moins de 2 minutes sur une flamme directe fournit la sécurité requise au consommateur. C'est simple, bon marché et préserve la valeur nutritive et la saveur de lait (Metwally et al., 2011). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande l'ébullition du lait pour les pays africains et décrit le processus dans son manuel de formation. L'ébullition du lait est un processus simple, qui ne nécessite pas l'usage d'un thermomètre et d'un mécanisme d'horlogerie qui limitent l'utilisation de la pasteurisation.

La campagne de sensibilisation des consommateurs sur l'ébullition du lait est donc l'option la moins coûteuse, plus facile à réaliser, rapide et efficace. Par contre la mise en œuvre du contrôle de la qualité, prendra beaucoup plus de temps pour la formation et la recherche de

ressources humaines et financières. La pasteurisation ou l'ébullition du lait est la mesure de contrôle de base des maladies humaines causés par la consommation de lait. Cette option imposera un fardeau financier réaliste pour les décideurs politiques et les acteurs de la chaîne de production. La pasteurisation du lait ne peut pas être la solution absolue pour prévenir les maladies causées par la consommation de lait à Abidjan. Elle doit être intégrée à la promotion des bonnes pratiques d'hygiène de la ferme à la fourchette.

Dans cette étude, l'autre stratégie de gestion du risque envisagée est la réduction de la charge bactérienne des microorganismes pathogènes du lait par d'autres bactéries. Il s'agit de l'utilisation des bifidobactéries dont le potentiel d'inhibition a été recherché.

Pour y parvenir, une diversité de souches de *Bifidobacterium*, appartenant à cinq espèces différentes ont été isolée et identifiée dans la chaîne de production laitière après l'analyse comparative des séquences d'ADN des gènes hsp60. Ces séquences ont été comparées aux séquences de la Genbank. Les résultats du pourcentage d'homologie des séquences partielles du gène hsp60 obtenue dans cette étude sont conformes à ceux obtenus par Jian et al. (2001), et Zhu et al. (2003) concernant les relations interspécifiques et intraspécifiques des bifidobactéries. En effet, selon les travaux de Zhu et al. (2003), l'homologie de la séquence partielle du gène hsp60 des bifidobactéries est de 80 à 96% entre les espèces, de 96,5 à 100% dans la même espèce et de 95,5 à 97% entre les sous-espèces. Concernant l'analyse phylogénique basée sur l'arbre construit avec *G. vaginalis* et enraciné avec *E. coli*, trois (3) clusters ont été formés comme dans l'étude de Jian et al., (2001), dont 2 petits et un grand cluster contenant la majorité des espèces (40 sur 44). De plus *B. magnum* CI 13 and *G. vaginalis* (AY123673) forment un groupe indépendant. Les espèces de *Bifidobacterium* isolées de la chaîne de production laitière à Abidjan avaient les mêmes groupes phylogénétiques que celles isolées dans d'autres pays du monde.

Il s'agit notamment de *B. minimum*, *B. pseudolongum subsp. globosum*, *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum subsp. suis* et *B. magnum*. Les espèces de bifidobactéries ont été isolées de l'environnement tel que les eaux usées (Scardovi & Trovatelli, 1974), de digestats anaérobies (Dong et al., 2000) et de laits fermentés, mais leur principal habitat est l'intestin des hommes et des animaux (Scardovi & Zani, 1974; Lauer, 1983; Biavati & Mattarelli, 1991).

*B. minimum* a été l'espèce la plus isolée dans notre étude. Elle a été isolée du lait de la ferme à la vente. Cette espèce est généralement présente dans les eaux usées (Delcenserie et al., 2002 ; Scardivi & Trovatelli, 1974). Trois souches ont été isolées du lait de pis et proviennent probablement de la mamelle (3 souches) ou des mains non lavées des trayeurs (2 souches).

Cette espèce rencontrée dans les eaux usées est un indicateur de contamination croisée entre les mains des trayeurs, la mamelle des vaches et l'environnement des fermes. En effet, dans la plupart des fermes sélectionnées pour l'étude, des eaux stagnantes, des boues et des déchets étaient perceptibles. Les espèces de bifidobactéries sont aussi utilisées comme indicateurs de contamination fécale (Beerens et al., 2000) et leur présence dans le lait est le signe d'un défaut d'hygiène dans les fermes. Dans ce contexte de production, le lait local pourrait contenir de germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus*, *Brucella*), des résidus d'antibiotiques qui sont nuisibles à la santé des consommateurs (Bonfoh et al., 2002; Bonfoh et al., 2003b).

*B. thermophilum* a été seulement isolé du lait de vente. Dans des études précédentes, *B. thermophilum* avait pour habitat les eaux usées et les fèces des animaux comme le porc et la volaille (Delcenserie et al., 2005; Vaugien et al., 2002). Sa présence dans le lait cru de vente est due à une mauvaise hygiène de la production à la vente et donc à une contamination fécale (Beerens, 1998; Delcenserie et al., 2002). Quant à *B. thermacidophilum* subsp. *suus*, il a été isolé sur la mamelle des vaches et provient probablement d'une contamination d'origine fécale. Ces espèces ont été isolées des fèces de nouveau-nés et d'animaux (Kheadr et al., 2007; Zhu et al., 2003). Dans l'environnement des fermes, il n'y avait pas une bonne séparation physique entre les animaux de diverses espèces. Les stabulations des vaches étaient des aires non couvertes accessibles aux chiens, aux oiseaux et aux rongeurs. Une contamination croisée est donc possible via le contact entre les mamelles des vaches et l'environnement contaminé ou via les mains des trayeurs. La présence de *B. magnum* dans le lait de pis provient certainement d'une contamination croisée avec l'environnement ou les fèces des animaux contaminant les mamelles et transféré dans le lait cru durant la traite (Scardovi & Zani, 1974; Ventura et al., 2001).

*B. pseudolongum* subsp. *globosum* n'a été isolé que sur la mamelle. C'est une bactérie isolée généralement des eaux usées, du rumen de bovins, des fèces de porcs ou du caecum du lapin (Gavini & Beerens, 1999; Marounek et al., 1998; Mitsuoka, 1969; Slovakora et al., 2002; Viale et al., 1994). Sa présence sur la mamelle des vaches dénote une contamination de la mamelle par les bifidobactéries présentes dans l'environnement insalubre, les fèces des autres espèces animales présentes dans les fermes ou dans le voisinage.

Nos résultats indiquent qu'il n'y avait pas de variation significative dans la prévalence des *Bifidobacterium* dans la chaîne de production laitière. La contamination par *Bifidobacterium* existait à toute les étapes de la production laitière : elle était maximale au niveau des mains

des trayeurs (hygiène défectueuse des trayeurs), décroissante au cours de la traite (lait pris au pis, lait de mélange), avant de connaître une légère augmentation dans le lait en vente. Ces résultats ont montré qu'il y avait une contamination d'origine fécale de la production à la vente du lait donc d'un manque d'éducation sanitaire des producteurs et des vendeurs. L'éducation sanitaire des bergers est importante notamment sur les bonnes pratiques d'hygiène à travers des actions simples comme le lavage et la désinfection des mains, des mamelles et des ustensiles de traite (Bonfoh *et al.*, 2003a ; Bonfoh *et al.*, 2006).

L'analyse du potentiel d'inhibition a montré que les espèces de *Bifidobacterium* isolées inhibaient en culture différentes bactéries pathogènes. Ce sont *Listeria monocytogenes*, *Salmonella hadar*, *S. typhimurium*, *E. coli* O27, *E. coli* O157H7 et *S. aureus*. Par contre, les bifidobactéries testées ne produisaient pas de bactériocine, mais produisaient des acides organiques qui inhibaient ces bactéries pathogènes. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le diacétyl et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches les produisant peuvent donc également être utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. Une culture protectrice est une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les bactéries pathogènes et/ou altérantes et ainsi prolonger sa durée de vie en changeant ses propriétés organoleptiques le moins possible (Rodgers, 2001 ; 2003 ; Vermeiren *et al.*, 2004).

Les souches d'origine humaine telles que *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis* présentent le plus de propriétés antagonistes contre *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Gardnerella vaginalis* (Korshunov *et al.*, 1999 ; Tompson *et al.*, 1997; Henriksson & Conway, 2001). La fermentation du lait contenant des espèces de *Bifidobacterium* pourrait, avec d'autres bactéries lactiques permettre la réduction de la charge initiale de bactéries pathogènes du lait par les acides organiques produits pendant la fermentation. Il a été montré que la consommation du lait fermenté avait un effet antibactérien sur les entéropathogènes et réduisait le nombre d'épisodes diarrhéiques chez les enfants à cause des bactéries lactiques présentes (Mensah, 1997; Guerin-Danan, *et al.*, 1998).

En plus de la fermentation du lait avec les bifidobactéries, l'amélioration de la qualité microbiologique du lait local passe par l'instauration dans les fermes des bonnes pratiques

d'hygiène. La corrélation entre la contamination du lait à la ferme sur les différents sites et les mauvaises pratiques d'hygiène a été établie. Il s'agit du non lavage et de la non désinfection des mamelles et des mains, du manque de filtration du lait, de l'utilisation d'eau d'étang, de la présence de déchets et d'animaux d'espèces différentes dans les fermes et des pathologies animales mal traitées (baisse de production laitières, affections respiratoires, mammites, diarrhées des veaux, avortement des vaches...). Ces données sur le lien entre les pratiques et la flore de contamination du lait permettent de préconiser les pratiques à mettre en œuvre pour préserver la "bonne" diversité microbienne et pour agir avec plus de discernement sur l'élimination des flores indésirables. Nous suggérons la prise de conscience sur les bonnes pratiques d'hygiène, mais aussi leur application, l'utilisation de la fermentation et du lait traité thermiquement chaque fois que c'est possible pour tous les acteurs des produits laitiers.

Le lait et les produits laitiers jouissent d'une bonne réputation chez les Peuls, qui sont les plus nombreux dans la filière laitière à Abidjan. Aucun encadrement des éleveurs et des vendeurs de lait de la zone urbaine et périurbaine de la ville d'Abidjan n'est fait par les services vétérinaires. Cette situation conduit à des méthodes de production et de commercialisation basées sur les pratiques ancestrales (tradition séculaire) comme cela se fait dans les pays de la sous-région de tradition pastorale que sont le Mali, le Burkina Faso et le Sénégal. Les bénéfices générés par cette activité sont renvoyés au pays d'origine des acteurs. Sur les sites d'élevage de la zone périurbaine, un montant forfaitaire est versé à la communauté riveraine comme taxe. Par exemple dans le village de Béago (commune de Yopougon), chaque propriétaire de parcs paye 5000F CFA par mois à la chefferie traditionnelle et trois bœufs sont offerts au village par année par l'ensemble des éleveurs. Cette taxe permet de régler les conflits et dédommager les villageois dont les plantations sont détruites par les animaux (les produits des champs sont souvent dévorés par les bovins). Ainsi cette activité de production laitière peut continuer dans le temps.

# **CONCLUSION**

Dans cette étude, nous avons (i) d'abord réalisé une évaluation des risques liés à certains contaminants microbiologiques (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Entérocoques*) présents dans le lait de vache produit localement à Abidjan, puis (ii) conçu des stratégies de gestion des risques en vue de l'amélioration de la qualité et de la sécurisation du lait produit. La filière laitière locale étant totalement informelle, la production se fait selon les pratiques séculaires en usage chez des peuls venus du Mali, du Burkina Faso et de la Guinée. Les fermes traditionnelles d'Abidjan sont des exploitations de subsistance à petite échelle engagées dans la production laitière et confrontées à de nombreux problèmes du fait du faible niveau d'organisation des producteurs et de l'absence d'encadrement par les structures de l'État. Les principales contraintes de ce secteur d'activité sont l'absence de circuits de collecte performants, des problèmes d'approvisionnement des intrants zoo-sanitaires, l'absence d'encadrement sanitaire de proximité, l'absence de formation aux techniques de transformations et de valorisation de la production. Pour améliorer la productibilité et un accès au marché permettant de mieux valoriser les produits, la qualité et les bonnes pratiques d'hygiène doivent être promues et vulgarisées par les acteurs impliqués dans la chaîne de production, de transformation et de distribution des produits laitiers à Abidjan. Face à la demande des citoyens pour le lait et les produits laitiers, l'engagement dans la production laitière peut être un moyen important de contribuer à la sécurité sanitaire et à la lutte contre la pauvreté en Côte d'Ivoire. Pour cela, il est cependant indispensable d'établir un cadre stratégique national adéquat. L'analyse du lait a donc été réalisée à toutes les étapes allant de la production à la commercialisation. La prévalence des contaminants microbiens augmentait du lait de pis au lait de vente pour les germes recherchés. Elle a montré que ce lait au pis est de bonne qualité, mais cette qualité s'altère rapidement lorsque le lait est mélangé pour la commercialisation. La recherche des nids de contamination sur tout le circuit du lait local a montré que les contaminations microbiennes primaires proviennent des mamelles, des mains des trayeurs. Les ustensiles et l'environnement constituent les sources de contamination secondaire du lait par les germes. De plus des inhibiteurs de la fermentation ont été détectés dans les échantillons de lait analysés. En l'absence de données nationales disponibles sur les inspections des produits laitiers locaux, il est difficile de comparer les résultats obtenus dans notre modèle d'évaluation des risques à celles des services officielles. Afin de valider les données de sortie du modèle, les données d'entrées de l'industrie laitière locale et l'inspection vétérinaire sont cruciales. Concernant le profil du risque, la production de toxine par les bactéries n'a pas été considérée. De plus la validation des mesures de gestion n'a pu être validée auprès des producteurs.

Malgré ces quelques limites que nous avons signalé, ce travail est la première tentative de modélisation du risque d'infection lié à la consommation du lait cru en Côte d'Ivoire qui prend en compte plusieurs bactéries pathogènes à la fois et qui montre que le risque peut être gérable au niveau de l'exploitation, de la distribution et de la consommation. L'analyse a montré clairement la nécessité d'études complémentaires sur la survie des bactéries de la fourche à la fourchette. Les consommateurs de lait local abidjanais qui sont majoritairement des personnes non instruites (non scolarisées) ignorant ou feignant d'ignorer les mauvaises conditions de production, de stockage et de distribution qui se font à la température ambiante sans chaîne de froid, consomment le lait cru sans aucun traitement thermique, pour la plupart d'entre eux. Cette habitude les expose à des gastroentérites dont ils ne savent pas toujours l'origine. Malheureusement, les croyances des acteurs ne contribuent guère à l'amélioration de cette situation du fait qu'ils croient que le lait est toujours sain et propre et que seules les personnes qui n'ont pas l'habitude d'en consommer sont malades après l'avoir consommé. Les perceptions de la qualité du lait, le système de distribution actuel et les modes de consommation directe du lait non pasteurisé augmentent considérablement les risques sanitaires.

Pour gérer ces risques trois stratégies ont été étudiées. Il s'agit de (i) la mise en œuvre du contrôle systématique du lait en vue de baisser la prévalence de la commercialisation du lait contaminé, de (ii) la mise en œuvre d'une campagne de sensibilisation sur le chauffage du lait pour réduire le nombre de consommateurs de lait cru et enfin (iii) l'utilisation du potentiel d'inhibition des pathogènes par les bifidobactéries.

Au terme de cette étude, il ressort les recommandations suivantes :

Aux producteurs :

- Séparer les espèces animales différentes par des enclos
- S'assurer de la bonne santé des animaux produisant du lait par un suivi sanitaire efficace.
- Appliquer les substances et les médicaments vétérinaires conformément aux prescriptions et respecter les délais d'attente requis.
- Veiller à ce que les pratiques de traite n'entraînent pas de contamination du lait.
- Jeter le lait des animaux malades ou sous traitement.
- Veiller à ce que les ustensiles de traite soient correctement lavés et désinfectés
- Laver et désinfecter les mamelles de chaque vache avant la traite.
- Veiller à un approvisionnement convenable en eau propre. Faire en sorte que l'eau donnée aux animaux soit de bonne qualité.
- Veiller à maintenir propre le lieu de la traite et que les trayeurs suivent bien les règles de base d'hygiène.
- Mettre en place un système de refroidissement rapide du lait après la traite ;

-S'assurer que les déchets sont stockés de façon à réduire au minimum le risque de pollution de l'environnement.

Aux vendeurs :

- Éviter le mélange du lait provenant de fermes différentes ;
- Entreposer le lait de vente dans des glacières contenant de la glace au cours de la vente ;
- Bien laver les ustensiles de vente du lait ;

Aux acteurs de la filière : Organisation des acteurs en coopératives pour augmenter leur revenu en vue de créer une filière dynamique de la filière et une valeur ajoutée au lait local.

Aux services sanitaires en charge de la sécurité alimentaire en Côte d'Ivoire :

L'amélioration de l'encadrement des acteurs de la filière laitière traditionnelle par une initiation aux Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) et aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) liées à la propreté des animaux, de leur environnement et la salubrité de la traite (trayeur, ustensiles de traite).

Aux industriels locaux : l'augmentation de l'intérêt pour le lait local en l'utilisant comme produit de base dans la production de produits laitiers manufacturés.

Cette étude présente plusieurs avantages que sont :

- l'utilisation d'une approche inter et transdisciplinaire (la microbiologie, la biologie moléculaire, l'épidémiologie, la santé publique, la sociologie).
- la valeur ajoutée de la méthode participative à l'évaluation classique des risques.
- l'évaluation des risques prenant en compte plusieurs agents pathogènes à la fois.

**Perspectives**

- Réaliser l'évaluation de l'utilisation adéquate du kit d'hygiène distribué lors des focus group aux producteurs par une analyse du lait.
- Tester la capacité de croissance dans le lait des espèces de bifidobactéries à fort pouvoir acidifiant isolées.
- Rechercher des nouvelles souches de bifidobactéries productrices de bactériocines dans la chaîne de production du lait local capable de se multiplier dans le lait, avec un spectre d'inhibition plus large.
- Rechercher d'autres espèces de bactéries lactiques à utiliser comme des souches probiotiques pour sécuriser le lait local.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abee T., (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram+ bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*, 129:1-9
- Adesiyun AA, Stoute S. & David B. (2007). Pre-processed bovine milk quality in Trinidad: prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centres. *Food Control*, 18:312–20.
- Ageitos JM, Vallejo JA, Sestelo ABF, Poza M & Villa TG., (2007). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*, 103:2205–2213.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, (2005). Effets des probiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. Rapport du groupe de travail de l'AFSSA publié en Février 2005, 128p
- Ahl A.S., Acree J.A., Gipson P.S., Mc Dowell R.M., Miller L. & Mc Elvaine M.D., (1993). Standardization of nomenclature for animal Health risk analysis. *Revue Scientifique et Technique*, 12: 1045-1053.
- Alais C. (1984). Science du lait - principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. 4c éd. 814p.
- Angba A., Traore A. & Fritz P., (1987). Situation de la brucellose animale en Côte d'Ivoire. *Revue Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux*, 40: 325-329.
- Anonyme 1, (2010). Plan d'Action National de Sécurité Sanitaire des Aliments Ministère de l'Agriculture de la République de Côte d'Ivoire (MINAGRI):1–48p
- Anonyme 2, (2008). Stratégie de valorisation du lait cru local au Mali. Ministère de l'élevage et de la pêche du Mali, Octobre 2008, 44p. Consulté le 12 Octobre 2012 au [http://www.apimali.gov.ml/uploads/news/id18/strat%C3%A9gie\\_de\\_d%C3%A9veloppement\\_du\\_lait\\_local.pdf](http://www.apimali.gov.ml/uploads/news/id18/strat%C3%A9gie_de_d%C3%A9veloppement_du_lait_local.pdf)
- Anonyme 3, (2002). Recensement National de l'Agriculture 2001. Rapport de l'Analyse Thématique. Abidjan, Côte d'Ivoire. Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques (MIPARH).
- Anonyme 3, (2003). Rapport national sur l'état des ressources zoogénétiques, Mars 2003. Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques (MIPARH), 80p
- Anonyme 3, (2004). Statistiques de Productions, Importations, Consommation de 1990 à 2001 : Rapport Annuel. Abidjan, Côte d'Ivoire. Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques (MIPARH).
- Anonyme 3, (2008). États généraux de la filière bétail et viande. Note d'orientation. Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques (MIPARH), 13p

- Anonyme 4, (2002). Évaluation à mi-parcours du Projet de Développement de l'Élevage phase II: Rapport définitif. Bureau d'Études des Productions Agricoles (BDPA).
- Anonyme 5, (2000). Origine et moyens de maîtrise à la production de la contamination du lait de vache par les Salmonelles. Rapport final Juillet 2000, Institut de l'Élevage, France, 70p
- Archibald F., (2000). The presence of coliform bacteria in Canadian pulp and paper mill water systems - a cause for concern? *Water Quality Research Journal of Canada*, 35:1-22.
- Asahara T., Nomoto K., Shimizu K., Hamabata T., Ozawa A. & Takeda Y., (2004). Probiotic *bifidobacteria* protect mice from lethal infection with *shiga* toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Infection and Immunity*, 7: 2240-2247.
- Atsé A.P. (1990). Amélioration génétique en Côte d'Ivoire: Contribution à l'étude des races et populations bovines du nord de la Côte d'Ivoire; perspectives d'avenir. Korhogo: Service zootechnique, 120p.
- Aymerich M.T., Garriga M., Monfort J.M., Nes I. & Hugas M.,(2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17(1):33-45
- Balagtas J. V., Coulibaly J., Eales J.S. & Diarra I., (2007). Import Demand for Dairy Products in Cote d'Ivoire. *Journal of International Agriculture Trade and Development*, 3(2) :217-233
- Banque Africaine de Développement (2002). Projet de Développement de l'Élevage phase II. Évaluation à mi-parcours, Rapport définitif. BDPA, Abidjan, Côte d'Ivoire. 215p.
- Barker G.C., Bayley C., Cassidy A., French S., Hart A., Malakar P.K. ,Maule I.J., Petkov M. & Shepherd R., (2010). Can a Participatory Approach Contribute to Food Chain Risk Analysis? *Risk Analysis*, 30(5):766-781
- Bar-Oz B., Preminger A., Peleg O., Block C. & Arad I., (2001). *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatrica*, 90: 356–358.
- Beerens H., (1998). Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 40:203-207
- Beerens H., Hass Brac de la Perriere B. & Gavini F., (2000). Evaluation of the hygienic quality of raw milk based on the presence of bifidobacteria: the cow as a source of faecal contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 54:163-169
- Belomaria M., Ahami A.O.T., Aboussaleh Y., Elbouhali B., Cherrah Y. & Soulaymani A., (2007), Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Chrarda Bni Hssen. *Antropo*, 14: 83-88.

- Bemrah N, Bergis H, Colmin C, Beaufort A, Millemann Y, Dufour B, Benet JJ, Cerf O, Sanaa M. (2003). Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 80:17–30.
- Bemrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW & Cerf O., (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from Bacterial risk assessment of informally marketed milk consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 37:129–45
- Bernet M.-F., Brassart D., Neeser A. & Servin L. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen–cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:4121-4128
- Biavati B. & Mattarelli P., (1991). *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 163-168.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S. & Bottazzi V., (2000). Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, 50:117-131.
- Bjorksten B., (2004). Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Seminras in Immunopathology*, 25:257-270.
- Bléry O., Girszyn N., Gepner P., Kahn J-E., Leport J., Mathieu E. & Melchior Y., (2009). Du symptôme à la prescription en médecine générale : symptômes, diagnostic, thérapeutique. Ed. Paris, 924p.
- Bonfoh B., Wasem A., Roth C., Hetzel M., Steinmann P., Zinsstag J. (2002). L'hygiène et la qualité sanitaire du lait et des produits laitiers .Implications en santé publique. Réseau de recherche et d'échanges sur les politiques laitières. Note méthodologique n°8. 26p, Consulté le 30 Septembre 2010. [http://www.repol.info/IMG/pdf/Note\\_methodo\\_securite\\_sanitaire.pdf](http://www.repol.info/IMG/pdf/Note_methodo_securite_sanitaire.pdf)
- Bonfoh B., Fané A., Netoyo L., Mbaye Y., Simbé C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J., (2003a). Collecte et distribution du lait produit localement en zone urbaine de Bamako (Mali). *Études et recherches sahéliennes*, (8–9) : 13-18.
- Bonfoh B., Fane A., Dem S., Traoré H., Simbe C. F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Rehberger B., Farah Z. & Zinsstag, J., (2003b). Caractéristiques physico-chimiques et biologiques du lait et des produits laitiers vendus à Bamako. *Sahelian Studies and Research* (8–9):7-12
- Bonfoh B., Fokou G., Traoré S.G., Kouamé-Sina S.M, Bechir M., Zinsstag J., Grace D., Dao D. (2013). Valeur ajoutée de la participation à l'analyse des risques des produits d'origine animale vendus dans le secteur informel. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)*, 11(S), 15-21.

- Bonfoh B., Wasem A., Traore A.N., Fané A., Spillmann H., Simbé C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Farah Z. & Zinsstag J., (2003c). Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14: 495-500.
- Bonfoh B., Roth C., Traore A.N., Fané A., Simbe C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Farah Z. & Zinsstag J., (2006). Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food Control*, 17: 153-161
- Borraz O., Besançon J. & Clergeau C. (2006). It is just about trust? The Partial Reform of French Food Safety Regulation. What's the Beef ? The Contested Governance of European Food Safety. Ansell, C. & Vogel, D. MIT Press.
- Bradley AJ. (2002). Bovine mastitis : an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164 (2):116-128
- Brady M. S., & Katz S. E., (1988). Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *Journal of Food Protection*, 51:8-11.
- Britten N., (1995). Qualitative research: qualitative interviews in medical research. *British Medical Journal*, 311: 251-3.
- Brouillette E., Grondin G., Lefebvre C., Talbot B.G. & Malouin F. (2004). Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 101: 253-262.
- Callewaert R. & De Vuyst L., (2000). Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fedbatch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2): 606-613.
- Carmo L. S., Dias R. S., Linardi V. R., Sena M. J., Santos D. A., Faria M. E., Pena E. C., Jett M. & Heneine L. G., (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strain of *Staphylococcus aureus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19: 9-14.
- Charteris W., Delly P., Morelli L. & Collins J., (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 26:333-337.
- Chen Y., Song K.Y., Brown E.W. & Lampel K.A., (2010). Development of an improved protocol for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter) from powdered infant formula. *Journal of Food Protection* 73: 1016–1022.
- Chiang Y.C., Pai W.Y., Chen C.Y., Tsen H.Y., (2008). Use of primers based on the heat shock protein genes hsp70, hsp40, and hsp10, for the detection of bovine mastitis pathogens *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus bovis*. *Molecular and Cellular Probes*, 22: 262–266.
- Codex Alimentarius Commission CAC, (1995). Foods standards program *codex alimentarius* commission. Report of the 28<sup>th</sup> session of the codex committee on food hygiene. Washington DC, 27 Novembre – 1 Décembre 1995. ALINORM 97/13.
- Codex Alimentarius Commission CAC, (2004). Code d'usages en matière d'hygiène pour le lait et les produits laitiers, CAC/RCP 57-2004, 35p.

- Codex Alimentarius Commission CAC, (2007). Principes et directives pour la gestion des risques microbiologiques. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: Geneva, 12 p
- Collado M.C., Hernandez M. & Sanz Y., (2005). Production of bacteriocine-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *Journal of Food Protection*, 68:1034-1040.
- Commission des Communautés Européennes, (2000). Livre Blanc sur la sécurité alimentaire. *Commission des Communautés européennes : Bruxelles*, 61 p.
- Commission des Communautés Européennes, (2002). Règlement (CE) N° 178/2002 du parlement Européen et du conseil du 28 Janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées. Bruxelles, 24p.
- Commission des Communautés Européennes, (2005). Commission regulation (EC) n° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of European Union*, 338/331-338/326.
- Coppola S., Blaiotta G. & Ercolini D., (2008). Dairy products. In: Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.), *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, New York, pp. 31–90.
- Coton M., Delbès-Paus C., Irlinger F., Desmasures N., Le Flèche A., Stahl V., Montel M.C. & Coton E., (2012). Biodiversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiology*, 29: 88-98.
- Coulibaly Y.J. (2004). Analyse Econométrique de la Demande d'Importation des Produits Laitiers en Cote d'Ivoire. Mémoire de fin de cycle D.E.S.S. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire.
- Cousin M.A., Jay J.M. & Vasavada P.C., (2001). Psychrotrophic microorganisms. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington, pp. 159-166
- Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. & Scardovi V., (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46:564-571.
- Dadié A, Karou T, Adom N, Ketté A & Dosso M., (2000). Isolation of enteric pathogenic agents in Cote d'Ivoire: Escherichia coli 0157:H7 and enteroaggregative E. coli. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 93:95–96.
- Danielsen M. & Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1–11.
- De Buyser M-L, Dufour B., Maire M. & Lafarge V., (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 1-17.
- De Rochemonteix J. & Muscat G., (1984). Note technique de cinq années d'expérimentation sur le croisement du bétail N'Dama X Pie-Rouge de l'est : Métissage dit N'Damance. SODEPRA, 34pp.

- De Vries W. & Stouthamer A. H., (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 93: 574-576.
- Delcenserie V., Bechoux N., China B., Daube G. & Gavini F., (2005). A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture based methods. *Journal of Microbiological Methods*, 61 :55–67.
- Delcenserie V., China B., Gavini F., Beerens H. & Daube G. (2002). Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 146 :279-293
- Delhalle L., Saegerman C., Farnir F., Korsak N. & Daube G., (2008). L'évaluation quantitative du risque microbiologique : revue de trois modèles liées à *Salmonella* dans les aliments. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 152 : 116-129.
- Derzelle S., Dilasser F., Duquenne M. & Deperrois V., (2009). Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiology*, 26: 896–904.
- Desenclos J.C., Bouvet P., Benz Lemoine E., Grimont F., Desqueyroux H., Rebière I. & Grimont P.A.D., (1996). Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B infection caused by a goat milk cheese, France, 1993: a case finding and epidemiological study. *British Medical Journal*, 312: 91-94.
- Direction générale de l'Économie, ministère de l'Économie et des finances de la République de Côte d'Ivoire (2007). La Côte d'Ivoire en chiffres. Dialogue production, Abidjan.
- Dodd F H. & Booth J. M., (2000). Mastitis and milk production. In: Andrews A H (Editor), *The Health of Dairy Cattle*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 213–255p.
- Dogan B & Boor KJ. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied Environmental Microbiology*, 69:130 –138.
- Dong X., Cheng G., & Jian W., (2000). Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 23:386-390.
- Donkor E.S, Aning K.G & Quaye J. (2007). Bacterial contaminations of informally marketed raw milk in Ghana. *Ghana Medical Journal* , 41:58–61.
- Dortu C. & Thonart P., (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 13(1) :143-154
- Dosso M, Coulibaly M & Kadio A., (1998). Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 5: 402–405.
- Dufour B., De Buyser M.L., Brisabois A., Espié E. & Delmas G., (2005). La sécurité microbiologique : Implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire. In : *La sécurité des produits laitiers*, 5<sup>ème</sup> conférence européenne d'Arilait (CREAL 2004), Editeur : Arilait Recherches, 42 rue de Chateaudun, 75009 Paris, 13-21 p.
- Dufour D., Nicodème M., Perrin C., Driou A., Brusseau E., Humbert G., Gaillard J.L., & Dary A., (2008). Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, 125 :188–196.

- Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G. C., Shanahan F., & Collins J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73:386-392.
- Duteurtre G., (2003). La typicité du beurre de vache en Ethiopie. In : Lait sain pour le Sahel. Production, approvisionnement, hygiène et qualité du lait et des produits laitiers au Sahel : Séminaire sous régional, Bamako, Mali, 25 février - 1er mars 2003. Bamako : Institut du Sahel, p. 49. Séminaire Lait Sain pour le Sahel, 2003-02-25/2003-03-01, Bamako, Mali.
- Dutt K, Gupta P, Saran S, Misra S & Saxena RK. (2009). Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 158:761–772.
- Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J. & Allen M.J. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 106S-116S.
- Ekberg A. (2001). Rapport de la Mission de Formulation du Projet Laitier Sud-Phase II. Abidjan, Côte d'Ivoire
- Ercolini D., Russo F., Ferrocino I., Villani F., (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26:228-231.
- Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M & Bengtsson B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2) :90-97
- FAO & OMS, (2005). Système national de sécurité sanitaire des aliments et ses impacts socio-économiques et sanitaires (Préparé par la Côte d'Ivoire). Document de séance 16, Conférence régionale FAO/OMS sur la sécurité sanitaire des aliments pour l'Afrique. Harare, Zimbabwe, 3-6 octobre 2005:1–6p. Consulté le 28 Septembre 2012. Disponible à : <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/af082f.pdf>.
- FAO & WHO, (2002). Report of a joint FAO/WHO working group. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: FAO/WHO.
- FAO & WHO, (2006). Comprendre le *Codex Alimentarius*. 3e édition. Lavoisier : Paris, 48 p.
- FAO & WHO, (2007). Analyse des risques relatifs à la sécurité sanitaire des aliments. Guide à l'usage des autorités nationales responsables de la sécurité sanitaire des aliments. *Etudes FAO alimentation et nutrition* 87. ISSN 1014-2908, 145p
- Faye B., Castel V., Lesnoff M., Rutabinda D., & Dhalwa J., (2005). Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara milk basin (Uganda). *Preventive Veterinary Medicine* 67: 267- 281.
- Fédération Internationale de Laiterie (FIL), (1999). The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. Group A10 /11. Milan : [s.n] – 175p.
- Food and Agriculture Organization, (1995). L'approvisionnement des villes africaines en lait et produits laitiers. M-26 ISBN 92-5-203628-8.

- Food and Agriculture Organization, (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition, n°28, ISNB 92-5-20534-6.
- Food and Agriculture Organization (2004). F.A.O Statistical Database, Consulté le 15 septembre 2010, <http://faostat.fao.org>.
- Food and Agriculture Organization (2006). F.A.O Statistical Database, Consulté le 20 juin 2009. <http://faostat.fao.org>.
- Food and Agriculture Organization, (2009). État des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture : Second rapport national, FAO-views, Octobre 2009, 77p
- Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H & Gálvez A., (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31:293–310
- Gálvez A., Abriouel H., Ben Omar N., & Lucas R. (2011) Food Applications and
- Gálvez A., Lopez R.L., Abriouel H., Valdivia E. & Omar N.B., (2008). Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 125-152.
- Garg SK & Mital BK., (1991). Enterococci in milk and milk products. *Critical Reviews in Microbiology*, 18:15–45.
- Gavini F. & Beerens H. (1999). Origin and identification of bifidobacteria strains isolated from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 46:81-85
- Gbongue M., (2002). Aspects Socio-économiques de la Performance Productive des Fermes Piscicoles en Étang: l'expérience du volet pisciculture du projet BAD-OUEST de la région forestière ouest de la Côte d'Ivoire. Mémoire de fin de cycle D.E.S.S. Université de Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire.
- Gibson G. R., & Wang X., (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:412-420.
- Gidel R., Albert J.P., Le Mao G., & Retif M. (1974). La brucellose bovine en Afrique occidentale et son incidence sur la santé publique. Résultats de 10 enquêtes épidémiologiques effectuées en Côte d'Ivoire, Haute-Volta et Niger de 1970 à 1973. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 27(4): 403-418.
- Gourbeyre P., Denery S., & Bodinier M. (2011) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 85: 685-695.
- Gournier-château N., Larpent J.P., Castillanos M.I., & Larpent J.L., (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. *Édition Technologie et documentation Lavoisier* pp., Paris, France, 1-192p.
- Grace D., Mutua F., Ochungo P., Kruska R., Jones K., Brierley B.L., Lapar L., Said M., Herrero M., Phuc P.D., Thao N.B., Akuku I. & Fred Ogutu F. (2012). Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots: Report to the Department for International Development. Nairobi, Kenya: Ilri. 119 p.
- Grace D., Randolph T., Olawoye J., Dipelou M., & Kang'ethe E., (2008). Participatory risk assessment: a new approach for safer food in vulnerable African communities. *Development in Practice*, 18 (4–5): 611- 618.

- Gran H.M, Mutukumira A.N., Wetlesen A. & Narvhus J.A., (2002). Smallholder dairy processing in Zimbabwe: hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and delivery. *Food Control*, 13: 41-47.
- Guerin-Danan, C., & Andrieux, C. (1998). Apports nutritionnels et effets probiotiques des laits fermentés chez le jeune enfant = Nutritional and health benefits of fermented milks in young infants. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 33(6) : 384-389.
- Haeghebaert S., Le Querrec F., Gallet A., Bouvet P., Gomez M. & Vaillant V., (2002a). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1999-2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 23: 105-109.
- Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallet A., Espié E. & Vaillant V., (2002b). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 50 : 249-253.
- Hamadou S., Marichatou H. & Kamuanga M., (2003). Croissance désordonnée des élevages périurbains et approvisionnement de la ville de Bobo-Dioulasso : problématique de l'hygiène du lait. *Études et recherches sahéliennes*, 8-9 : 107-115.
- Hancock L.E. & Gilmore M.S., (2000). Pathogenicity of enterococci. In: Fischetti, VA, RP Novick, JJ Ferretti, DA Portnoy et JI Rood, édit., *Gram positive pathogens*. American Society for Microbiology, 251-258 p.
- Häni J-P., (2003). La production laitière en Suisse. *Études et recherches sahéliennes*, 8-9 : 53-57.
- Hantsis-Zacharov E. & Halpern M., (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied Environmental Microbiology*, 73 :7162-7168.
- Hartman PA, Deibel RH, Sieverding LM. (2001). Enterococci. In: Downes FP, Ito K, eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, DC: American Public Health Association, 2001:83-7.
- Headrick M. L., Timbo B., Klontz K.C. & Werner S.B., (1997). Profile of raw milk consumers in California. *Public Health Report*, 112: 418-422.
- Hegarty H., O'Sullivan M.B., Buckley J. & Faley-Nolan C., (2002). Continued raw milk consumption on farms: why? *Communicable Disease and Public Health*, 5:151-156.
- Hempen M., Unger F., Seck M.T., Münstermann S., & Zessin K-H., (2003). Quelques caractéristiques de la filière laitière informelle et l'hygiène du lait produit dans ce système en Gambie et au Sénégal (Kolda et Tambacounda). *Études et recherches sahéliennes*, 8-9 : 167-171
- Henriksson A. & Conway P.L., (2001) Isolation of human faecal bifidobacteria which reduce signs of Salmonella infection when orogastrically dosed to mice. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 223 - 228.
- Heuchel V., Marly J., Meffe N., Manard J.L. & Plassot L., (2001). Origines, diagnostic et moyens de maîtrise de la contamination du lait de vache par les salmonelles. *Rencontre autour des recherches sur les ruminants*, ISSN 1279-6530, N°8 :87-90.
- Heuvelink A E , Van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg JJ, Bos MH, Heilmann FG, Hofhuis A, Hoekstra T & de Boer E. (2009). Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 134:70-4.

- Holland D., (1920). Generic index of the commoner forms of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 5:191-229.
- Holzapfel W. H. (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75: 197-212.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., & Huis in't Veld J.H.J., (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.
- Huck JR, Hammond BH, Murphy SC, Woodcock NH & Boor KJ. (2007a). Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Sciences*, 90:4872– 4883.
- Huck JR, Sonnen M & Boor KJ. (2008). Tracking heat-resistant, coldthriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product *Journal of Dairy Sciences*, 91:1218 –1228.
- Huck JR, Woodcock NH, Ralyea RD, Boor KJ. (2007b). Molecular subtyping and characterization of psychrotolerant endospore-forming bacteria in two New York State fluid milk processing systems. *Journal of Food Protection*, 70: 2354–2364.
- Hugenholz J. & Kleerebezem M., (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion Biotechnology*, 10(5) : 492-497.
- Huis in & Veld JH. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33:1–18.
- International Dairy Federation, (1990). Handbook on milk collection in warm developing countries. IDF special issue N\_ 9002. Brussels, Belgium-1-148p
- Ishibashi N. & Yamazaki S. (2001). Probiotics and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 465S–70S.
- Isolauri E., Kirjavainen P.V., & Salminen S., (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*, 50: 54-59.
- Isolauri E., Salminen S., & Ouwehand A. C., (2004). Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18:299-313.
- Jian W., Zhu L., Dong X., (2001). New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:1633-1638.
- Johnson EA, Nelson JH & Johnson M., (1990). Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part 1: microbiology. *Journal of Food Protection*, 53:441–52.
- Jost C.C., Mariner J.C., Roeder P.L., Sawitri E., & Macgregor-Skinner G. J., (2007). Participatory epidemiology in disease surveillance and research. *Scientific and Technical Review*, 26(3): 537-47.
- Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., & Isolauri E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 357: 1076-1079.
- Kang'ethe E.K., Ekuttan C.E., Kimani V.N., Kiragu M.W. (2007). Investigation into the prevalence of bovine brucellosis and the risk factors that predispose humans to infection among urban dairy and non-dairy farming households in Dagoretti .Division, Nairobi, Kenya. *East African Medical Journal*, 84: 96–100.

- Kelleher S. L., Casas I., Carbajal N., & Lönnerdal B. (2002). Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35: 162-1
- Kheadr E., Dabour N., Von AH U., Lacroix C., Meile L., & Fliss I., (2007). Genetic and phenotypical diversity of *Bifidobacterium thermacidophilum* fecal isolates from newborns. *Canadian Journal of microbiology*, 53:1348-1359.
- Klaenhammer T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 39-85.
- Klaenhammer T.R., (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70, 337-349.
- Klaenhammer T.R., Barrangou R., Logan Buck B. & Azcarate-Peril M.A., (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiological Review*, 29 : 393-409
- Klassen C. & Watkins J., (2003). *Essentials of toxicology*. USA: Mc crow-hill
- Koffi-Nevry R., Judicaël ACB, Assemmand EF, Wognin AS, Koussemon M. (2012). Origine de contamination fécale de l'eau d'arrosage de la laitue cultivée dans d'Abidjan. *Journal of Applied BioSciences*, 52:3669–75.
- Koka R. & Weimer B.C., (2001). Influence of growth conditions on heat-stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Research*, 68:109-116.
- Korshunov VM, Urtaeva ZA, Smeianov VV, Efimov BA, Sarkisov SE, Krymshokalova ZABainov NA, Pikina AP & Korshunova OV., (1999). The antagonistic activity of bifidobacteria in vitro and in vivo studied by using gnotobiological technology. *Zh.Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* (5):72-7.
- Kouakou Y.E., Koné B., Bonfoh B., Kientga S.M., N'go Y.A., Savane I. & Cissé G., (2010). L'étalement urbain au péril des activités agro-pastorales à Abidjan. *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement* [En ligne], mis en ligne le 29 septembre 2010, 10, 2, Consulté le 6 août 2012. URL : <http://vertigo.revues.org/10066>
- Kouamé B. D., Ouattara O., Dick R. K. & Roux C., (2000). Résultats du traitement des perforations typhiques de l'enfant à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Médecine Afrique Noire.*, 47: 508-511
- Kouyate H., (2007). Évaluation de l'organisation de la collecte, de la transformation et de la commercialisation du lait au Mali : cas d'un groupe de femmes à Kasséla. Mémoire Ing. Zootech., IPR/IFRA, Bamako.
- Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T. & Hattori M., (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*, 14:169–181.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachoui M. & Ouhssine M., (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144 : 237-250

- Lafarge V., Ogier J.C., Girard V., Maladen V., Leveau J.Y., Gruss A. & Delacroix-Buchet A., (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5644-5650.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF & van Sinderen D., (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98:1303–1315.
- Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin I. & Decaris B., (1996). 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46:102-111.
- Lee J-H & O’Sullivan D.J. (2010). Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74:378–416.
- Lee Y.J., Yu W.K. & Heo T.R. (2003). Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from health infant faeces. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21: 340–346.
- Leroy P., Koné K. & Leroy E. (2002). Étude des systèmes d’amélioration génétique des bovins et ovins en Côte d’Ivoire, rapport provisoire. Projet d’appui à l’amélioration génétique du Cheptel (PAGEC), Ministère de l’Agriculture et des ressources Animales, Abidjan, Côte d’Ivoire. 73p.
- Leyral G. & Vierling E., (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires. 4<sup>e</sup> édition, Eds. Doin, France, 289p.
- Lim K., Huh C. & Back Y., (1993). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 76:2168-2174.
- Lindqvist R, Sylvén S. & Vagsholm I., (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78:155–70.
- Mangin I., Bouhnik Y., Bisetti N. & Descaris B., (1999). Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacterium* strain diversity. *Research in Microbiology*, 150: 343-350.
- Mangin I., Bourget N. & Decaris B., (1996). Ribosomal DNA polymorphism in the genus *Bifidobacterium*. *Research in Microbiology*, 147:183-192.
- Manuel suisse des denrées alimentaires, (2004). *Lait*. Chapitre 1, 11p.
- Marino M., Maifreni M., Moret S. & Rondinini G., (2000). The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 31:169-173.
- Marounek M., Rada V. & Benda V. (1998). Biochemical characteristics and fermentation of glucose and starch by rabbit caecal strains of *Bifidobacterium globosum*. *Folia Microbiology*, (Phara) 43:113–116
- Martuscelli M., Gardini F., Torriani S., Mastrocola D., Serrio A., Chaves-López C., Schirone M & Suzzi, G., (2005). Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal* 15, 571-578.
- Matteuzi D., Croiani F., & Emaldi O., (1978). Amino Acids produced by *Bifidobacteria* and some *Clostridia*. *Annals of Microbiology*, 129 B: 175-181

- Mattila-Sandholm T., Matto J., & Saarela M., (1999). Lactic acid bacteria with health claims: interaction and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9:25-35
- McAuliffe O. & Hill C., (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285-308.
- McCracken V.J. & Lorenz R.G., (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*, 3:1-11.
- McDermott J.J. & Arimi S.M., (2002). Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary Microbiology*, 90:111-134.
- Mensah P., (1997). Fermentation - the key to food safety assurance in Africa? *Food Control*, 8(5): 271-278
- Mercenier A., Pavan S., & Pot B., (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8:99-110.
- Metsuoka T., (1989). Taxonomy and ecology of the indigenous intestinal bacteria. In: Hatton T., Ed Recent Advances in Microbial Ecology Tokyo: Japon Scientific Societies Press, 493-498.
- Metwally A.M.M., Dabiza N.M.A., El-Kholy W.I., Sadek Z.I., (2011). The effect of boiling on milk microbial contents and quality. *Journal of American Science*, 7 (2) :110–114.
- Michel R., Garnotel E., Spiegel A., Morillon M., Salou P., & Boutin J. P., (2005). Outbreak of typhoid fever in vaccinated members of the French Armed Forces in the Ivory Coast. *European Journal of Epidemiology*, 20: 635-642.
- Middleton J.R. (2008). *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 7: 805-815.
- Millogo V, Ouédraogo GA, Agenäs S & Svennersten- Sjaunja K. (2008). Survey on dairy cattle milk production and milk quality problems in peri-urban areas in Burkina Faso. *African Journal of Agricultural Research*, 3:215–24.
- Millogo V, Svennersten Sjaunja K, Ouédraogo GA & Agenäs S., (2010). Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food Control* 21:1070–1074.
- Mitsuoka T. (1969). Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals, including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec. and *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec. *Infektionskrankhh. Hyg. Abt. I Orig. Reihe A*, 210:52–64–85.
- Miyake T., Watanabe K., Watanabe T. & Oyaizu H., (1998). Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and Immunology*, 42: 661-667.
- Moreau A., Dedianne M-C., Letrilliart L., Le Goaziou M-F, Labarère J. & Terre J.L., (2004). S'approprier la méthode du *focus group*. La revue du praticien - médecine générale. Tome 18. n° 645 du 15 mars: 382-384.
- Moshtaghi H., & Mohamadpour A.A., (2007). Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathogens Diseases*. 4 :107-110.

- Mühlemann M., & Aebischer S., (2007). Sécurité alimentaire et protection de la santé au niveau pratique. *Revue suisse Agriculture*, 39 (6): 311-316
- Munsch-Alatossava P. & Alatossava T., (2006). Phenotypic characterization of rawmilk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*, 161: 334- 346.
- Murinda SE, Nguyen LT, Nan HM, Almeida RA, Headrick SJ & Oliver SP. (2004). Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1:97–104.
- Nero L., de Mattos MR., de Aquiar FBM, Ortolani MB., Beloti V., & de Melo Franco BDG. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55: 299–305.
- Neut C., Romond C. & Beerens H., (1981). Identification des *Bifidobacterium* en fonction de leurs besoins nutritionnels. *Revue de l'Institut Pasteur Lyon*, 14:19-26.
- Newcombe R.G., (1998). Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods. *Statistics in Medicine*, 17:857–872.
- Nigmatova K., Morovsky M., Pristas P., Teather R.M., Holo H., Javorsky P. et al., 2007. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 563-569
- Nilsen T., Nes I.F. & Holo H., (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2975- 2984.
- Office international des épizooties OIE, (2001). Code zoosanitaire international : mammifères, oiseaux et abeilles. 10<sup>ème</sup> édition, OIE, Paris, 2001, 500 p.
- Oliver SP, Jayarao BM & Almeida RA. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2:1115–29
- Orban J.I., & Patterson J.A, (2000). Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 40:221-224.
- Organisation Mondiale de la Santé OMS, (1991). Manuel d'épidémiologie pour la gestion de la santé au niveau du district, Ed. Jouve, 187 p.
- Organisation Mondiale de la Santé OMS, (1995). Application de l'analyse des risques dans le domaine des normes alimentaires. World Health Organization: Genève, 1995, 39 p
- Organisation Mondiale Du Commerce OMC, (1994). Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires (article 1-11). Organisation mondiale du Commerce : Genève, 77-100 p.
- O'Sullivan L., O'Connor E. B., Ross R. P., & Hill C. (2006) Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 135-143.
- Ouwehand A. C., & Vesterlund S., (2003). Health aspects of probiotics. *Drugs*, 6:573-580.

- Papagianni M., & Anastasiadou S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8: 3.
- Papagianni M., (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6), 465- 499.
- Pattono D., Grassi M.A., Civera T., (2008). Production of biogenic amines by some Enterobacteriaceae strains isolated from dairy products. *Italian Journal of Food Science*, 20 (3), 411-417
- Penner R., Fedorak R. N., & Madsen K. L. (2005). Probiotics and nutraceuticals: nonmedicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 5: 596-603.
- Pestka J. J., Ha C. L., Warner R. W., Lee J. H., & Ustunol Z., (2001). Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. *Food Protection*, 64:392-395.
- Petrovski K., Trajcev M. & Buneski G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77: 52-60.
- Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., & Matuchansky C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 22: 495-512.
- Pot B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier. Paris, France pp 1-152.
- Poutrel B., (1985). Generalites sur les mammites de la vache laitiere. Processus infectieux, epidemiologie, diagnostic, methodes de controle. *Revue de medecine veterinaire*, 161 : 497-51
- Rada V. & Diebal J., (1998). Susceptibility of Bifidobacteria to nisin. *Letters Applied and Microbiology*, 26:123-125.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hincheliff K.W., (2000): Disease caused by bacteria – *Mycobacterium*. In: Veterinary Medicine: A Text Book of Disease of Cattle, Sheep, Pig, Goat and Horses. 9th ed. Harcourt Publisher Ltd., London. 909–918.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hincheliff K.W. & Constable P.D. (2007). Veterinary Medicine, A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats. 10th ed. Saunders Ltd., Phyladelphia, PA, USA.
- Rainard P. & Riollet C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37: 369- 400.
- Ranieri ML & Boor KJ. (2009). Bacterial ecology of high-temperature, shorttime pasteurized milk processed in the United States. *Journal of Dairy Sciences*, 92: 4833–4840.
- Ranieri ML & Boor KJ. (2010). Tracking and eliminating sporeformers in dairy systems. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65:74–80.
- Rastall R.A., (2004). Bacteria in the gut: Friends and foes and how to alter the balance. *Journal of Nutrition*, 134: 2022-2026.
- Règlement (CE) No 2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Journal officiel de l'Union européenne du 22/12/2005.L 338/1 – L338 /26. Regulation In: Drider, D., and

- Rebuffat, S. (Eds). Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Verlag. Jaen, Spain. pp 253-390.
- Reid G., & Bruce, A. W. (2003a). Urogenital infections in women: can probiotics help? *Postgrad Medical Journal*, 79: 428-432.
  - Reid G., Jass J., Sebulsy M. T., & McCormick J. K. (2003b). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Review*, 16: 658-672.
  - Rodgers S., (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. *Trends Food Science and Technology*, 12, 276-284.
  - Rodgers S., (2003). Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Food Control*, 14 (1), 35-42
  - Rodríguez J. M., Martínez M., & IKok J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.42: 91-121.
  - Rogosa M., (1974). Genus III, *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In: Buchanan R., Gibbons N., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn. Williams and Wilkins: Baltimore, 669-676p.
  - Rogy C., (2002). Contexte de l'utilisation de l'analyse de risque : national, communautaire, international. *Epidemiologie et Santé Animale*, 41: 19-25.
  - Rohrbach R. W., Draughon F. A., Davidson P. M., & Oliver S. P. (1992). Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal of Food Protection*, 55:93-97
  - Roy D., (2001). Media for isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 167-182.
  - Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., & Mattila-Sandholm T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.
  - Saitou N. & Nei M., (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425
  - Salminen S., Isolauri E., & Salminen, E., (1996). Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:347-358.
  - Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., and Mattila-Sandholm, T. (1998) Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*,44: 93-106.
  - Sanaa M. & Cerf O., (2002). La démarche d'analyse quantitative des risques de maladies infectieuses transmises par les aliments. *Epidemiologie et santé animale*, 41:157-168.
  - Sanogo M., Cissé B., Ouattara M., Walravens K., Praet N., Berkvens D. & Thys E. (2008). Prévalence réelle de la brucellose bovine dans le centre de la Côte d'Ivoire. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*,61 :147-151 .
  - Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Ouattara AS, Barro N, Traoré AS. (2004). Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (2): 134-139.

- Savilahti E., Kuitunen M., & Vaarala O. (2008) Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. *Current Opinion Allergy and Clinical Immunology* .8: 243-248.
- Scardovi V. & Trovatelli L., (1965). The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annals of Microbiology*, 15: 19-29.
- Scardovi V. (1986). *Genus Bifidobacterium*. In: Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J. Bergey's manuel of Systematic Bacteriology (volume 2), Williams and Wilkins: Baltimore, 1418-1434.
- Scardovi V., & Zani G. (1974). *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic bifidobacterium isolated from rabbit feces. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24: 29-34.
- Scardovi V., (1984). Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen, 1924, 472, p. 1418-1434. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Krieg N.R. and Holt J.G. (eds), Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, Md, USA.
- Schiffrin E. J., & Blum S., (2002). Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56: 60-64.
- Schneider, M.B., Kouyaté H., Fokou G., Zinsstag J., Traore A., Amadou M., & Bonfoh B., (2007). Dynamiques d'adaptation des femmes aux transformations des systèmes laitiers périurbains en Afrique de l'Ouest. *Revue Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux*, 60, (1-4): 121-131
- Schukken Y.H., Wilson D.J, Welcome F., Garrison-Tikofsky L. & Gonzalez R.N., (2003). Monotoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34: 579-596.
- Sears P. & Mccarthy K. (200 3). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.*, 19:171-185.
- Seegers H, Menard JL & Fourichon C. (1997). Mammites en élevage bovin laitier : importance actuelle, épidémiologie et plans de prévention. *Rencontres Rech. Ruminants*, 4 :233-242
- Seegers H., Fourichon C. & Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research. Res.*, 34: 475- 491.
- Settanni L., & Corsetti A. (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 123-138.
- Sgorbati B., Scardovi V. & Leblanc D., (1982). Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *Journal of General Microbiology*, 128: 2121- 2131.
- Sgorbati B., Scardovi V., & Leblanc D., (1986). Related structures in the plasmid profiles of *B. longum*. *Microbiologica*, 9: 415-422.
- Shim E., Shanks R. & Morin D. (2004). Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Sciences*, 87: 2702-2708.
- Shitaye J.E., Tsegaye W. & Pavlik I., (2007). Bovine tuberculosis infection in animal and human populations in Ethiopia: a review. *Veterinarni Medicina*, 52, (8): 317–332

- Slovakora L., Duskova D., & Marounek M., (2002). Fermentation of pectin and glucose and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Letters of Applied Microbiology*, 35:126–130.
- Smoot L.M. & Pierson M.D., (1997). Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. *In: Fundamentals of Food Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 66-82p
- Sommelier L. & Heuchel V., (1999). Caractérisation microbiologique et aptitudes technologiques des laits ultrapropres. *Compte rendu Institut de l’Elevage* N° 9983118, 32 p.
- Sraïri M.T. & Hamama A., (2006). Qualité globale du lait cru de vache au Maroc. Concepts, états des lieux et perspectives d’amélioration. *Transfert de Technologie en Agriculture*, (137) :1-4.
- Stanton C., Gardiner G., Meehan H., Collins K., Fitzgerald G., Lynch P.B., & Ross R .P., (2001). Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73:476- 483.
- Stiles M.E. & Holzapfel W., (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy *International Journal of Food Microbiology*, 36(1): 1-29.
- Streit J.M, Jones R.N., Toleman M.A., Strachounski L.S. & Fritsche T.R., (2006). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 2003. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 27: 378-386.
- Sullivan A., & Nord C. E., (2005). Probiotics and gastrointestinal diseases. *Journal of Internal Medicine*, 257: 78-92.
- Tagg J.R., Adjoin A.S. & Watchmaker L.W., (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiology Review*, 40:722-756.
- Tannock G. W., (1999b). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76: 265-278.
- Tannock G.W., (1999a). The normal microflora: an introduction. In *Medical importance of normal microflora*. Tannock, G. W., Ed., Kluwer Academic Publishers, London, UK, 1-23p.
- Thoen C.O., Steele J.H. & Gilsdorf M.J. (2006): *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA. 317 p.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G., (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 24:4876–4882.
- Thys E., Yahaya M. A., Walravens K., Baudoux C., Bagayoko I., Berkvens D. & Geerts S., (2005). Etude de la prévalence de la brucellose bovine en zone forestière de la Côte d'Ivoire. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 58(4): 205-209
- Toma B., (2004). Les zoonoses infectieuses. Polycopié des Unités des maladies contagieuses des Ecoles nationales vétérinaires Françaises, Merial (Lyon) éd., 1-171.

- Toma B., Bénet J.J., Dufour B., Eloit M., Moutou F. & Sanaa M., (1991). Glossaire d'épidémiologie animale. Editions du Point Vétérinaire : Maisons-Alfort, 365 p.
- Touré R., Kheadr E., Lacroix C., Morino O. & Fliss I., (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 95:1058-1069.
- Trijbel-Smeulders M.A.J.M., Adriaanse A.H., Gerards L.J. & Kimoen L.L., (2003). Strategy to prevent neonatal early-onset group B streptococcal disease in the Netherlands. *Reviews in Medical Microbiology*, 14 : 35–39.
- Twomey D., Ryan M., Meaney B. & Hill C., (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 165-185.
- Vallet A. & Marly J., (1995). Maitrise des risques de contamination de l'environnement par les salmonelles liés au stockage et à l'utilisation des effluents d'élevage. Compte rendu N°95111 Institut de l'Élevage, INRA Nouzilly, ENSP Rennes, ITAVI, CRITT-Hyginov Tours. Technipel. 35p.
- Van Kessel J.S., Karns J.S., Gorski L., McCluskey B.J. & Perdue M.L., (2004). Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *Journal of Dairy Sciences*, 87:2822-2830.
- Van Oostveldt K., Vangroenwegh E F., Dosogne H., Burvenich C. (2001). Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Veterinary Research*.,32: 617-622.
- Vaugien L., Prevots F. & Roques C., (2002). Bifidobacteria identification based on 16S rRNA and pyruvate kinase partial gene sequence analysis. *Anaerobe*, 8: 341–344
- Veerkamp J. (1978). Catabolism of glucose and derivatives of 2 deoxy-2-amino-glucose in *Bifidobacterium bifidum subsp. Pennsylvanicum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 129: 257-263.
- Ventura M., Elli M., Reniero R., & Zink R. (2001). Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology*, 36:113-121.
- Ventura M., Van Sinderen D., Fitzgerald G. F., & Zink R., (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 205- 223.
- Vergin F. (1954) Antibiotics and probiotics. *Hippokrates*.25: 116-119.
- Vermeiren L., Devlieghere F. & Debevere J., (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), 149-164
- Viale A. M., Arakaki A. K., Soncini F. C. & Ferreyra R. G., (1994). Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:527-533.
- Vissers M.M.M., Driehuis F., Giffel M.C.T., De Jong P.& Lankveld J.M.G., (2007). Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science*, 90 (2): 928-936
- Von Eiff C., Peters G. & Becker K. (2006). The small colony variant (SCV) concept: the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*, 37: 26-33.

- Vose D., Acar J., Anthony F., Franklin A., R.Gupta, Nicholls T, Y. Tamura Y, Thompson S, Threlfall E.J., van Vuuren M., White D.G. , Wegener H.C. & Costarrica M.L (2001). Antimicrobial Resistance: Risk Analysis Methodology for the Potential Impact on Public Health of Antimicrobial Resistant Bacteria of Animal Origin. *Revue science et technique de l'Office international des Epizoties*, 20 (3), 811- 827.
- Wattiaux M.A. (1997). *Dairy essentials (1st edition) : Nutrition and feeding*, The Babcock Institute Publications, University of Wisconsin-Madison, 1-28p
- Winslow C., Broadhurst J., Buchanan R., Krumwiede C., Rogers L., & Smith G., (1917). The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial types. *Journal of Bacteriology*, 2:505-566.
- World Health Organization, (2002). WHO global strategy for food safety. Geneve: WHO (ISBN92 4 15454 7)
- World Health Organization, (2010). Global Tuberculosis control.,Who report ( ISBN 978 92 4 156406 9), 246p
- World Health Organization, (2011). Global Tuberculosis control.,Who report (ISBN 978 92 4 156438 0), 246p
- Yapi-Gnaoré C.V., N’Goran K.E., Fantodji A. & Ahoussou N., (2009). Influence des facteurs de production sur l’élevage laitier périurbain des régions de savane et de forêt de Côte d’Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 19: 1065-1073.
- Yapi-Gnaoré C.V., Oya B.A. & Ouattara Z. (1996). Revue de la situation des races d'animaux domestiques de Côte d'Ivoire. *Bulletin d'Information Ressources Génétique Animale*, 19: 100-108.
- Yildirim Z., & Johnson M. G., (1998). Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection*, 61, 47-51.
- Zhu L., Li W. & Dong X., (2003). Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum subsp. porcinum subsp. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1619-1623

# **ANNEXES**

### Fiche d'enquête - producteurs de lait

FICHE D'ENQUETE			
Exploitation de :			
Nom:			
N° de téléphone:			
Ville:			
Commune:			
Enquête réalisée le:			
<b>1- Caractéristiques de l'exploitation</b>			
<b>1• 1 Atelier lait</b>			
• Nombre de vaches laitière		/.../.../	
• Litrage livrée par jour		/.../.../.../	
• Type de logement			
aire paillée- aire d'exercice non couverte		1- <input type="checkbox"/>	
aire paillée- aire d'exercice couverte		2- <input type="checkbox"/>	
• type de traite			
traditionnelle		1- <input type="checkbox"/>	
moderne		2- <input type="checkbox"/>	
• stockage des déjections			
fosse		1- <input type="checkbox"/>	
fumière		2- <input type="checkbox"/>	
système particulier à préciser .....		3- <input type="checkbox"/>	
aucun		4- <input type="checkbox"/>	
<b>1•2 Autres ateliers</b>			
		sur l'exploitation	ds le voisinage
• Production de veaux sevrés		/.../	/.../
• Engraissement de taurillons		/.../	/.../
• Production de porcs		/.../	/.../
• Production de volailles		/.../	/.../
• Chèvres		/.../	/.../
• Moutons		/.../	/.../
• Autres:.....		/.../	/.../
<b>2- Etat sanitaire du troupeau au cours des 12 derniers mois</b>			
• Répartition des vélages:			
vélages étalées sur l'année		1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
si non, sur quelle période: /1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12/			
		Depuis 2 mois	depuis 1 an
• VL traitées pour mammites cliniques		/.../	/.../
• Chute de production laitières importante (non dues à des causes alimentaires)		/.../	/.../
• Diarrhées des vaches laitières		/.../	/.../
• Vaches mortes ou reformées pour maladie		/.../	/.../
• Diarrhée de veaux		/.../	/.../
• Veaux morts		/.../	/.../
• Avortements		/.../	/.../
• vélages avant terme		/.../	/.../
• Cas de suspicion d'infection pathogène		/.../	/.../
• autres maladies (affections respiratoire..)		/.../	/.../
Lesquelles :.....			

	Préciser le nombre d'animaux concernés.....,		
	• Y a-t-il eu des analyses de laboratoire ? si oui, date (s):.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	<b>3- Alimentation des animaux</b>		
3• 1	Nature des principaux fourrages consommés par la vache laitière (taries ou en production) au cours des 2 derniers mois.		
	• pâturage/herbe fauchée	vaches taries/	vache en production
	• Foin	vaches taries/	vache en production
	• Ensilage d'herbe	vaches taries/	vache en production
	• Ensilage de maïs	vaches taries/	vache en production
	• Autres (préciser) :.....	vaches taries/	vache en production
3• 2	Les aliments consommés par les vaches laitières au cours des 2 derniers mois		
	3-3-1 Origine		
	• Achetés dans le commerce	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Fabriqué à la ferme	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• autre	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	3-3-2 Nature des aliments distribués au cours des 2 derniers mois		
	• tourteaux, à préciser : .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Céréales, à préciser : .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Pulpes, à préciser : .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	3-3-2 Conditions de stockage des aliments		
	• lieu accessible aux oiseaux	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• lieu accessible aux rongeurs	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Présence d'autres risques de contamination pendant le stockage, Préciser:.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	3-3-2 Le mode de distribution		
	• il entraîne un risque de souillure par les bouses	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	3-4 Qualité de l'eau		
	• Origine de l'eau 1- <input type="checkbox"/> réseau	2- <input type="checkbox"/> puit	3- <input type="checkbox"/> autre
	si forage:		
	- la contamination est-elle possible par des déjections diverses ?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	- Nature des déjections : Boues de stations d'épuration	1- <input type="checkbox"/>	
	Fosses septiques	2- <input type="checkbox"/>	
	Autres, à préciser.....	3- <input type="checkbox"/>	
	- l'eau est-elle désinfectée sur l'exploitation ?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Mode de distribution pour les VL en lactation		
	- abreuvoir à palette	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	- abreuvoir à boule	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	- bac	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	- autres	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Propreté des abreuvoirs des VL en lactation	1- <input type="checkbox"/> acceptable	2- <input type="checkbox"/> mauvaise
	• Matériau des abreuvoirs des VL en lactation		
	- ciment	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	- plastique/tôle	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	- autre (préciser) :.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	

	•Fréquence de nettoyage (VL en lactation)		
	Plus fréquemment	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	tous les 15 jours	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	tous les mois	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	moins fréquemment que tous les mois	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	aucun	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	<b>4 Conditions d'hygiène dans l'exploitation</b>		
	<b>4• 1 Logement des animaux</b>		
	<b>4• 1• 1 Environnement</b>		
	• Proximité d'une déchèterie ou d'une déchetterie ?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	•Présence de chiens	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	•Présence de rongeurs	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	•Présence d'oiseau	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	•Bonne séparation physique entre les espèces (volaille, porcs)	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	<b>4-2 l'hygiène de la traite</b>		
	<b>4-2-1 Hygiène et organisation générale</b>		
	• Trayeurs		
	-nombre de trayeurs présents en permanence	/.../	
	-alternance de trayeurs	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	lavage des mains du trayeur d'une vache à l'autre	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	•Avant de commencer la traite :		
	-la tenue du trayeur est propre	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	-le trayeur se lave les mains	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	<b>4-2-2 Préparation des trayons avant la traite</b>		
	• Absence de préparation	1- <input type="checkbox"/>	
	•Préparation à sec par massage des mamelles avec ou sans chiffon	2- <input type="checkbox"/>	
	•Préparation des mamelles par le veau	3- <input type="checkbox"/>	
	•Utilisation de douchettes	4- <input type="checkbox"/>	
	-seuls les trayons sont mouillés	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	-essuyage individualisé (un papier par animal par ex.)	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	<b>4-2-3 Elimination des premiers jets</b>		
	• Elimination systématique, sur tous les animaux des premiers jets	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Si oui, est-ce :		
	-sur le sol ?	1- <input type="checkbox"/>	
	-dans la main ?	2- <input type="checkbox"/>	
	-dans un récipient ?	3- <input type="checkbox"/>	
	<b>4-2-4 Désinfection des trayons après la traite</b>		
	•Systématiquement (toutes les vaches, toute l'année)	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	<b>4-2-5 Conditions de traite</b>		
	• La traite se déroule dans des conditions calmes	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Chute de faisceaux /1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11/12/13/14/15/	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Les faisceaux qui chutent pendant la traite sont nettoyés		
	Correctement au jet	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	• Bouses pendant la traite :	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	

<b>4-2-6 Etat du matériel après la traite</b>		
• Aspect correct (bien lavé et en bon état) pour :		
- le seau	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
- la caoutchouterie	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
- la calebasse	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
<b>4-2-7 Filtration du lait</b>		
• Présence d'un système de filtration du lait	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• si oui, type de filtre :		
- en fibre, changé après chaque traite	1- <input type="checkbox"/>	
- métallique	2- <input type="checkbox"/>	
<b>5- Devenir du lait après la traite la traite</b>		
<b>5-1 Lait après la traite</b>		
• Traitement du lait recueilli		
filtration : .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
pasteurisation: .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
ajout d'éléments: .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Matériel de conditionnement		
Seau plastique	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
Bouteille en plastique	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
Autres: .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Refroidissement immédiat		
• Vente immédiate	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Atelier de vente	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Environnement de vente: .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Stockage du lait destinée à la vente		
- dans une glacière	1- <input type="checkbox"/>	
- sur une table	2- <input type="checkbox"/>	
- sur le sol	3- <input type="checkbox"/>	
- autres: .....	4- <input type="checkbox"/>	
• Température ambiante		
• Atelier de transformation dans la zone	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Produits laitiers dérivés :		

**Fiche d'enquête marché - producteurs de lait**

Date |\_\_|\_\_|\_\_|

Nom et prénoms :.....

Sexe :  Age :  Ethnie :.....

Localisation géographique : (à préciser).....

### I. Structuration

1. Quelles sont vos principales activités ?.....

2. Qu'est-ce que vous faisiez avant ?.....

3. En quelle année avez-vous démarré l'activité de production de lait ? |\_\_|

4. A qui appartient l'exploitation ? (préciser le statut juridique)

Individuel  Familial  GIE  Autres (à préciser) :.....

5. Travaillez-vous avec d'autres personnes ? Oui  Non  Si Oui : Qui sont-ils ?.....

Quelles sont vos relations ?.....

Quelles sont leurs tâches ?.....

Est-ce qu'ils sont payés ? Oui  Non  Si Oui : Combien ?.....

6. Est-ce que cette activité constitue votre occupation toute l'année ? Oui  Non

Si Non : Combien de mois travaillez-vous dans l'année ?..... A quelle période ?.....

7. Travaillez-vous tous les jours ? Oui  Non

Si Oui : Combien de temps vous prend cette activité par jour de travail et tâche ?.....

### II. Production

8. Quels types de lait produisez-vous ?.....

Pour chaque produit (*préciser les informations du tableau suivant*) :

Type de produit	Quantité journalière produite	Quantité journalière vendue	Prix	Quantité restante	Quantité consommée

### II. Commercialisation

9. Où vendez-vous vos produits ?..... Pourquoi ?.....

10. A qui vendez-vous vos produits ?.....

11. Quelles sont vos relations avec les clients ?.....

12. Quelles sont les différentes quantités vendues ?..... Pourquoi ?.....

13. Quels sont vos différents prix de vente ?..... Pourquoi ?.....

14. Y a-t-il des méventes ? Oui  Non  Si Oui : A quels moments ?.....

Pourquoi ?..... Quelles solutions utilisez-vous ?.....

15. Tenez-vous une comptabilité de votre activité ? Oui  Non

Si Oui : Vérifier et collecter les informations.

### III. Bilan de l'activité

16. Quels types d'investissements avez-vous mis en place ?.....

17. Quelles sont vos différentes charges de fonctionnement ?.....

18. Y a-t-il une variation de ces charges ? Oui  Non

Si Oui : A quelle période ?..... Quelles sont les raisons ?.....

Comment faites-vous pour régler ces problèmes ?.....

19. Quelles sont vos recettes pour les différents produits ?

Journalières : ..... Mensuelles : ..... Annuelles : .....

20. Avez-vous les mêmes recettes durant toute l'année ? Oui [ ] Non [ ]

Si Non : Quelles sont les variations ? ..... Quelles sont les raisons ? .....

21. Quelles utilisations faites-vous de vos revenus ? .....

## **V. Environnement**

22. Connaissez-vous d'autres laiteries artisanales ? Oui [ ] Non [ ]

Si Oui : Quelles sont vos relations ? .....

23. Connaissez-vous les laiteries modernes ? Oui [ ] Non [ ]

Si Oui : Lesquelles ? ..... Quelles sont vos relations ? .....

25. Quelles sont vos appréciations sur les produits des laiteries ? .....

26. Êtes-vous en contact avec des structures et/ou des organisations ? (encadrement, finances, législation, contrôle, coopérative....)

Si Oui : Lesquelles ? ..... Quelles sont vos relations ? .....

<b>Fiche d'enquête marché – vendeurs de lait</b>
--

Date |\_\_|\_\_|\_\_|

Nom et prénoms : .....

Sexe : |\_\_| Age : |\_\_| Ethnie : .....

Type de points de distribution : .....

Localisation géographique : (à préciser) .....

1. Quelles sont vos principales activités ? .....

2. Qu'est-ce que vous faisiez avant ? .....

3. En quelle année avez-vous démarré l'activité de vente de lait ? |\_\_|

4. A qui appartient le point de vente ? (préciser le statut juridique)

Individuel [ ] Familial [ ] GIE [ ] Autres (à préciser) : .....

5. Travaillez-vous avec d'autres personnes ? Oui [ ] Non [ ]

Si Oui : Qui sont-ils ?..... Quelles sont vos relations ?..... Quelles sont leurs tâches ?.....

Est-ce qu'ils sont payés ? Oui [ ] Non [ ] Si Oui : Combien ? .....

6. Est-ce que cette activité constitue votre occupation toute l'année ? Oui [ ] Non [ ]

Si Non : Combien de mois travaillez-vous dans l'année ?..... A quelle période ? .....

7. Vendez-vous tous les jours du lait ? Oui [ ] Non [ ]

Si Oui : Combien de temps vous prend cette activité par jour de travail ? .....

8. Quels types de lait et produits laitiers vendez-vous? .....

Pour chaque produit (**préciser les informations du tableau suivant**) :

Type de produit	Origine (préciser le fournisseur)	Quantités achetées (préciser la fréquence de la livraison)	Prix d'achat

9. Comment travaillez-vous avec vos différents fournisseurs ?..... Pourquoi ?.....

10. Comment vendez-vous les différents produits ?..... Pourquoi ?.....

11. Quelles quantités vendez-vous ? .....

12. Y a-t-il des variations ? Oui [ ] Non [ ] Si Oui : A quelle période et pourquoi ? .....

13. A qui vendez-vous ces produits ? .....

14. Est-ce que ces personnes redistribuent les produits ? .....

Où et à qui ?... A quels prix ? .....

15. Quels sont les prix de vente des différents produits ? .....

16. Parvenez-vous à écouler tous les jours les quantités reçues ? Oui [ ] Non [ ]

Si Oui : Pourquoi n'augmentez-vous pas votre approvisionnement .....

Combien de temps mettez-vous pour écouler toute production? .....

17. Comment conservez-vous les produits non vendues ? .....

18. Quelles sont vos appréciations sur les produits des laiteries ? .....



- 15 /Avez-vous un réfrigérateur ? (1) Oui (2) Non
- 15-1 Si oui, pendant combien de temps conservez-vous le lait au réfrigérateur avant de consommer ?
- 15-1-1/ S'il n'est pas bouilli ? (1) 2 jours  (2) 3 jours  (3) Autres à préciser...
- 15-2-2 S'il est bouilli ? (1) 2 jours  (2) 3 jours  (3) Autres à préciser...
- 15-2 Si non, pendant combien de temps conservez-vous le lait à la température ambiante ?
- 16/ Si le lait est bouilli, pendant combien de temps le faites-vous bouillir ?
- (1) 5 min  (2) 10 min  (3) 15 min
- (4) Jusqu' à ébullition  (5) Autres à préciser .....

## V/ Pathologies liées à la consommation du lait

### V-1/ Quantité de lait acheté

- 17/ Combien de fois achetez-vous le lait par semaine ?
- (1) 1 fois  (2) 2 fois  (3) 3 fois  (4) Autres à préciser
- 18/ Quelle quantité de lait achetez-vous par jour ?
- (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser
- 19/ Quelle quantité de lait consommée-vous par jour ?
- 19-1 vous (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser ...
- 19-2 Votre famille (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser ...
- 20/ Avez-vous déjà eu un malaise (une infection) après la consommation de lait ?
- (1) Oui  (2) Non
- 21/ Si Oui, quels ont été les symptômes ?
- (1) Fièvre  (2) Vomissements  (3) Diarrhées  (4) Autres à préciser
- 21-1/ Intensité de la maladie. Choisir dans une échelle de 1 à 10
- /1 /2/3/4/5/6/7/8/9/10
- 1/2/3 : moins grave 4/5/6 : moyennement grave 7/8 : grave 9/10 : très grave, hospitalisation
- 21-2 /Avez –vous subi un traitement ?
- (1) Oui  (2) Non
- 21-2 -1/ Si oui lequel ? Durée .....
- 21-3/ Ce lait a-t-il subi un traitement avant sa consommation ?
- (1) Oui  (2) Non
- 21-4 / Si oui le quel ?
- (1) Chauffé  (2) bouilli  (3) fermenté
- 21-5/ Quelle quantité avez-vous bu ?
- (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser .....
- 21-6 / Où avez-vous acheté ce lait ? .....
- 21-7 / Chez qui ? .....
- 21-8/Comment ce lait était –il conditionné ?
- (1) Sachet  (2) bouteille plastiques
- (3) petits pots  (4) Autres à préciser.....

## Procédure du Focus group

### Procédure de consentement

Avant le démarrage des réunions du focus group, le consentement des participants est donné à l'avance.

*Bonjour à tous. Merci d'être venu. Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à cet entretien sur l'hygiène et la qualité du lait cru produit localement. Votre opinion est très précieuse pour nous afin d'avoir des informations intéressantes pour l'organisation de la filière laitière.*

Le but de cette étude, est de savoir comment la filière laitière locale est organisée, les conditions de travail, les problèmes rencontrés ainsi que les attentes des acteurs vis-à-vis des autorités politiques. Nous voulons aussi connaître les différentes étapes de la chaîne de production du lait de la ferme au consommateur ; et identifier les sources de contamination potentielle à travers la description de vos différentes pratiques et de votre perception de l'hygiène du lait.

Les informations obtenues seront analysées et des solutions seront proposées aux problèmes que vous rencontrés dans le but d'améliorer la qualité du lait et par delà augmenter vos revenus.

- Les informations que vous nous donnez sont confidentielles, et vos noms n'y seront pas associés.
- Nous souhaiterions enregistrer la conversation pour être sûr de ne rien oublier de vos préoccupations, et les bandes seront détruites.
- Vous pouvez parler librement et sans tabous, et refuser de répondre à toute question si vous jugez cela nécessaire.
- Nous vous demandons de respecter la confidentialité des informations qui seront recueillies ici et de respecter l'opinion des autres participants.
- Si vous ne comprenez quelque chose à notre démarche, vous pouvez poser des questions ou nous contacter après l'étude.

## **Introduction**

### **1- Bienvenue**

Présentation de chaque membre du groupe (organisateur) ainsi que de l'animateur.

- Qui sommes-nous ?
- Ce qui sera fait avec les informations recueillies
- Pourquoi nous sollicitons votre participation ?
- Nous vous présentons nos excuses pour votre temps de travail que nous utilisons

### **2- Explication du processus**

Qui a déjà participé à un focus groupe (réunion de ce type) ?

Expliquez que ces groupes de discussion sont de plus en plus utilisés dans le domaine de la recherche en santé publique et en sociologie pour comprendre et connaître les besoins et problèmes des populations à la base.

#### *Focus groups*

- Nous voulons apprendre de vous (ce qui est positif comme négatif)
- Nous n'essayons pas d'obtenir un consensus dans les réponses, mais nous voulons rassembler toutes les informations.
- Dans ce projet, nous faisons des questionnaires et des groupes de discussion pour obtenir des informations plus intéressantes.

#### *Logistique*

- Le focus group durera deux heures
- Sentez-vous libre de vous déplacer

### **3- Règles**

Établissons quelques règles pour être efficace dans la discussion.

- Tout le monde devrait participer
- Pas de conversations latérales
- Les informations fournies sont confidentielles
- Fermez les téléphones portables
- Amusez-vous

### **4- Allumer le dictaphone**

**5- Avez-vous des questions avant que nous ne commençons ?**

**6- Introduction**

- Tour de table : présentation des participants ; nom, ethnie, âge, activité dans la filière laitière.

**Questions :**

**I- Relations entre les producteurs**

1. Quelles sont vos principales activités ? Qu'est-ce que vous faisiez avant ?
2. Quelles relations existent entre vous? (Le type de structure, Fonctionnement, Conditions de travail)
3. Connaissez-vous d'autres laiteries artisanales ? Si Oui, quelles sont vos relations ?
4. Connaissez-vous les laiteries modernes ? Si Oui, lesquelles ? Quelles sont vos relations ?
5. Quelles sont vos appréciations sur les produits des laiteries ?
6. Êtes-vous en contact avec des structures et /ou des organisations ? (encadrement, finances, législation, contrôle, coopérative ...)
7. En quelle année avez-vous démarré votre activité ?
8. A qui appartient l'exploitation, le point de vente ? (affaire familiale ou privée)

**II. Production et commercialisation**

1. Identifier les différentes étapes de la production du lait à la vente de lait
2. Quels types de lait produisez-vous ?
3. Où vendez-vous vos produits ? Pourquoi ? A qui les vendez-vous?
4. Quelles sont vos relations avec les clients ?
5. Quelles sont les différentes quantités vendues ? Pourquoi ?
6. Quels sont vos différents prix de vente ? Pourquoi ?
7. Y a-t-il des méventes ? Si Oui, A quels moments ? Pourquoi ?
8. Tenez-vous une comptabilité de votre activité ?

**III. Hygiène du lait**

1. Consommez-vous le lait ? Pourquoi ?
2. Mode de consommation

\*Les participants doivent dire comment ils consomment le lait cru, sans traitement, chauffé, fermenté ou réfrigéré. Si le lait est consommé fermenté, quel ferment est utilisé. S'agit-il d'une fermentation spontanée, ajout de yaourt industriel ou un ferment traditionnel.

\*Ils doivent aussi définir la fréquence de consommation.

3. Poser le problème de l'hygiène du lait - Qu'est ce que le bon lait ?
4. Avez-vous déjà été malades en consommant le lait ou un membre de votre famille ?  
Si oui, quels ont été les symptômes ?
5. Pourquoi est-on malade en consommant le lait ?
6. Qu'est ce qu'un lait contaminé (pas bon pour la santé)? Que contient -il ?
7. Comment ces contaminants (débris, bois, résidus d'antibiotiques, sable, pathogènes.....) arrivent dans le produit ?
8. Comment les éliminer avant et après la traite ?
9. Comment obtient -on le lait sain ?
10. Qu'elles sont les mesures prises pour l'obtenir ?
11. Mettez vous en pratique ces mesures ? Si non pourquoi ?
12. A quoi s'exposent les consommateurs de lait cru contaminé?
13. Comment est conservé le lait ?

## Protocole de prélèvement des échantillons

Disposer d'une blouse propre

Nettoyer et désinfecter régulièrement les glacières contenant les prélèvements (eau javellisée) après chaque utilisation.

Prévoir des sacs poubelle pour récupérer les déchets (gants à usage unique, papier essuie-mains...) à l'issue des prélèvements.

Tous les prélèvements doivent être réalisés avec des gants.

Les gants seront changés chaque fois qu'on réalisera un prélèvement en vue d'une analyse différente.

Les étiquettes d'identification des échantillons sont à coller sur les flacons avant ou juste après le prélèvement s'il n'était pas déjà étiqueté.

### **1- L'eau**

Prélever 5L d'eau pour la précision des analyses, mais si la quantité de matière organique en suspension est trop importante et risque de rendre la filtration impossible, ne prélever que 125 mL et respecter la chaîne de froid.

#### **1-1 Dans les abreuvoirs (bacs)**

-Bien agiter l'eau des abreuvoirs et frotter leur surface interne pour mettre en suspension la matière organique qui peut s'y trouver (porter des gants de fouille si le bac est profond).

-Prélever, utiliser des flacons stériles 125 à 180 mL d'eau et l'envoyer directement au laboratoire.

#### **1-2 dans les mares accessibles aux animaux**

-Bien agiter l'eau pour mettre en suspension la matière organique qui peut s'y trouver.

-Prélever (on peut tremper le flacon dans l'eau) 125 ou 180 mL d'eau.

#### **1-3 L'eau de traite**

Prélever (on peut tremper le flacon dans l'eau) 125 ou 180 mL d'eau utilisée lors de la traite.

### **2- L'environnement**

### **2-1 Prélèvements d'environnement par écouvillonnage**

- Ouvrir un pot stérile et le poser sur le sol dans les endroits susceptibles d'être souillés par les fèces, par les effluents d'élevage ou par des déchets pendant 15 min.

- Verser de l'EPT dans le pot, bien refermer et secouer doucement pour bien répartir l'EPT.

### **2-2 Prélèvement par écouvillonnage sur les mamelles**

- Frotter l'écouvillon sur l'ensemble de la mamelle et mettre l'écouvillon dans un pot stérile et la garder au frais jusqu'au laboratoire.

### **3- Le lait cru à la vente**

- Le lait contenu dans la bouteille plastique du vendeur (sélectionné) doit être mélangé par retournement de la bouteille avant le prélèvement.

- De la bouteille du vendeur 100 mL de lait doit être versé directement dans le flacon à cape rouge stérile (flacon préalablement étiqueté).

- Porter des gants et ne toucher ni l'intérieur du pot ni la face interne de la cape rouge.

### **4- Laits de quartier**

- A main nue après préparation de la mamelle par l'éleveur, ouvrir le flacon stérile en tenant le bouchon dans la même main.

- prélever 100 mL en commençant par le quartier le plus proche

- bien identifier les flacons : n° de l'animal.

### **5 -Mains du trayeur**

- Écouvillonnage des mains des trayeurs avant chaque traite.

Les échantillons de laits et les échantillons environnementaux sont acheminés au laboratoire à + 4 °C dans des glacières différentes.

<b>Protocole de laboratoire</b>
---------------------------------

Les échantillons sont transportés au laboratoire dans une glacière contenant des morceaux de glaces de sorte à obtenir une température d'environ 4° C dans l'heure.

### **1. Recherche de résidus d'antibiotiques : test de yaourt**

C'est un test qualitatif qui permet de déterminer la présence ou l'absence de résidus d'antibiotiques utilisés dans le traitement des infections chez les animaux en lactation. Ce test met en évidence l'éventuelle présence d'un antibiotique par inhibition d'une souche de *Streptococcus thermophilus* (ferment lactique) qui ne produira pas d'acide, ne fera pas coaguler le lait et l'indicateur de pH et ne changera pas de couleur dans l'échantillon.

#### **• Procédés**

1 - Préparation des témoins

Le témoin négatif est constitué de 10 mL de lait négatif (lait en poudre reconstituée avec une poudre testée négative).

Les témoins positifs sont constitués de 2 tubes dont l'un contient 10 mL de lait négatif et 0,5µg/mL d'oxytétracycline et l'autre 10 mL de lait négatif et 0,04UI/mL de pénicilline G.

2 - Mettre 10 mL de lait de quartier dans un tube et pasteuriser pendant 5 min dans le bain-marie de 80-90°C et refroidir à 45°C.

3- Ajouter aux tubes témoins positifs et au tube contenant le lait de quartier 1 mL de ferment (yaourt nature Danone).

4- Ajout de 2 gouttes d'indicateur coloré (solution de bromocrésol pourpre (dissoudre 1g dans 300 mL d'eau) dans tous 4 les tubes.

5- Incuber pendant 3h dans une étuve à 45°C et procéder à l'interprétation.

#### **• Résultat**

Les échantillons qui montrent une acidification (virage de l'indicateur du bleu au jaune) et coagulation ne contiennent pas d'antibiotiques. Les autres (couleur bleu et lait liquide) sont positif donc présence d'antibiotiques.

### **2. Test à la resazurine**

C'est une variante du test de réduction au bleu de méthylène avec une appréciation de la qualité basée sur la couleur produite après une période d'incubation. Le test dure une heure avec une lecture en 3 étapes (après 1, 2, 3 heures d'incubation).

- **Procédé**

Le réactif est préparé avec 1 comprimé de resazurine dans 50 mL d'eau distillée stérile. Un millilitre de réactif de resazurine est ajouté à 10 mL de lait cru et incubé à 37°C pendant 1heure.

- **Résultat**

La couleur obtenue est fonction de la charge bactérienne du lait.

<b>Grade</b>	<b>Couleur</b>	<b>Qualité</b>
<b>I</b>	Bleu	Excellent
<b>II</b>	Bleu mauve	Bon
<b>III</b>	Rose	Moyen
<b>IV</b>	Blanc ou clair	Mauvais

### 3. Mesure de la densité du lait de vente.

Cette mesure permettra de déceler le lait falsifié par mouillage (ajout d'eau, eau salée, lait de mélange).

- **Procédé**

Peser 10 mL de lait de vente ( $m_L$ ) et 10mL d'eau ( $m_e$ ). La densité ( $d$ ) du lait est calculée avec la formule suivante :  $d = m_L / m_e$

- **Résultat**

La densité du lait de vache non modifié est comprise entre 1028 et 1033 Kg/m<sup>3</sup>. Un lait mouillé ou contenant une quantité de graisse élevée présente des valeurs densimétriques inférieures à 1028. Le lait écrémé a des valeurs élevées entre 1033 à 1037.

### 4. Recherche des bactéries pathogènes du lait

#### 4.1 Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

##### Préparation de l'échantillon

Mélanger soigneusement chaque échantillon en l'agitant. Préparer une dilution 1:10 du substrat à analyser en ajoutant de façon aseptique 10 mL à 90 mL d'eau peptonée tamponnée. Préparer des dilutions décimales successives dans l'eau peptonée tamponnée jusqu'à 10<sup>-3</sup> ou 10<sup>-4</sup>.

##### Dénombrement des colonies présumées de *S. aureus*

- *Isolement*

Agiter chaque dilution et effectuer l'ensemencement dans les 15 minutes qui suivent la préparation des dilutions. Étaler 0,2 mL de chaque dilution sur chacune des boîtes de gélose Baird-Parker préparées en double. Garder les boîtes en position non-inversée jusqu'à ce que le milieu ait absorbé l'inoculum (environ 10 minutes sur des boîtes bien asséchées). Incuber les boîtes de gélose en position inversée à 37 °C pendant 24h.

o *Dénombrement des colonies*

Observer les colonies de staphylocoques présomptives:

Type 1 : Colonies noires brillantes ou grises foncées, entières, convexes, entourées de zones claires s'étendant dans le milieu opaque.

Type 2 : Colonies noires brillantes ou grises foncées, entières, convexes, sans zone claire bien définie.

Compter tous les types de colonies observées. Seules les colonies grises foncées devraient être comptées. Les colonies grises pâles ne devraient pas être considérées comme des colonies présomptives de *S. aureus*. Ne pas inclure les colonies de la grosseur d'une tête d'épingle dans le compte des colonies de *S. aureus* dans les différents types de colonies.

Chaque type de colonie peut être entouré d'une bordure gris-blanc ou de zones opaques (halos doubles). Il ne faut pas compter les colonies noires mucoïdes ayant plus de 2 mm de diamètre, ni les colonies groupées. Ces colonies appartiennent habituellement au genre *Bacillus*. Inscrire le nombre de colonies de chaque type séparément, mais les additionner pour obtenir le nombre total de colonies présumées.

o *Dénombrement des boîtes préparées en double (toute dilution)*

Choisir les boîtes qui contiennent de 20 à 200 colonies présumées de staphylocoques, total constitué des nombres combinés de tous les types par boîte. Si l'on utilise des boîtes de plus d'une dilution, il faut établir la moyenne des totaux de la façon indiquée dans l'établissement de la moyenne de deux dilutions. Si aucune boîte contenant de 20 à 200 colonies présumées de *S. aureus* n'est disponible, on peut établir un nombre estimatif en utilisant des boîtes dont le nombre présumé s'établit en dehors de cette plage. Lorsque les résultats sont en dehors de la plage de 20 à 200 colonies, il faut indiquer que les résultats représentent des estimations. Lorsqu'un nombre estimatif contribue au nombre moyen, cette moyenne devient en soi une valeur estimative.

o *Établissement de la moyenne de deux dilutions*

Si les boîtes préparées à partir de deux dilutions décimales successives présentent des dénombrements de 20 à 200 colonies présumées de staphylocoques par boîte, il faut utiliser le total des quatre boîtes pour établir la moyenne. Comme il faut compter séparément les types différents de colonies, comme il est fort probable que les totaux individuels seront inférieurs à 20, et comme les totaux combinés se trouvent à l'intérieur de la plage, il faut combiner les valeurs estimatives et les valeurs réelles pour calculer une moyenne. La formule suivante permet d'éviter cette difficulté :

Nombre total de colonies comptées

Dénombrement moyen de colonies/mL= \_\_\_\_\_

Volume utilisé (  $\frac{1}{\text{Dilution}_1} + \frac{1}{\text{Dilution}_2}$  )  
 par dilution      Dilution<sub>1</sub>      Dilution<sub>2</sub>

Si l'on n'obtient aucune colonie présumée de staphylocoques, il faut inscrire les dénombrements présumés comme étant inférieurs à 2,5 x le facteur de dilution pour les boîtes préparées en double. Les résultats représentent alors des estimations.

### Épreuves de confirmation

#### ○ Test de la coagulase

Pour confirmer la présence de *S. aureus*, le test de la coagulase est réalisé. Si les colonies ont une morphologie typique et qu'elles sont bien isolées, transférer l'inoculum de chaque colonie dans un bouillon cœur cerveau (BCC) et incuber à 37° C pendant 18-24.

Transférer 0,2 mL de chaque culture de bouillon de BCC dans des tubes à hémolyse stériles contenant 0,5 mL de plasma de lapin, incuber à 37°C et examiner après 1 h et 4 h. Ne pas agiter les éprouvettes durant l'incubation. Incuber les éprouvettes négatives toute la nuit à la température de la pièce et vérifier de nouveau. On considère que la présence d'un caillot ferme qui ne bouge pas lorsque l'on penche l'éprouvette (réaction coagulase 4+) constitue un résultat positif pour la présence de *S. aureus*. Aucune confirmation supplémentaire n'est nécessaire. Si la réaction à la coagulase est de 3+, 2+ ou 1+, il faut procéder à l'épreuve d'ADN ase. Si la gélose donne un résultat positif, on considère que l'isolat est constitué de *S. aureus*. (Voir figure 2).

#### ○ Présence de DNase

Cette gélose enrichie à l'ADN ne contient aucun agent sélectif. Elle est utilisée pour rechercher l'ADN ase ou la thermonucléase à partir des colonies suspectes isolées sur milieu sélectif (milieu BP). Ces colonies sont repiquées en stries à la surface d'une boîte contenant de la gélose à l'ADN. On peut tester 5 colonies dans la même boîte en faisant des stries radiales (une strie par colonie). La boîte est incubée 24 heures à 37° C. La boîte est ensuite inondée avec la solution d'acide chlorhydrique environ 1N. Après quelques minutes, la solution devient opaque. Elle reste transparente sous les stries des souches ADNase +. Les colonies peuvent aussi être observées sur fond noir. *Les souches ADNase + présentent un halo clair autour.* Les *Staphylococcus aureus* sont ADNase +. Si ces deux épreuves sont négatives, le résultat est considéré comme étant négatif pour *S.aureus*.

En se fondant sur les épreuves de confirmation de chacun des quatre types de culture, inscrire le nombre total de *S. aureus* par mL de substrat (N<sub>T</sub>). Le nombre total de *S. aureus* par mL est égal à la somme du nombre de *S. aureus* des types 1 et 2 (N<sub>T</sub> = N<sub>1</sub> + N<sub>2</sub>).

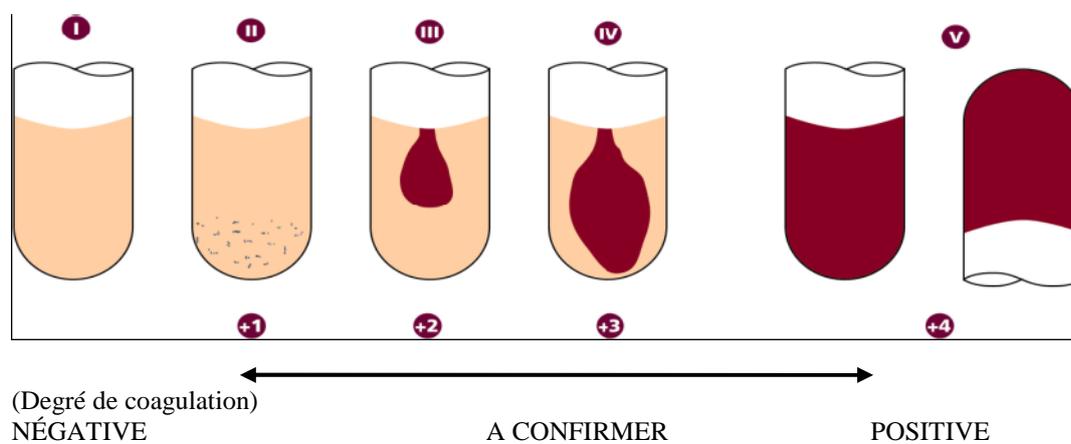
$$N^{\text{bre}} \text{ de } S. \text{ aureus} \text{ du type 1 Par mL (N}_1\text{)} = \frac{\text{Nbre de colonies confirmées de } S. \text{ aureus (P)}}{\text{Nbre de colonies testées (G)}} \times \text{Dénombrement présumé de type 1 (C)}$$

OU

$$N^{\text{bre}} \text{ de } S. \text{ aureus Par mL (NT)} = \frac{\text{Nbre de colonies confirmées de } S. \text{ aureus (P)}}{\text{Nbre de colonies testées (G)}} \quad \times \quad \text{Dénombrément présumé (N)}$$

Conserver les souches identifiées dans un milieu de conservation additionné de 10% de glycérol à -80°C.

Numéro d'éprouvette



**Figure** : Réaction de l'épreuve à la coagulase (Source : Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments ; MFHPB-21 Septembre 2005)

#### 4.2 Isolement et identification de *Salmonella*

##### Enrichissement en milieu non sélectif (pré-enrichissement)

Ajouter 25 mL (g) d'échantillons à 225 mL (90 mL) du bouillon d'enrichissement non sélectif (eau peptonée tamponnée (EPT)) dans un bocal stérile. Préparer un témoin positif de *Salmonella* et un témoin négatif de milieu en même temps que les échantillons d'analyse si possible. Respecter toujours la proportion 1 :10. Incuber le milieu de pré-enrichissement et les témoins positif et négatif à 37±1 °C pendant 18±2 heures.

**NB** : Tout signe de croissance dans le témoin négatif ou l'absence de croissance dans le témoin positif après incubation rend non valables les résultats de l'épreuve.

##### Enrichissement en milieu sélectif

Avec une pipette stérile, transférer 0,1 mL de la culture de pré-enrichissement dans 10 mL de bouillon rapport vassiliadis. Incuber le bouillon pendant 24 ± 3 h à 41,5±1°C.

### Culture sur gélose sélective

Ensemencer en stries une anse de 10 µl de chaque culture d'enrichissement sélectif sur une gélose hektoen de façon à obtenir des colonies bien isolées. Incuber les géloses à 37°±1° C pendant 24 ± 3 heures. S'il n'y a pas de colonies suspectes de *Salmonella* sur les géloses hektoen, incuber les boîtes pendant 24 ± 3 h de plus. Sur la gélose hektoen, les colonies sont verdâtre avec ou sans centre noire et si la période d'incubation se prolonge, le milieu qui les entoure noircit progressivement à cause de la production de H<sub>2</sub>S. S'il n'y a pas de colonies suspectes sur les géloses, on considère que l'unité analytique est négative pour la présence de *Salmonella spp.*

### Identification biochimique

Repiquer les colonies pures sur gélose TSA pour l'identification biochimique (*urée-indole, TDA, oxydase, catalase, ONPG, mobilité avec du BCC et portoir réduit de Le Minor*) (tableau).

**Tableau:** Épreuves biochimiques déterminantes

Milieu	Réaction	Observation	Réaction typique de <i>Salmonella</i>
<b>Gélose aux trois sucres et au fer</b>	Utilisation du lactose Ou du sucrose	Réaction positive : Pente jaune Réaction négative : La couleur de la pente ne change pas	Négative (certaines souches peuvent utiliser un substrat ou les deux).
	Utilisation du dextrose	Réaction positive : Culot jaune avec ou Sans poches de gaz Réaction négative : La couleur du culot ne change pas.	Positive
	Production de H <sub>2</sub> S	Réaction positive : Noircissement du culot ou de la pente ou les deux Réaction négative : Aucun noircissement	Positive (possibilité de dégagement lent de H <sub>2</sub> S. La réaction peut être inhibée en présence de souches lactose-positives ou sucrose-positives.)
	Formation de gaz	Réaction positive : Poches de gaz dans le milieu Réaction négative : Absence de poches de gaz	Positive
<b>Gélose lysine-fer (LIA)</b>	Production de H <sub>2</sub> S	Réaction positive : Noircissement du culot ou de la pente ou les deux Réaction négative : Aucun	Positive

		noircissement	
	Lysine décarboxylase	Réaction positive : Le culot demeure pourpre. Réaction négative : Le culot vire au jaune.	Positive
	Lysine-désaminase	Réaction positive : La pente vire au rouge vin. Réaction négative : La couleur de la pente ne change pas.	Négative
<b>Gélose à l'urée de Christensen</b>	Production d'uréase	Réaction positive : La pente vire au rose/rouge Réaction négative : La couleur de la pente ne change pas.	Négative

Source : Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments ; MFO-21 Juillet 2002

#### 4-3 Dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des *Escherichia coli*

- **Préparation pour l'analyse**

Préparer une dilution à 1:10 de substrat en prélevant aseptiquement à l'aide d'une pipette 10 mL (g) de l'échantillon à analyser du substrat et l'ajouter à 90 mL d'eau peptonée tamponnée stérile. Préparer les dilutions successives requises (jusqu'à  $10^{-3}$  ou  $10^{-4}$ ) pour effectuer la numération des colonies présentes dans le substrat en transférant 1 mL de la dilution précédente dans 9 mL de diluant d'eau peptonée tamponnée. Incuber toutes les dilutions pendant 30 minutes à 37° C.

- **Dénombrement des colonies**

- *Épreuves de présomption*

A l'aide d'une pipette stérile, transférer sans tarder 1 mL de chaque dilution préparée dans chacune de deux boîtes de Pétri. Verser 12-15 mL de gélose Rapid E.coli 2, refroidie à 40-45° C dans chaque boîte et mélanger le tout doucement par rotation. Laisser la gélose se solidifier pendant 15 minutes. Ne pas verser la gélose dans les boîtes plus de 15 min après la préparation des dilutions. Incuber les boîtes de gélose à l'envers :

A 37° C pendant 21 heures pour les coliformes totaux.

A 44° C pendant 21 heures pour les *E. coli*.

Éviter l'empilement ou l'entassement des boîtes de gélose, pour leur permettre d'atteindre rapidement la température de l'incubateur. Compter toutes les colonies bleues-vertes et les colonies violettes à roses le plus tôt possible après la période d'incubation.

**Lecture** : - Coliformes totaux : colonies bleues-vertes.

- *E.coli* : colonies violettes à roses

Choisir les boîtes de gélose qui donnent de 30 à 300 colonies, y compris les colonies minuscules. Si le nombre de colonies ne se situe pas dans ces limites, choisir les boîtes qui contiennent le nombre de colonies s'en rapprochant le plus.

### ***Inscription des résultats***

Calculer le dénombrement moyen (moyenne arithmétique) des boîtes en double, en divisant le nombre total de colonies sur les deux boîtes par 2.

### **- Établissement de la moyenne de deux dilutions**

Si les boîtes préparées à partir de deux dilutions décimales successives présentent des dénombrements de 20 à 200 colonies présumées d'*E. coli* par boîte, il faut utiliser le total des boîtes pour établir la moyenne. La formule suivante permet d'éviter cette difficulté

$$\text{Dénombrement moyen de } E. coli / \text{mL} = \frac{\text{Nombre total de colonies comptées}}{\text{Volume utilisé ( } \frac{1}{\text{Dilution}_1} + \frac{1}{\text{Dilution}_2} \text{ )}}$$

Pour les résultats finaux, arrondir les dénombrements à deux chiffres significatifs et inscrire seulement les deux premiers chiffres de gauche (par exemple, inscrire 2 850 comme étant 2 900). Si la dilution la plus faible qui a étéensemencée ne présente pas de colonies, inscrire la numération comme étant le produit de 0,5 X le facteur de dilution précédé du signe < (plus petit que). Utiliser la formule suivante pour calculer la numération des colonies aérobies (ACC) :

$$N = A \times D$$

N étant le nombre de colonies par mL de produit, A le dénombrement moyen et D le facteur de dilution respectif.

- *Épreuve de confirmation* : Détermination du nombre présumé d'*E. coli*

Utiliser les colonies présomptives sur les boîtes incubées à 37° C. Prélever 5 colonies et ensemencer par strie chacune sur une boîte de gélose L-EMB. Incuber les boîtes à 37° C pendant 18 à 24 h et examiner afin de déceler la présence de colonies non mucoïdes, nucléées, avec ou sans reflets métalliques. Repiquer une colonie sur chaque boîte caractéristique sur une gélose trypticase soja (purification). Incuber à 37° C pendant 18-24 h. Utiliser ces cultures pour procéder à l'épreuve de confirmation. Les *E. coli* sont des bâtonnets Gram-négatifs non sporulés. Les souches identifiées *E. coli* sont confirmées à l'aide de la trousse d'identification rapide API 20E. Suivre les instructions du fabricant. Conserver les souches identifiées *E. coli* dans un milieu de conservation microbiologique additionné de 10% de glycérol stérile.

En se fondant sur les épreuves de confirmation des colonies présomptives, inscrire le nombre total de *E. coli* par mL d'aliment (NT).

$$N^{\text{bre}} \text{ de } E. coli \text{ par mL (NT)} = \frac{\text{Nbre de colonies confirmées d}'E. coli (P)}{\text{Nbre de colonies testées (G)}} \quad \times \quad \text{Dénombrement présumé (N)}$$

#### 4.4 Dénombrement des entérocoques fécaux

##### Préparation pour l'analyse

Préparer une dilution à 1:10 de substrat en prélevant aseptiquement à l'aide d'une pipette 10 mL de l'échantillon à analyser et l'ajouter à 90 mL d'eau peptonnée tamponnée stérile. Préparer les dilutions successives requises (jusqu'à  $10^{-4}$ ) en transférant 1 mL de la dilution précédente dans 9 mL de diluant d'eau peptonnée tamponnée. Incuber toutes les dilutions pendant 30 minutes à 37° C.

##### Dénombrement

A l'aide d'une pipette stérile, étaler 0,1 mL de chaque dilution ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) sur chacune deux boîtes de Pétri contenant la gélose de Slanetz et Bartley. Garder les boîtes en position non-inversée jusqu'à ce que le milieu ait absorbé l'inoculum (environ 10 minutes sur des boîtes bien asséchées. Incuber les boîtes de gélose en position inversée à  $36^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  pendant  $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ . Après incubation, considérer comme typiques toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre ou sur l'ensemble de la colonie.

Procéder au comptage des colonies pour chaque boîte et calculer le dénombrement moyen (moyenne arithmétique) des boîtes en double, en divisant le nombre total de colonies sur les deux boîtes par 2. Si les boîtes préparées à partir de deux dilutions décimales successives présentent des dénombrements de 20 à 200 colonies par boîte, il faut utiliser l'équation (pour *E. coli*) pour établir la moyenne.

##### Confirmation

Au minimum 5 colonies présomptives par dilution sont prélevées et repiquées sur gélose bile-esculine-azide (BEA) qui a été incubé à  $44^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$  pendant 24 h. Considérer toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire dans le milieu environnant comme donnant une réaction positive, et les compter comme *entérocoques fécaux*.

**RÈGLEMENT (CE) No 2073/2005 concernant les critères microbiologiques des denrées alimentaires : Lignes directrices pour l'interprétation** (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

<b>Lait</b>		<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
Lait cru de vache destiné à la consommation humaine	<i>Salmonella spp.</i>	5	0	Abs/25g	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	100 UFC/g	
	<i>Staphylocoques à coagulase positive</i>	5	2	<b>100</b> UFC/mL	<b>500</b> UFC/mL
	<i>Germes cultivant à 30°C</i>			<b>5 .10<sup>4</sup></b> UFC/mL	

(Source : laboratoire national de santé, contrôle des denrées alimentaires, Grand-duche de Luxembourg ; F-054 Rev01 ; mise à jour du 24/05/2007).

n = nombre d'unités dont se compose l'échantillon

m = seuil limite en dessous duquel tous les résultats sont considérés comme satisfaisants

M = seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants

c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs comprises entre m et M

## Protocole d'isolement et d'identification des bifidobactéries

### 1. Isolement des bifidobactéries

#### 1.1 Culture des échantillons

L'isolement des bactéries a été réalisé selon la méthode de Beerens (1998) modifiée par Delcenserie et *al.* (2005). Ensuite, les bactéries anaérobies ont été testées pour la recherche de la production intra-cellulaire de fructose-6-phosphate phospho ketolase (F6PPK).

#### 1.2 Test de la fructose-6-phosphate-phospho-kétolase (F6PPK)

Les isolats de *Bifidobacterium* présomptifs (isolats anaérobies) ont été testés pour la recherche de la production intra-cellulaire de fructose-6-phosphate ketolase (F6PPK) selon la méthode de Scardovi (1986) modifiée par Orban & Patterson (2000). La formation d'acétyl-Phosphate à partir de fructose -6-Phosphate est visualisée par la formation d'une couleur rouge-violette (absorption maximum à 505 nm) due à la chélation du fer de la molécule  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

##### 1.1.1 Réactifs utilisés

Les réactifs suivants ont été utilisés pour la réalisation du test. Ce sont :

A- tampon phosphate 0,05M pH 6,5 supplémenté en chlorhydrate de cystéine (500 mg/l)

B- solution de Sodium Fluorure NaF (6 mg/l) et d'iodoacétate de sodium (10 mg/l)

C- Hydroxylamine HCl (13,9g/l) fraîchement ramené à pH 6,5 par de la soude.

D- Acide trichloracétique (15%, poids/volume) en eau

E- HCl 4M

F- Fer (III) Chlorure hexahydraté  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5% (poids/volume) en HCl 0,1M

G- Fructose-6-phosphate (80 mg/mL) en eau.

##### 1.1.2 Protocole

Un isolat de bifidobactérie est cultivé en anaérobiose pendant 48h à 37°C dans 10 mL de bouillon MRS contenant 0,05% de Cysteine-HCL. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 14000 g /3 min. Le culot est lavé deux fois avec la solution A et mis en suspension dans 1 mL du même tampon. Les cellules sont désorganisées (interrompues) par sonication en bain de glace 4 X 30 sec (2 min) (repos de 30 secondes entre chaque essai). Le sonicate est mélangé avec 0,25 mL de B et de 0,25 mL de solution G. Après une incubation de 30 min à 37°C, 2,5 mL du réactif C sont ajoutés. Le mélange est gardé 10 min à la température ambiante et 1 mL de solution D et 1 mL de E sont ajoutés (le mélange peut être

laissé à la température ambiante). Pour finir le test, 1 mL de la solution développant la couleur, la solution F, est ajoutée et le tube est agité par inversion.

Le développement immédiat de la couleur rouge-violette est le signe d'une présence de Fructose-6-Phosphate-Phosphokétolase (enzyme distinctive des bifidobactéries). Le résultat est négatif si la coloration reste jaune. Les isolats F6PPK positifs sont considérés comme appartenant au genre *Bifidobacterium*.

## 2. Identification des espèces de *Bifidobacterium*

La méthode utilisée pour l'identification des espèces de *Bifidobacterium* est la méthode moléculaire qui comporte trois étapes. Il s'agit de l'extraction de l'ADN chromosomique, de l'amplification spécifique et du séquençage du fragment amplifié. Les séquences résultantes sont analysées.

### 2.1 Extraction de l'ADN

Deux millilitres d'un bouillon de culture de 18h d'isolat de bifidobactéries F6PPK (+) en MRS (oxid, France ont été centrifugés à 5000g pendant 2 minutes. Le culot de bactérie a été suspendu dans 180 µl de tampon de lyse enzymatique contenant du lysozyme (20 mg/mL). L'ADN a été extrait suivant les instructions du Kit DNeasy Blood and Tissue Handbook kit (Qiagen).

Dans 200 µl de tampon AL (sans éthanol) ont été ajoutés 25 µl de protéinase K et le tube est incubé au bain-marie à 56°C pendant 30 min. Ensuite, 200 µl d'éthanol (96-100%) ont été ajoutés et mélangés. Le mélange a été transféré dans la colonne DNeasy mini spin préalablement placée dans un tube de collection de 2 mL. L'ensemble a été centrifugé à 6000g (8000 rpm) pendant 1 min et le tube de collection a été éliminé. La même colonne est placée sur un nouveau tube de collection et 500 µl de tampon AW1 y sont ajoutés et l'ensemble est centrifugé pendant 1 min à 6000g (8000 rpm). La même colonne a été à nouveau placée sur un tube de collection et 500 µl de tampon AW2 y sont ajoutés et centrifugés pendant 3 min à 20 000g (14 000 rpm) pour sécher la membrane. Pour finir, la même colonne a été placée sur un tube propre (1,5 à 2 mL) avec 50 µl de tampon AE, l'ensemble a été incubé pendant 1 min à température ambiante et centrifugé 1 min à 6000g (8000 rpm). Cette étape a été reprise pour obtenir 100 µl d'ADN et l'ADN a été conservé à 4°C.

Au spectrophotomètre, la pureté et la concentration (ng/µl) de l'ADN ont été mesurés :

- si le ratio 260/280 est environ égal à 1,8 alors l'ADN est pur,
- si le ratio 260/280 est inférieur à 1,8 alors l'ADN est contaminé par des protéines, du phénol ou d'autres contaminants,
- si le ratio 260/230 est compris entre 2,0 et 2,2 alors les acides nucléiques sont purs,
- si le ratio 260/230 est inférieur à 2,0 – 2,2 alors il y a la présence de contaminants qui absorbent la lumière à 230 nm.

Les échantillons d'ADN purs obtenus ont été dilués avec de l'eau pour biologie moléculaire Rnase free, afin d'obtenir une concentration comprise entre 25 et 50 µg/mL. Les échantillons contaminés sont jetés.

### 2.2 Détection du genre *Bifidobacterium* par PCR

Les isolats anaérobies ayant l'activité F6PPK ont été testés pour la recherche des gènes hsp60 et 16S rDNA spécifiques au genre *Bifidobacterium*.

La détection de l'appartenance des isolats au genre *Bifidobacterium* a été réalisée selon la méthode de Delcenserie et al. (2005) dans un volume réactionnel de 25µl contenant 2 mM desoxynucleotide triphosphate (Eurogentec, Belgique), 5%(v/v) DMSO, 10X ThermoPol buffer (BioLabs, Nouvelle Angleterre), 0,2 µM de chaque amorce (Eurogentec, Belgique), 5U of Taq DNA polymerase (BioLabs, new England) et 1µl d'ADN chromosomique.

L'amplification a été réalisée dans un DNA thermal Cycler GeneAmp® PCR System 2700 (AB Applied Biosystems) selon le programme suivant: 95 °C pendant 5 min, suivi de 40 cycles pour le gène hsp60 ou 35 cycles pour le gène 16S rDNA de 95 °C pendant 30s, 56 °C pendant 30s et 72 °C pendant 1min30, suivie d'une élongation finale de 5 min à 72°C.

Cinq microlitres du produit de PCR sont déposés dans un gel d'agarose de 2 % (1g d'agarose dans 50 mL de Tampon) en présence de deux microlitres d'allourdisseur d'ADN (blue orange 6x, promega, USA) et d'un marqueur de poids moléculaire (5 µl) : SmartLadder SF, 1000 lanes (Eurogentec, Belgique). Le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse soumise à un courant de 100 Volts (generateur BIO-Rad power PAC 300). Pendant 30 minutes, la migration des fragments va s'effectuer grâce aux charges négatives portées par les molécules d'ADN. Pour visualiser ces fragments, le gel est immergé pendant 10 minutes dans un bain de 1X TAE (Tris/Acetic Acid/EDTA) buffer (40 Mm Tris, 20mM acetic acid, 1mM EDTA, pH 8,3 ; Bio-Rad, Munchen) contenant du bromure d'éthydiuim à 1 mg/mL, puis rincé pendant 10 minutes dans un bain d'eau. Un cliché est tiré sous lumière ultra-violette à 302 nm qui révèle l'emplacement des fragments d'ADN par rapport à l'échelle moléculaire.

### 2.3 Détection de *Bifidobacterium* GC56 et GC61 par PCR en temps réel

La présence des espèces *B. crudilactis* et *B. vercorsense* a été associée au fromage au lait cru de vache d'une fromagerie française. Ces espèces étaient initialement dénommées respectivement *Bifidobacterium* GC56 et GC61 en relation avec le pourcentage de Guanine-Cytosine (GC%) de leur génome. Les souches de bifidobactéries de Côte d'Ivoire ont été testées par la PCR en temps réel GC56 et GC 61 pour déterminer leur appartenance ou non à ces espèces. Les analyses sur PCR en temps réel ont été effectuées en se basant sur le protocole décrit par Delcenserie et al., en 2005.

Un mix réactionnel de 25µl contenant 0,6 µl d'amorce sens P11 (40 µM), 0,6 µl d'amorce anti-sens P12 (40 µM) (tableau 9), 0,625 µl de sonde FAM (2 µM), 12,5 µl de 2X Taq Master mix (5mM MgCl<sub>2</sub>) (Eurogentec, Belgium), 8,675 µl H<sub>2</sub>O et de 2 µl d'ADN chromosomique a été réalisée pour la PCR simplex en temps réel de GC56. Les concentrations en amorces est de 960 nM de solution finale et en sonde de 200 nM de solution finale.

Un autre mix réactionnel de 25µl contenant 2,25 µl d'amorce sens GC61 (10 µM), 2,25 µl d'amorce anti-sens GC61 (10 µM) (tableau 10), 2 µl de sonde FAM (2,5 µM= 0.25 nM), 12,5 µl de 2X Taq Master mix (5mM MgCl<sub>2</sub>) (Eurogentec, Belgium), 4 µl H<sub>2</sub>O et de 2 µl d'ADN chromosomique a été réalisé pour la PCR simplex en temps réel GC61. Les concentrations en amorces sont de 900 nM de solution finale et en sonde de 200 nM de solution finale.

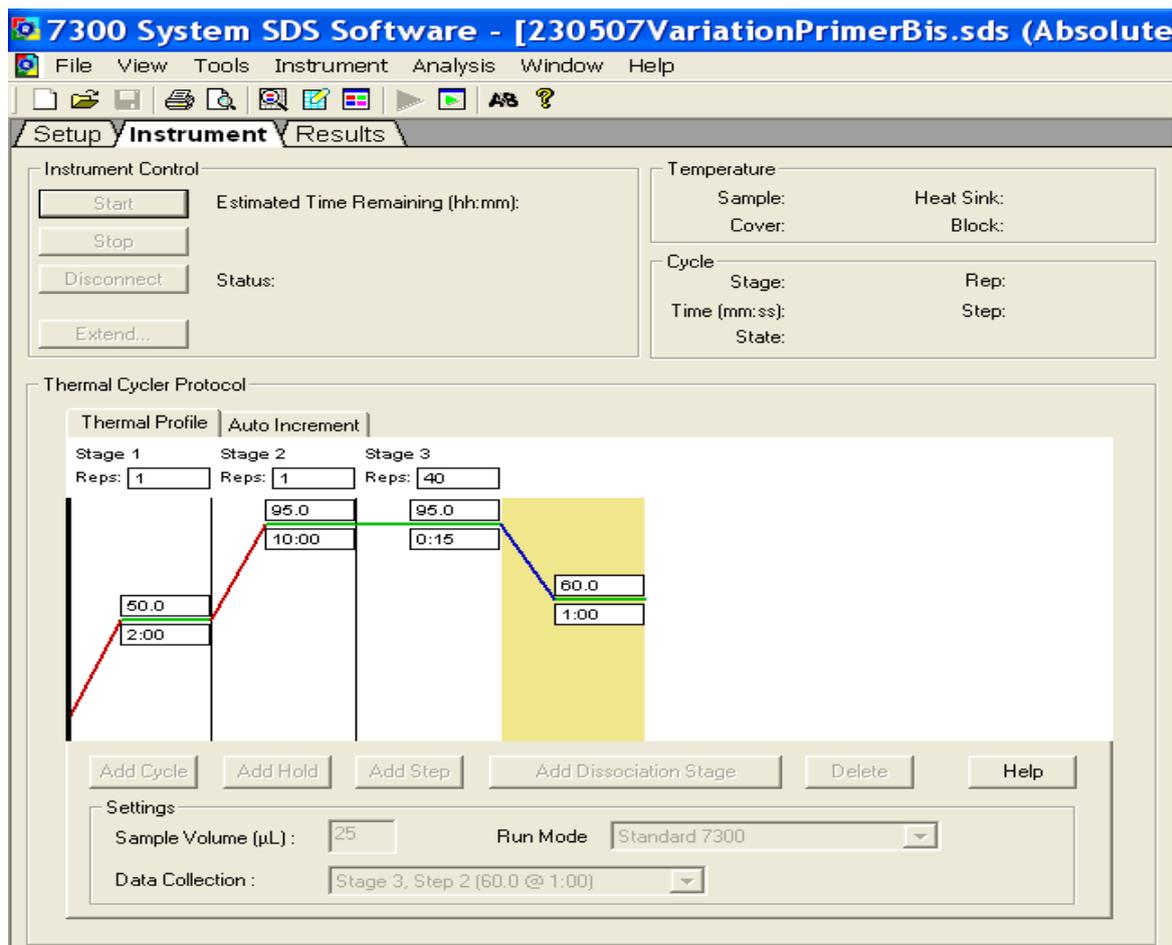
Chaque mix est déposé séparément dans les puits de plaque de réel time PCR différentes et introduit dans le 7300 Real Time PCR system (ABi, Foster city, USA) selon le cycle de température du tableau et de la figure ci-dessous.

**Tableau:** Paires d'amorces utilisées pour la PCR en temps réel

<b>Amorces</b>	<b>Sequences (5' à 3')</b>
GC61 (Up)	5'-TCCGACGCCATCGTCAA-3'
GC61 (Dwn)	5'-CGATCTGCTCCTTGGTTTCC-3'
P11 (Up)	5'-GTCCGACGCCATCGTCAA-3'
P12 (Dwn)	5'-CCGTCCTGGCCAACCTTGT-3'

**Tableau:** Cycle de température de la PCR en temps réel

<b>Étape</b>	<b>Température</b>	<b>Durée (min)</b>	<b>Nombre de reprise</b>
<b>1</b>	50,0 °C	2 :00	1
<b>2</b>	95,0°C	10 :00	1
<b>3</b>	95,0°C	0 :15	40
	60,0°C	1 :00	



**Figure:** Cycle conventionnel de couple temps-température utilisé en PCR en temps réel

## 2.4 Séquençage des produits d'amplifications et analyse des séquences

A partir des fragments amplifiés des gènes *Bifidobacterium hsp60* et 16S rDNA, une étape de séquençage s'impose pour connaître la séquence génétique de ces gènes et identifier les espèces auxquelles appartiennent ces isolats. Les fragments amplifiés ont été purifiés avec le kit wizard SV® gel and PCR clean-up system (Promega, USA) selon les instructions des fabricants et séquencés par la société DNA vision Agrifood (Belgique).

A partir des fragments amplifiés, une étape de séquençage s'impose pour connaître la séquence génétique des gènes d'intérêt hsp60, 16S rDNA.

- **Purification de l'ADN**

Elle est réalisée avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega

### Réactifs

-Membrane Binding Solution

-Membrane Wash Solution concentrée : il faut ajouter le volume d'éthanol 95% indiqué sur le flacon avant utilisation

-Nucléase-Free Water

- Mini-colonnes Wizard SV
- Tubes de collection de 2 mL

Tous les réactifs peuvent être conservés à température ambiante

### **Protocole**

Ajouter un volume égal à celui du produit PCR restant de Membrane Binding Solution dans le puit de la plaque PCR

#### ○ *Liaison de l'ADN*

- Réaliser le montage colonne-tube de collection
- Transférer le produit de PCR préparé dans la colonne et laisser incuber une minute à température ambiante
- Centrifuger à 16 000Xg pendant une minute. Jeter l'éluât et réinsérer le tube de collection

#### ○ *Lavage*

- Ajouter 700 µl de Membrane Wash Solution. Centrifuger à 16 000X g pendant une minute. Jeter l'éluât et réinsérer le tube de collection
- Ajouter 500 µl de Membrane Wash Solution. Centrifuger à 16 000X g pendant cinq minutes.
- Vider le tube de collection et re-centrifuger la colonne-tube de collection pendant une minute pour permettre l'évaporation de résidus d'éthanol

#### ○ *Élution*

- Transférer prudemment la colonne dans un tube éppendorf de 1,5 mL stérile
- Ajouter 500 µl de Nucléase-free Water dans la colonne. Laisser incuber une minute à température ambiante puis centrifuger à 16 000 g pendant une minute
- Jeter la colonne et conserver l'ADN purifié à -20°C
- Préparation de la plaque de séquençage de 96 puits

### • **Séquençage**

### **Matériel et réactifs**

- amorces diluées à 5 µM
- produit PCR purifié
- plaque de séquençage de 96 puits
- automate ABI 3730

Le séquenceur ABI 3730 DNA Analyzer est un système comprenant 48 capillaires respectivement, permettant de développer des applications à haut débit de séquençage et d'analyses de fragments basées sur le principe de marquage multicolore associé à une détection simultanée de plusieurs fluorescences (5 fluorophores différents).

### **Protocole**

Déposer dans un puit de la plaque,

- 1 µl d'une amorce 5 µM
- 1 µl de produit PCR purifié
- 7 µl d'eau pure

Pour le séquençage du produit PCR deux puits sont nécessaires : un contenant l'amorce Fw et l'autre l'amorce Rev. Les puits doivent être remplis de haut en bas. Une fiche avec les indications nécessaires au contenu des puits accompagnera la plaque.

Les échantillons sont alors analysés par la machine et les résultats sont obtenus quelques heures plus tard.

- **Analyse des séquences**

Le séquenceur fournit les résultats exprimés en pics sur un graphique. La succession de ces pics représente les séquences de bases nucléiques qui vont être étudiées minutieusement. Les séquences attribuées aux amorces sens et anti-sens sont données séparément par le logiciel. Les séquences des brins d'ADN anti-sens ont été converties en séquences complémentaires 5'-3' par le logiciel CodonCode Aligner version 3.0.2., pour alors être comparées et corrigées. Les séquences assemblées (voir liste des séquences consensus en annexe IV) sont ensuite comparées aux séquences bactériennes (base de données nucléotidiques) présentes dans le programme BLAST disponible sur le web (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'espèce bactérienne correspondant à la séquence analysée est donc déterminée. Ensuite, les séquences ont été alignées avec le programme ClustalX (Tompson et al., 1997). Un arbre phylogénétique avec *E. coli* comme racine a été construit en utilisant la méthode des plus proches voisins (neighbour-joining method) (Saitou & Mei, 1987) avec les séquences hsp60. L'arbre a été dessiné avec les séquences des gènes de référence en utilisant le programme ClustalX (National Center for Biotechnology Information) et visualisé avec le programme TreeView.

### 3. Liste des séquences consensus du gène hsp60 des espèces de *Bifidobacterium* de Côte d'Ivoire par les amorces P11 et P12

#### >Consensus CI35

```
GTTGTGGCCGGTTCGAACCCGATCGCGCTGCGCCGTGGCATCGAGAAGGCCTCCGACGCGATCGTCAAGGAA
CTCGTGGCCTCCGCAAGCCGGTGGAGACCAAGGAGCAGATCGCCGCGACCGCGACGATCTCCGCAGCCGAC
CCCGAGGTCGCGGAGAAGATCGCCGAGGCGCTCGACAAGGTCGGCCAGGATGGTGTGGTGACCGTCGAGGA
CAACAAGCGCTTCGAA
```

#### >Consensus CI36

```
CCGGATCCAACCCCATCGCCCTTCGTCTGGCATCGAGAAGGCTTCGGCGGCCATCGTCAAGGAGCTCATAGC
CCAGCGCCAAGGACGTGAGACCAAGGAGCAGATCGCGCGACGGCCACGATCTCCGCTGCGGACCCCGAG
GTCGGAGAGAAGATCGCCGAGGCTCTGGACAAGGTCGGCCAGGACGG
```

#### >Consensus CI 38

```
GCGATCGTCAAGGAACTCGTGGCCTCCGCAAGCCGGTGGAGACCAAGGAGCAGATCGCCGCGACCGCGAC
GATCTCCGCAGCCGACCCCGAGGTCGGCGAGAAGATCGCCGAGGCGCTCGACAAGGTCGGCCAGGACGG
```

#### >Consensus CI40

TTTGTGCATGAGGGTCTGAAGAACGTGGTCGCCGGCTCCAACCCGATTGCCCTGCGTCGCGGCATCGAGAAG  
GCCGCCGACGAAATCGTCAAGGAACTGGTCGCTCCGCCAAGGATGTGGAGACCAAGGACCAGATCGCAGCC  
ACCGCAACGATTTCCGCTGCCGATCCTGAGGTCGGCGAGAAGATCGCCGAGGCGCTTGACAAGGTCGGCCAG  
GATGGCGTCGTGACCGTCGAGGACAACAAGCGCTTCGA

**>Consensus CI 43**

TTTGTGCATGAGGGTCTCAAGAACGTTCGTGGCCGGATCCAACCCCATCGCCCTTCGTTCGTGGCATCGAGAAGG  
CTTCGGCGGCCATCGTCAAGGAGCTCATAGCCAGCGCCAAGGACGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCCA  
CGGCCACGATCTCCGCTGCGGACCCCGAGGTCGGAGAGAAGATCGCCGAGGCTCTGGACAAGGTCGGCCAG  
GACGGAG

**>Consensus CI 46**

CTCCGTCCTGGCTCGCCTTGTCCAGAGCCTCGGCCGATCTTCTCTCCGACCTCGGGGTCCGCAGCGGAGATCGTG  
GCCGTCGCCGCGATCTGTCCTTGGTCTCGACGTCCTTGGCGCTGGCTATGAGCTCCTTGACGATGGCCGCCG  
AAGCCTTCTCGATGCCACGACGAAGGGCGATGGGGTTGGATCCGGCCACGACGTTCTTGAGACCCTCATGCAC  
AAA

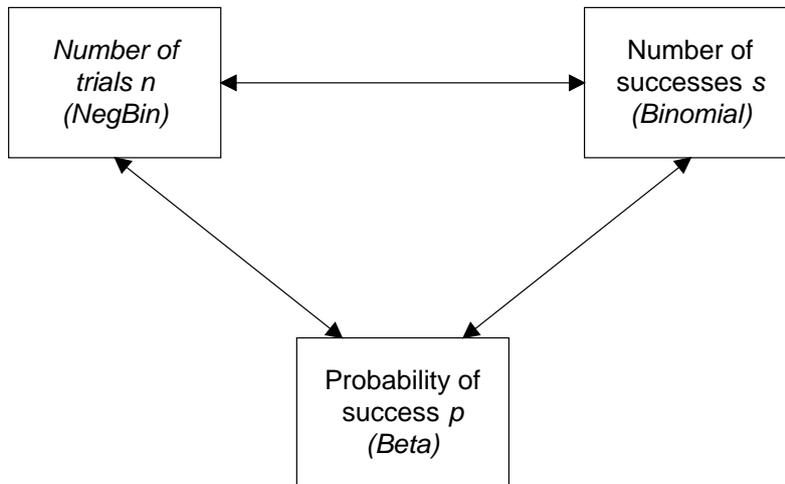
**>Consensus CI53**

TGGCCGGTTCGAACCCGATCGCGCTGCGCCGTGGCATCGAGAAGGCCTCCGACGCGATCGTCAAGGAACTCG  
TGGCCTCTGCCAAGCCGGTGGAGACCAAGGAGCAGATCGCCGCGACCGCGACGATCTCCGCAGCCGACCCCG  
AGGTCGGCGAGAAGATCGCCGAGGCGCTCGACAAGGTCGGCCAGGACGGGA

**>Consensus CI42**

GGGGGGCAGGGAAGGAAGGAAGCACGCTGCGCCGTGGTATCGAGAAGGCCTCCGACGCGATCGTCAAGGA  
ACTCGTGGCCTCCGCCAAGCCGGTGGAGACCAAGGAGCAGATCGCCGCGACCGCGACGATCTCCGCAGCCGA  
CCCCGAGGTCGGCGAGAAGATCGCCGAGGCGCTCGACAAGGTCGGCCAGGACGGAA

## Les fonctions du logiciel ModelRisk



**Figure** : Schematisation de la procedure binomiale en analyse des risques

Les distributions pour la loi binomiale

- $s = \text{Binomial}(n,p)$  où  $P(s=0) = (1-p)^n$
- $n = s + \text{Negbin}(s,p)$  si on arrête le tirage (essai) quand il y a un succès  $s^{\text{th}}$
- $n = s + \text{Negbin}(s+1,p)$  si les tirages continuent même en cas de succès  $s^{\text{th}}$
- $p = \text{Beta}(s+1, n-s+1)$  pour  $\text{Uniform}(0,1)$

$n$  = nombre d'essai ;  $p$  = probabilité de success à un essai ;  $s$ =nombre de succès

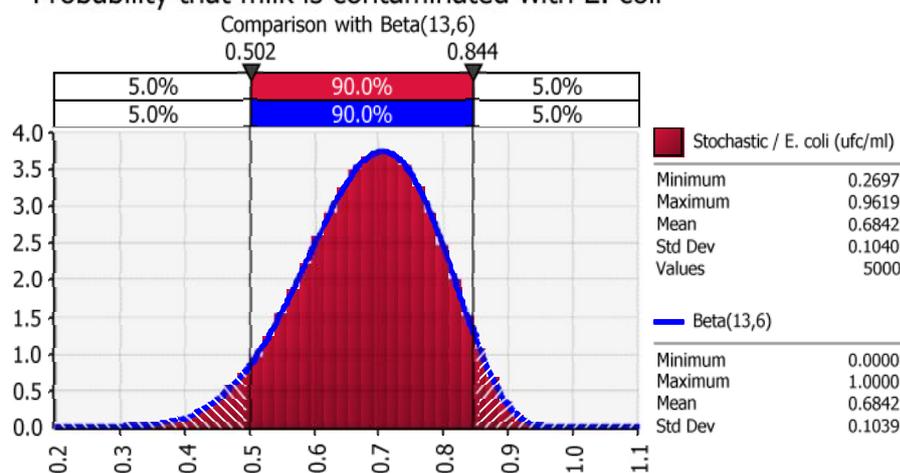
**Table** : Les fonctions de model Risk

Echantillons aléatoire	Fonction	Détails
Binomiale	=VoseBinomial(n, p)	$n$ = nombre d'essais $p$ = probabilité de success à 1 essais
Negative Binomiale	=VoseNegBin(s,p)	$s$ = nombre de succès $p$ = probabilité de success à 1 essais
Beta	=VoseBeta( $a_1, a_2$ )	$a_1$ = parametre de forme 1 (gauche) $a_2$ = parametre de forme 2 (droite)

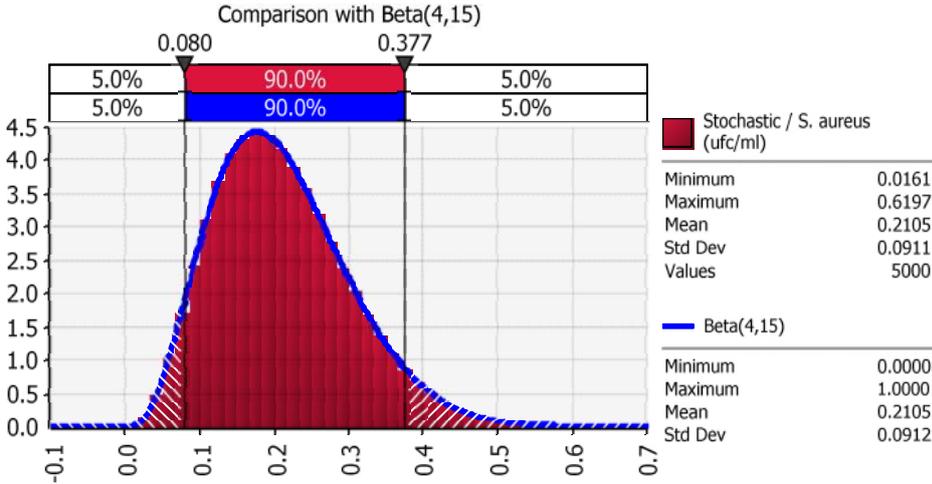
### Simulations de la fréquence de contamination du lait de vente par les microorganismes

N° échantillons de lait de vente (n)	Charge bactérienne (ufc/ml)			Charge tenant compte des 3 bactéries
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i>	Concentration total
1	8200	20000	0	28200
2	40000	26000	1200	67200
3	300000	74000	0	374000
4	0	0	20000	20000
5	300	0	1200	1500
6	30	0	24000	24030
7	130	0	0	130
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	30400	0	7500	37900
12	66000	0	38000	104000
13	312000	0	800	312800
14	4700	0	3300	8000
15	520000	0	110000	630000
16	476000	0	315000	791000
17	0	0	0	0
Nombre d'échantillons positifs (s)	12	3	10	13
Prévalence observée	12/17= 0,7058824	3/17= 0,1764706	10 /17 =0,5882353	13/17 = 0,764706
Stochastic	A=VoseBeta (12+1;17-12+1)	B=VoseBeta (3+1;17-3+1)	C=VoseBeta (10+1;17-10+1)	D=VoseBeta (13+1;17-13+1)
Mean	68,4%	21,5%	57,9%	73,7%
90% CI	50.2-84.4%	8.0-37.7%	39.2-75.6%	56.1-88.3%
Success	VoseBinomial(1;A)	VoseBinomial(1;B)	VoseBinomial(1;C)	VoseBinomial(1;D)

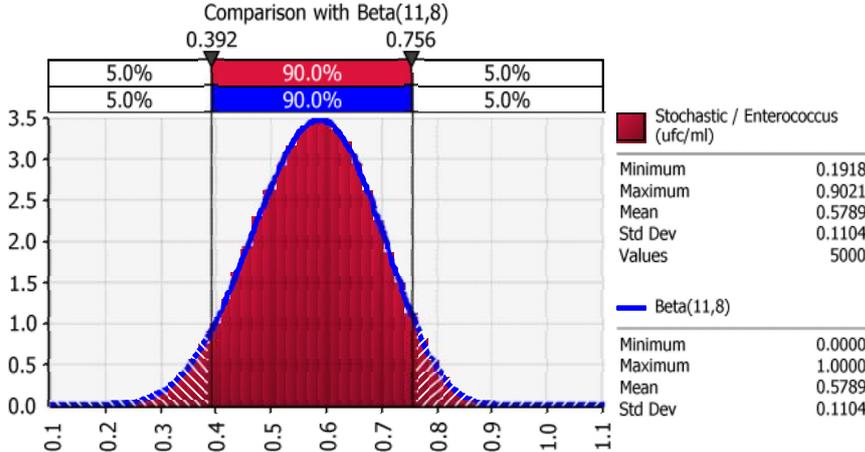
#### Probability that milk is contaminated with E. coli



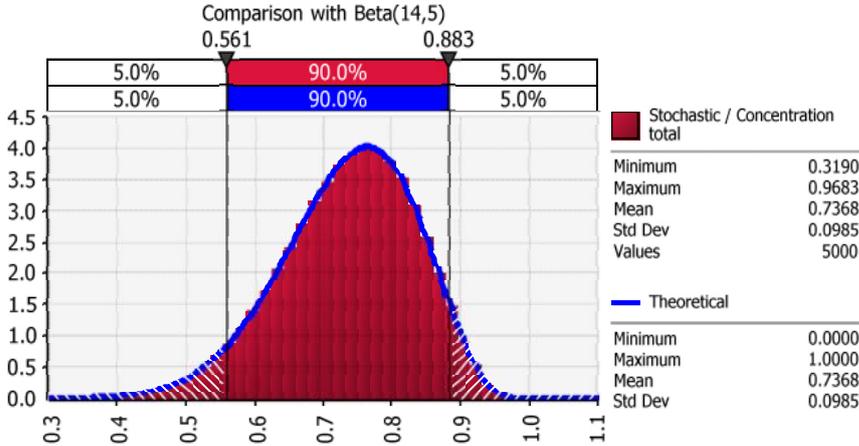
Probability that milk is contaminated with S. aureus



Probability that milk is contaminated with Enterococcus



Probability of milk contaminated with bacteria



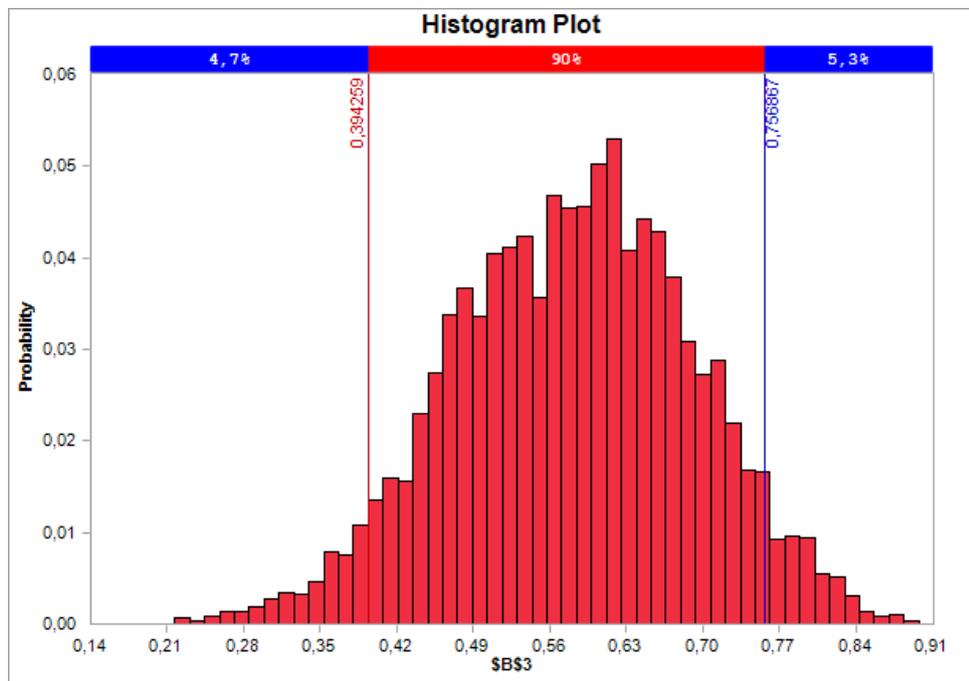
### Simulations de la concentration du lait

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i>
<b>1</b>	8200	20000	1200
<b>2</b>	40000	26000	20000
<b>3</b>	300000	74000	1200
<b>4</b>	300		24000
<b>5</b>	30		7500
<b>6</b>	130		38000
<b>7</b>	30400		800
<b>8</b>	66000		3300
<b>9</b>	312000		110000
<b>10</b>	4700		315000
<b>11</b>	520000		
<b>12</b>	476000		
<b>Bootstrap</b>	=VoseDunifom(A1 :A12)	=VoseDunifom(A1 :A3)	=VoseDunifom(A1 :A10)

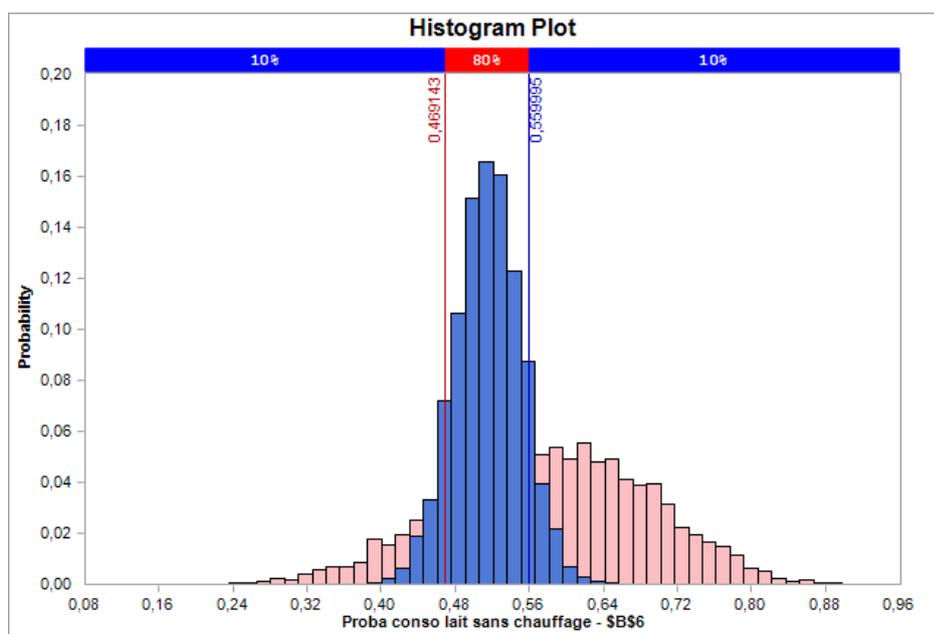
### Simulations des scenarii d'atténuation des risques

Prédiction observée	Prédiction après la mise en œuvre des mesures d'atténuations des risques					
	Contrôle du lait			Campagne de sensibilisation		
$P_{>N} = \text{VoseOutput}(\text{"pr évalence des lait supérieur à la norme"}) + \text{VoseBeta}(10+1;17-10+1)$	0,05	0,1	0,2	$P_{>N}$	$P_{>N}$	$P_{>N}$
$P_{cc} = \text{VoseOutput}(\text{"Probabilité de consommé le lait sans chauffage"}) + \text{VoseBeta}(97+1;188-97+1)$	$P_{cc}$	$P_{cc}$	$P_{cc}$	0,1	0,2	0,05
Probabilité de consommation de lait contaminé	$\text{VoseOutput}(\text{p robabilité de contrôle du lait à } P_{>N}^{=0,05}) + P_{cc} * 0,05$	$\text{VoseOutput}(\text{p robabilité de contrôle du lait à } P_{>N}^{=0,1}) + P_{cc} * 0,1$	$\text{VoseOutput}(\text{p robabilité de contrôle du lait à } P_{>N}^{=0,2}) + P_{cc} * 0,2$	$\text{VoseOutput}(\text{c ampagne } P_{cc}) + P_{>N} * 0,1$	$\text{VoseOutput}(\text{c ampagne } P_{cc}) + P_{>N} * 0,2$	$\text{VoseOutput}(\text{c ampagne } P_{cc}) + P_{>N} * 0,05$
$\text{VoseOutput}(\text{"Probabilité de consommé du lait contaminé"}) + P_{>N} * P_{cc}$						
Nombre de consommateurs de lait contaminé	$\text{VoseOutput}(\text{"Nombre de consommateurs de lait contaminé"}) + P_{cc} * 2180$					

Prévalence de lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique ( $P_{>N}$ ) Probabilité consommation de lait sans chauffage ( $P_{cc}$ )



**Figure** : Prévalence de lait commercialisé ne répondant pas aux normes de qualité microbiologique (5000 itérations)



**Figure** : Simulation de la probabilité de consommer du lait cru ( non chauffé) (5000 itérations)

**PUBLICATIONS TIRÉES DE  
CETTE THESE**



## Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire)

S.M. KOUAMÉ-SINA<sup>1,2</sup>, A. BASSA<sup>1,2</sup>, A. DADIÉ<sup>2</sup>, K. MAKITA<sup>3</sup>, D. GRACE<sup>3</sup>,  
M. DJE<sup>2</sup> et B. BONFOH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, 01 BP 1303 Abidjan 03 .

<sup>2</sup> Université d'Abobo-Adjamé, UFR Sciences et Technologies des Aliments, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

<sup>3</sup> International Livestock Research Institute ILRI, Nairobi, Kenya

✉ Correspondance et tirés à part , e-mail : [kouamesylviemireille@yahoo.fr](mailto:kouamesylviemireille@yahoo.fr)

### Résumé

Les pratiques d'hygiène, la qualité microbiologique et chimique du lait cru de vache de la production à la vente ont été étudiées dans 15 fermes laitières d'Abidjan. L'analyse de la qualité globale du lait cru a montré que 81,5% des échantillons de lait prélevé au pis des vaches étaient de bonne qualité, contre 35,30% seulement pour le lait mis en vente à la température ambiante. La moyenne des Coliformes était de  $8,7 \cdot 10^3$  ufc/ml pour le lait individuel au pis,  $3,2 \cdot 10^5$  ufc/ml pour le lait de mélange et  $9,9 \cdot 10^5$  ufc/ml pour le lait à la vente. Les mamelles des vaches, les mains des trayeurs ont été identifiées comme sources de contamination primaires du lait. Les ustensiles (du berger et du vendeur) et l'air de l'environnement ont été identifiés comme sources de contamination secondaires. De plus, 24,7% des échantillons de lait contenaient des antibiotiques et 50% de ceux en vente étaient mouillés à l'eau. La survenue d'une toxi-infection est significativement liée à la consommation de lait cru non pasteurisé ( $P < 0,05$ ) avec un risque relatif de 2,81 (95%CI : 1,17 – 6,78). L'encadrement zootechnique des acteurs et la vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène tout au long de la chaîne de production est nécessaire pour l'amélioration de la qualité du lait local (RASPA, 8 (S) : 35-42).

**Mots-clés :** Lait cru - Qualité - Ferme - Infection - Abidjan

### Abstract

#### Microbial risk analysis of local raw milk in Abidjan (Côte d'Ivoire).

The hygiene practices during milking, the microbiological and chemical quality of cow raw milk from production to sale were studied in 15 small dairies in Abidjan. The analysis of raw milk quality showed that 81.5% of raw milk taken udders of cow were of good quality, against 35.30% for raw milk on sale. The average of Coliforms was  $8.7 \cdot 10^3$  cfu/ml for raw milk taken cow's udder,  $3.2 \cdot 10^5$  cfu/ml for raw milk in tank and  $9.9 \cdot 10^5$  cfu/ml for raw milk sales. The udders of cows, hands of milkers were identified as primary sources of milk contamination. The utensils (farmer, vendor) and environment were identified as major sources of secondary contamination. In addition, 24.7% of milk contained antibiotics and 50% of raw milk on sale were wet with water. The occurrence of food borne diseases is significantly related to the behavior of consumption of unpasteurized raw milk ( $P < 0.05$ ) with a relative risk of 2.81 (95%CI: 1.17 – 6.78). The zootechnical management of actors and popularization of good hygiene practices throughout the production chain are necessary for improvement of local milk quality.

**Key-Words:** Raw milk - Quality - Farm - Infection - Abidjan

## Introduction

En Côte d'Ivoire, la consommation du lait et des produits laitiers en milieu urbain est l'une des plus élevées en Afrique subsaharienne [10]. Les populations pastorales du nord du fait de leurs habitudes alimentaires consomment beaucoup de lait que ceux du sud majoritairement agriculteurs. Le lait local est le plus souvent consommé cru ou fermenté [10], [13].

La production nationale de lait ne couvre que 10 à 18% de la demande nationale [2]. Pour combler ce déficit, les autorités ont recours à de fortes importations de produits laitiers tout en développant l'élevage [9]. Par ailleurs, de petites fermes de production laitières ont été créées à

Abidjan par des fonctionnaires ou des hommes d'affaires ivoiriens ou étrangers qui en ont confié la gestion aux Peuls originaires du Mali, du Burkina Faso ou de la Guinée.

L'organisation informelle de la filière, la faiblesse du système de réglementation et des structures de contrôle de la qualité, ne permettent pas d'assurer une qualité hygiénique suffisante des produits laitiers [11]. Ce problème est amplifié par les conditions climatiques que sont la chaleur et l'humidité relative.

Le lait cru, ou lait n'ayant subi aucun traitement d'assainissement, peut contenir des bactéries appartenant

aux genres *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire comme la fièvre, les vomissements, la diarrhée voire l'insuffisance rénale, les fausses couches et même la mort [8]. Ignorants des bonnes pratiques d'hygiène, les acteurs de la filière laitière locale, contribuent à la dissémination et à la multiplication des germes pathogènes dans le lait lors de la traite et de la commercialisation.

On constate à travers le monde, deux approches alternatives pour assurer la sécurité sanitaire du lait. Aux États-Unis l'accent est mis sur le contrôle et la stérilisation tandis qu'en Europe la gestion de la qualité et de la sécurité tout le long de la chaîne est privilégiée [17]. Différentes études ont été menées pour déterminer les origines de la contamination du lait à la production en vue de mettre en place, au sein de ces filières, des programmes de lutte adaptées et préserver la santé des consommateurs [5] ; [16] ; [19] ; [23].

L'une des conséquences de la pauvreté et de l'ignorance est la prévalence élevée des maladies d'origine alimentaire. Les contaminations biologiques causent 2 milliards d'épisodes de maladies par an, avec près de 70% de diarrhées épisodiques chez les moins de cinq ans. Les toxi-infections alimentaires constituent un grave problème de santé publique autant pour les pays riches que pour les pays pauvres. De façon consensuelle, l'analyse des risques est perçue comme la meilleure façon de les gérer [15].

Les objectifs de la présente étude sont de (i) déterminer les caractéristiques physico-chimiques et bactériologiques du lait cru local, (ii) identifier les facteurs de risque de la contamination du lait de la production à la vente et (iii) caractériser le risque pour le consommateur.

## Matériel et Méthodes

### 1. ECHANTILLONNAGE

Il s'agit d'une étude transversale, réalisée d'Octobre 2008 à Septembre 2009 dans de petites exploitations laitières traditionnelles de la ville d'Abidjan. Cinq sites de production laitière ont été sélectionnés dans la zone périurbaine d'Abidjan. Il s'agit du site de l'abattoir d'Abidjan Port-Bouët (4 fermes et 6 vendeurs de lait), du site de Yopougon Lièvre-rouge (2 fermes et 2 vendeurs de lait), du site d'Abobo derrière les rails (7 vendeurs de lait), du site de N'dotré (8 fermes) et du site de Songon (1 ferme), soit au total, 15 fermes et 15 points de vente. Pour connaître l'origine de la contamination du lait de vache, des échantillons de lait cru ainsi que des échantillons de l'environnement ont été prélevés au cours de la traite dans les fermes et aux lieux de vente à la périphérie des fermes. Avant la traite, 100 ml d'eau utilisée pour la traite, 100 ml d'eau de rinçage des ustensiles de traite, un écouvillon de la main du

trayeur et de la peau des mamelles de chaque vache ont été prélevés. Pendant la traite, un flacon contenant de l'eau stérile est exposé pendant 15 minutes (échantillon de l'environnement) pour évaluer la pollution de l'environnement. Sur chaque site, un seul passage est effectué et 100 ml de lait cru prélevé directement du pis de la vache (individuelle), du lait de mélange de toutes les vaches (dans le bidon du berger) et du lait en vente aux abords des fermes ont été collectés dans des flacons stériles, conservés à + 4°C et analysés dans l'heure.

### 2. ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DU LAIT CRU

La température ambiante et la température du lait ont été prises au moment des prélèvements à la ferme et chez chaque vendeur à l'aide d'un thermomètre digital (DT150 Summit). La mesure du pH (Microprocessor pH Meter, pH 211, HANNA Instruments), la recherche de la présence de résidus d'antibiotiques (test de yoghourt), la densité du lait de vente et la contamination microbienne globale par le test à la résazurine ont été aussi réalisées [5] ; [20].

### 3. DÉNOMBREMENT DES GERMES DE CONTAMINATION

Tous les échantillons prélevés, ont été analysés par la méthode classique de bactériologie. Le dénombrement et la recherche de *Salmonella* (AFNOR NF V 08- 52), des Coliformes totaux, de *Escherichia coli* (AFNOR NF V 08-017), de *Staphylococcus aureus* (AFNOR NF V 08-057), et des Entérocoques fécaux ont été réalisés selon les recommandations du manuel suisse des denrées alimentaires (2000).

### 4. ETUDE DES POINTS CRITIQUES DE CONTAMINATION ET DU MODE DE CONSOMMATION DU LAIT

Deux enquêtes ont été réalisées : l'une, sur le mode de consommation du lait local auprès de 188 consommateurs aux différents points de vente ; l'autre, auprès des éleveurs afin d'identifier et caractériser les éléments de base du fonctionnement des fermes et les pratiques des acteurs.

### 5. ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été saisies avec le logiciel Epi info version 3.5.1 et analysées avec le logiciel R version 2.8.1. Les moyennes géométriques des dénombrements des germes de contamination ont été effectuées et les dénombrements transformés en Log 10 pour subir une régression avec les points critiques (pis, ferme, vendeur). Les statistiques descriptives ont été effectuées pour toutes les variables. Les fréquences ont été calculées pour les variables quantitatives et les moyennes. En outre, le test de Chi carré a été utilisé pour tester les relations entre les variables. Les intervalles de confiance 95% ont été calculés avec le 1-sample proportions test [24]. La probabilité d'ingestion de lait cru contaminé a été déterminée en faisant est le produit de la proportion de consommation de lait cru et de la proportion de lait en vente de qualité microbiologique non satisfaisante. Le risque relatif lié à la consommation du lait a été calculé selon les méthodes de KARTZ *et al.* (1978) et THRUSFIELD (2005) avec les données du tableau VI. Le seuil de signification a été fixé à  $p < 0,05$ .

## Résultats

### 1. DESCRIPTION DE LA FILIÈRE ET DES PRATIQUES DE PRODUCTION

Le lait cru produit dans la zone d'étude est destiné à la vente. Sur l'ensemble des 15 fermes (Port-Bouet, Lièvre rouge, Songon, N'dotrè) seulement 150 litres de lait étaient produits par jour et la moyenne de production était de 10 litres/jour/ferme (min 2L / j / ferme ; max 20L/j/ferme). Le nombre moyen de vaches en lactation

par ferme était de 8 (min 2, max 20). L'enquête réalisée sur les systèmes de production du lait a permis d'identifier les paramètres influençant la qualité microbiologique du lait cru à la ferme (tableau I). Dans toutes les fermes, les pis des vaches n'étaient pas lavés avant la traite. C'est la tétée du veau qui assurait le nettoyage du pis. Très peu de trayeurs se lavaient les mains (13,3%) et les ustensiles n'étaient pas bien lavés non plus. L'eau utilisée pour le nettoyage de la mamelle avant la traite et le lavage des ustensiles provenait d'un étang dans 40% des fermes.

**Tableau I : Paramètres influençant la qualité microbiologique du lait à la ferme**

Paramètres	Application/ferme	Pourcentage
Lavage des mains du trayeur avant la traite	2/15	13,3%
Lavage des mamelles	0/15	0%
Tenues propres du trayeur	5/15	33,3%
Traitement du lait par filtration	4/15	26,6%
Traitement du lait par pasteurisation	0/15	0%
Ustensiles de traite bien lavés et en bon état	1/15	6,6%
Eau de traite provenant du réseau	5/15	33,3%
Eau de traite provenant d'un puit	4/15	26,6%
Eau de traite provenant d'un étang	6/15	40%
Proximité d'une décharge ou déchèterie	7/15	46,6%
Présence de chiens	9/15	60%
Présence de rongeurs	15/15	100%
Présence de porcs	0/15	0%
Émission de bouses par la vache pendant la traite	8/15	53,3%
Présence de volailles dans le voisinage	6/15	40%
Présence de volailles sur l'exploitation	5/15	33,3%

### 2. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUE DU LAIT

Dans cette étude, il n'y a pas eu de différence significative entre les pH du lait prélevé aux différentes étapes de la production à la vente ( $P > 0,05$ ). Les moyennes étaient respectivement de 6,7 ; 6,8 et 6,9 pour le lait prélevé directement du pis, le lait de mélange et le lait de vente. Cependant, 29,33% seulement des échantillons de lait prélevés respectaient les standards pH du lait normal ( $6,6 < \text{pH} < 6,8$ ). La température moyenne du lait cru est de 31,9°C (min=27°C ; max =34,7°C) à la vente, avec une température ambiante moyenne de 29°C (min =24,1°C ; max =34,2°C). Par ailleurs, la mesure de la densité du lait a montré que 50% des échantillons de lait cru en vente aux abords des fermes avaient une densité inférieure à 1,028. C'étaient

donc du lait mouillé à l'eau. le nettoyage du pis. Très peu de trayeurs se lavaient les mains (13,3%) et les ustensiles n'étaient pas bien lavés non plus. L'eau utilisée pour la traite et le lavage des ustensiles provenait d'un étang dans 40% des fermes.

### 3. PRÉSENCE DE RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Sur 150 échantillons de lait cru analysés, 24,7% contenaient des antibiotiques ou des résidus de médicaments dont 25,2% du lait cru de ferme et 17,6% du lait de vente. La fréquence varie significativement selon les sites ( $P < 0,05$ ). A Songon, tous les échantillons de lait contenaient des résidus d'antibiotiques alors qu'aucun des échantillons analysés à Abobo n'en contenait (tableau II).

Tableau II : Présence d'inhibiteurs dans le lait par site

Site	Total des échantillons	Résidus d'antibiotiques	Prévalence de lait (95%CI)* contenant des antibiotiques %
Abobo	7	0	0 (0 - 43,9)*
Lièvre rouge	39	17	43,6 (28,2 - 60,2)*
N'dotré	65	3	4,6 (1,2 - 13,8)*
Port-Bouet	29	7	24,1 (11,0 - 43,9)*
Songon	10	10	100 (65,5 - 100)*
Total	150	37	24,7 (18,2 - 32,5)*

\*Intervalle de confiance 95%

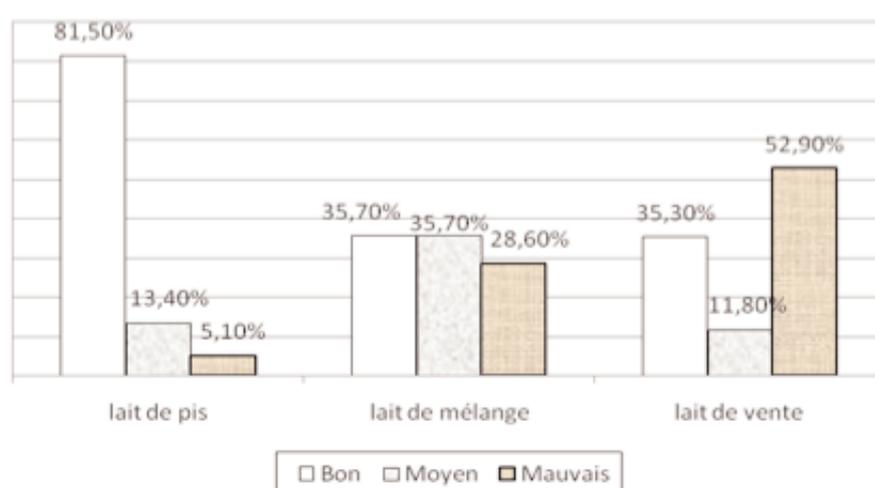


Figure 1 : Qualité du lait cru selon la charge microbienne

#### 4. QUALITÉ GLOBALE DU LAIT

Les tests à la résazurine ont révélé que 12,7% des échantillons de lait avaient une charge microbienne très élevée (mauvais lait), 15,3% une charge moyenne (lait de qualité moyenne) et 72% avaient une charge faible (bon lait). Le lait de bonne qualité est le lait pris directement au pis des vaches (81,50%) par opposition au lait en vente dont 52,90% étaient de mauvaise qualité (figure 1).

#### 5. SOURCES DE CONTAMINATION DU LAIT

##### 5.1. Origine de la contamination du lait à la ferme

Les sources de contaminants microbiens du lait sont les ustensiles, l'environnement de la ferme, l'eau utilisée pour différentes étapes de la traite, les mains des trayeurs et les pis des vaches (Tableau III). Les prévalences d'échantillons contaminés par les bactéries étudiées (*Coliformes* totaux, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et Entérocoques fécaux) variaient de 40% pour les mains des trayeurs à 66,7% pour les ustensiles. Les coliformes totaux étaient présents dans

tous les types d'échantillons à des charges moyennes variant entre 2,6 log<sub>10</sub>ufc/ml dans les échantillons des ustensiles et 1,7 log<sub>10</sub>ufc/ml dans l'eau de traite (figure 2). *Escherichia coli* et les entérocoques n'avaient pas été détectés dans les prélèvements des mains des trayeurs, mais ont été le plus trouvés dans les prélèvements d'ustensiles (2,3 log<sub>10</sub> ufc/ml et 2,9 log<sub>10</sub> ufc/ml respectivement), d'environnement (1,6 log<sub>10</sub> ufc/ml et 2,7 log<sub>10</sub> ufc/ml respectivement) et à des charges plus faibles (0,4 log<sub>10</sub> ufc/ml et 0,2 log<sub>10</sub> ufc/ml respectivement) sur les mamelles. Quant aux *Staphylococcus aureus*, ils provenaient essentiellement de l'eau utilisée dans les différentes étapes de la traite, des mains des trayeurs et des mamelles (figure 2).

##### 5.2. Points critiques et présence des contaminants du lait

Il y avait une différence significative de la présence de contaminants microbiens dans le lait ( $P < 0,05$ ) de la ferme à la vente. Sur l'ensemble des échantillons de lait cru analysés, aucune *Salmonella* sp. n'avait été isolée.

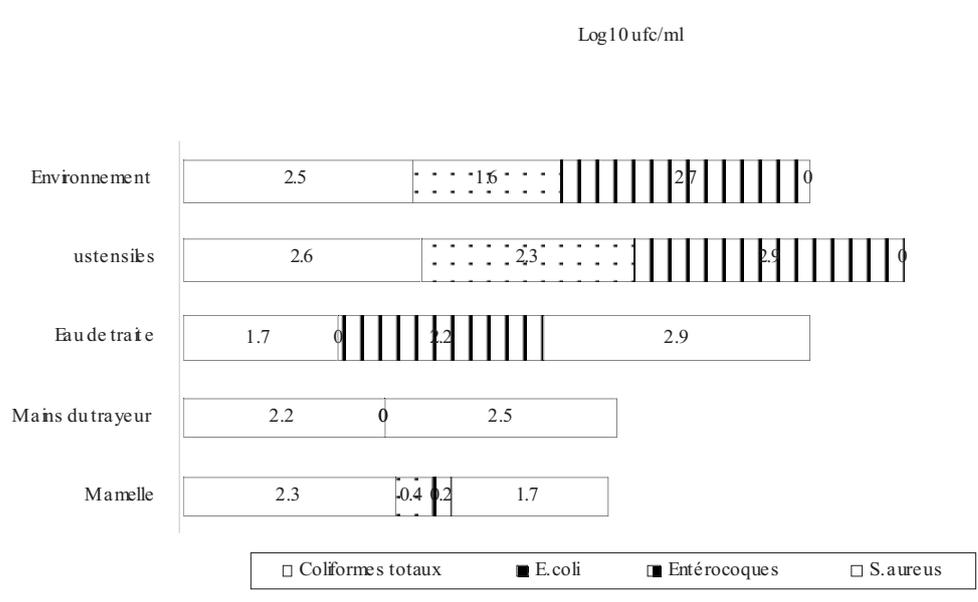
Dans le lait prélevé au pis des vaches, 22,26% des échantillons contenaient des coliformes totaux, 8,40% des *E. coli*, 6,7% des *S. aureus* et 4% des entérocoques fécaux. Dans le lait en vente, les fréquences étaient

respectivement de 94,1%, 70,5%, 17,6% et 58,8%. Dans le lait de mélange, le nombre d'échantillons contenant les germes étudiés étaient supérieurs à ceux observés dans le lait prélevé au pis des vaches (Tableau IV).

**Tableau III : Prévalence de contaminants microbiens dans les échantillons de l'environnement**

	Présence des bactéries étudiées	Total des échantillons	Prévalence d'échantillons contaminés (%) 95%CI*
Environnement	5	15	33,3 (13,0-61,3)*
Eau utilisée au cours des étapes de la traite	9	15	60,0 (32,9-82,5)*
Ustensiles	10	15	66,7 (38,7-87,0)*
Mains des trayeurs	8	20	40,0 (20,0-63,6) *
Mamelles	50	113	44,2 (35,0-53,9)*
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>178</b>	<b>46,1 (38,6-53,7)*</b>

\*Intervalle de confiance 95%



**Figure 2 : Log<sub>10</sub> des moyennes géométriques des contaminants microbiens du lait à la ferme**

**Tableau IV : Prévalence des contaminants microbiens aux différents points critiques de la chaîne de production**

	Présence de Coliformes totaux	Présence de <i>E. coli</i>	Présence de <i>S. aureus</i>	Présence de Entérocoques
Lait individuel	27/118	10/118	8/118	5/118
Prévalence (%)	(22,8%)	(8,4%)	(6,7%)	(4,2%)
Lait de mélange	12/15	6/15	3/15	5/15
Prévalence (%)	(80,0%)	(40,0%)	(20,0%)	(33,3%)
Lait en vente	16/17	12/17	3/17	10/17
Prévalence (%)	(94,1%)	(70,5%)	(17,6%)	(58,8%)
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>20</b>
<b>Prévalence (%)</b>	<b>(36,6%)</b>	<b>(18,6%)</b>	<b>(9,3%)</b>	<b>(13,3%)</b>

### 5.3. Evolution de la qualité microbiologique du lait de la ferme à la vente

Les charges moyennes en coliformes totaux ( $3,2 \cdot 10^5$  ufc/ml), *Escherichia coli* ( $1,5 \cdot 10^3$  ufc/ml), *Staphylococcus aureus* ( $7,05 \cdot 10^3$  ufc/ml) et Entérocoques fécaux ( $3,1 \cdot 10^3$  ufc/ml) des échantillons de lait de mélange étaient nettement supérieures à celles du lait pris au pis des vaches et inférieures à celles des échantillons de lait mis en vente. La charge en germes de contamination augmentait progressivement du lait cru du pis au lait de vente (tableau V).

### 6. DANGER POUR LA POPULATION ÉTUDIÉE

L'enquête sur le mode de consommation du lait cru local a montré que l'âge moyen des consommateurs est de 35 ans (min=16 et max=90 ; SD=13,8614) et que 51,5% consomment le lait cru directement après achat sans traitement thermique, ni fermentation. La consommation est journalière chez 28% des personnes enquêtées avec une moyenne de 0,5 litre/jour/personne dans la zone d'étude. La concentration moyenne de germes ingérés par millilitre de lait en vente contaminé est estimée à

$2,8 \times 10^5$  ufc/ml (tableau V). En tenant compte des limites de non satisfaction aux critères pour le lait cru de consommation humaine (réglementation 2073/2005/CE), douze échantillons de lait cru en vente sur 17 étaient de qualité microbiologique non satisfaisante pour l'ensemble des germes étudiés soit 70,5%. Il ressort donc que la probabilité d'ingestion de lait cru contaminé est le produit de la proportion de consommation de lait cru (51,5%) et de la proportion de lait en vente de qualité microbiologique non satisfaisante (70,5%, exemple de *S. aureus*). Cette probabilité est de 0,36.

L'enquête a aussi révélé que 12,8% des consommateurs ont déjà été malades suite à la consommation de lait local n'ayant subi aucun traitement (tableau VI). La survenue de la maladie ou toxi-infection après la consommation du lait local est significativement liée au traitement du lait (ni chauffé, ni fermenté) ( $P < 0,05$ ) avec un risque relatif (RR) de 2,81 (95%CI : 1,17 – 6,78).

Les symptômes développés après la consommation du lait étaient la diarrhée, les vomissements, la fièvre, les crampes d'estomac (tableau VII). La diarrhée était le symptôme le plus rencontré avec une prévalence de 7,4% chez les consommateurs.

**Tableau V : Moyennes géométriques (ufc/ml) des germes de contamination du lait cru**

	Lait individuel Moyenne (ufc/ml)	Lait de mélange Moyenne (ufc/ml)	Lait de vente Moyenne (ufc/ml)
Coliformes	$8,7 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^5$
<i>E. coli</i>	$5,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^5$
<i>S. aureus</i>	$2,1 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^4$
Entérocoques	$6,7 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^4$

**Tableau VI : Effet du traitement thermique du lait sur la survenue de la maladie**

	Effectif des personnes malades après consommation du lait	Effectif des personnes saines après consommation du lait
Consommation sans traitement thermique, ni fermentation	18	79
Consommation après traitement thermique ou fermentation	6	85
Total	24	164

Chi carré corrigé par Yates = 5,01 P= 0,025 RR=2,81 (95% CI: 1.17-6.78)

Tableau VII : Toxi-infections développés après ingestion du lait cru local

Symptômes	Réponse positive/population total	Prévalence (%) 95%CI*
Diarrhées	14/188	7,4 (4,28 – 12,42)*
Vomissements	1/188	0,5 (0,02 – 3,38)*
Fièvre	1/188	0,5 (0,02 – 3,38)*
Fièvre + vomissements	1/188	0,5 (0,02 – 3,38)*
Crampes d'estomac	4/188	2,1 (0,68 – 5,71)*
Diarrhées + fièvre + vomissements	3/188	1,6 (0,41 – 4,96)*

## Discussion

La traite du lait dans les fermes de cette étude est manuelle et les mauvaises pratiques hygiéniques des trayeurs (eau de traite de mauvaise qualité, ustensiles de traite mal lavés, mains sales des trayeurs, particules de bouses passant dans le lait lors de la traite, mamelles sales non nettoyées) constituent un risque évident de contamination microbienne.

La chaîne de froid étant inexistante dans tous les circuits observés, la température moyenne du lait cru en vente (31,9°C) était très élevée. Cette exposition du lait à la température ambiante pendant la vente contribue à l'altération de la qualité du lait et des produits laitiers. De plus les valeurs de pH ou de la densité de 50% des échantillons de lait cru en vente étaient anormales. Ces valeurs (pH>6,8 et densité < 1,028) montrent que les échantillons de lait en vente étaient mouillés à l'eau par les vendeurs pour augmenter leur revenu. Cette eau de mouillage, qui n'est pas toujours potable était une source de contamination non négligeable. Cette pratique est plus fréquente sur les sites de lièvre rouge. A Bamako, au Mali, 22% du lait frais local étaient aussi mouillés à l'eau [4].

Un lait ne doit normalement pas contenir d'antibiotiques et/ou de résidus de médicaments. Mais sur 150 échantillons de lait cru analysés, 24,7% contenaient des résidus antibiotiques. Ces chiffres traduisent l'ampleur de l'utilisation des antibiotiques dans les fermes laitières à Abidjan. Généralement c'est l'oxytétracycline qui est utilisée pour traiter les vaches malades. La présence de résidus d'antibiotiques dans le lait serait due au non respect des délais d'attente légaux, au déficit de sensibilisation et de contrôle par les services en charge de la qualité. Les résidus d'antibiotiques peuvent induire une antibiorésistance des pathogènes, entraîner chez le consommateur des perturbations de la flore intestinale normale, des troubles digestifs et des réactions allergiques [6], [29]. D'autre part, un lait contenant des

concentrations trop importantes d'antibiotiques est impropre à la fabrication de crème mature pour lesquelles une fermentation intervient (yaourt, fromage, beurre).

La qualité globale du lait a été évaluée par le test à la résazurine qui permet d'apprécier la charge microbienne du lait à travers l'observation de la durée de décoloration. De la traite à la vente, la qualité du lait s'altère rapidement. Du pis à la vente, la proportion de lait de bonne qualité avait chuté de 81,50% à 35,30%. Cette altération rapide de la qualité microbiologique du lait est en partie liée aux conditions hygiéniques de la traite, notamment la propreté des mamelles et des ustensiles de récolte (calebasse, bidon du berger) et des conditions de vente (bidons du vendeur, température ambiante). Le dénombrement des microorganismes a révélé que la peau des mamelles portait tous les germes recherchés (Coliformes totaux, *E. coli*, *S. aureus*, et Entérocoques fécaux). Les mamelles de certaines vaches seraient plus contaminées que d'autres et l'effet additif contribue à la baisse de la qualité du lait de mélange.

En plus des contaminations liées aux mamelles, *S. aureus* était apporté secondairement dans le lait par l'eau de traite et les mains des trayeurs ; *E. coli* par l'environnement et les ustensiles ; les Entérocoques par l'environnement, l'eau de traite et les ustensiles. La présence de chiens et de rongeurs dans l'environnement des vaches peut constituer une source de contamination des ustensiles qui ne sont pas rangés hors de portée de ces animaux. L'amélioration de la qualité du lait local dépend donc de la propreté de la traite, des trayeurs, des animaux et de la bonne séparation physique entre les animaux d'espèces différentes pour éviter les contaminations croisées.

Dans les élevages, les déjections des bovins constituent le principal réservoir des coliformes, en particulier de l'espèce *E. coli* mais aussi des Entérocoques fécaux. L'origine de cette contamination a été étudiée sur des échantillons de lait de mauvaise qualité bactériologique,

[26]. En dehors de la source fécale, des mains des trayeurs et des ustensiles, la contamination du lait peut être due à l'excrétion mammaire en cas d'infection à *E. coli*. [16]. [28].

*S. aureus* et *Enterococcus* peuvent avoir aussi une origine intra-mammaire due aux mammites sub-cliniques des vaches. Les infections mammaires à *S. aureus* constituent la principale source de contamination du lait à la production [12]. Cette bactérie est responsable d'une proportion importante des mammites sub-cliniques et chroniques chez la vache laitière, et d'environ un tiers des mammites cliniques. Les quantités de *S. aureus* excrétées dans le lait des quartiers infectés peuvent être considérables, de  $10^3$  à  $10^5$  bactéries/ml en moyenne, mais pouvant atteindre  $10^6$  bactéries/ml en cas d'infection sub-clinique, et jusqu'à  $10^8$  bactéries/ml en cas d'infection clinique [12].

Dans la zone d'étude, l'âge moyen des consommateurs est de 35 ans et 12,8% d'entre eux avaient déjà été malades après avoir consommé du lait qui n'a été ni chauffé, ni fermenté. L'analyse microbiologique a montré que 70,5% du lait cru en vente ne respectent pas les normes internationales et la probabilité de consommer du lait cru contaminé était de 0,36. La présence des *E. coli*, des Entérocoques fécaux dans le lait indique la présence possible de micro-organismes entéropathogènes et le risque de développer une gastro-entérite [27], [31].

Quant à *Staphylococcus aureus* son caractère pathogène est directement lié à son entérotoxine et sa coagulase [7]. La consommation directe du lait cru (51,5% des consommateurs) pourrait entraîner des toxoinfections qui se manifestent par des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, crampes d'estomac et diarrhée) et la fièvre habituellement de courte durée [3] ; [17] ; [18]. Chez les personnes sensibles, telles que les bébés, les personnes âgées et les personnes présentant un déficit immunitaire, les effets peuvent être plus graves à chroniques (lésions rénales) ou même mortels [1].

## Conclusion

L'analyse de la qualité du lait cru local a montré que ce lait au pis est de bonne qualité, mais cette qualité s'altère rapidement lorsque les prélèvements sont mélangés pour la commercialisation. La recherche des nids de contamination sur tout le circuit du lait local a montré que les contaminations microbiennes primaires proviennent des mamelles, des mains des trayeurs. Les ustensiles et l'environnement constituent les sources de contamination secondaire du lait par les germes. De plus des résidus d'antibiotiques ont été détectés dans les échantillons de lait analysés.

L'amélioration de la qualité du lait local ne peut se faire que par des mesures d'hygiène adaptées. La mauvaise qualité hygiénique du lait local pouvant constituer un risque pour la santé publique, les autorités chargées du contrôle des denrées alimentaires devraient mettre en place une politique de qualité avec la vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène et un encadrement zootechnique de tous les acteurs de la filière. De plus la diffusion d'un avis recommandant à la population de faire bouillir le lait local avant toute consommation devrait être faite.

## Remerciements

Cette étude a été financée par International Livestock Research Institute ILRI/GTZ/BMZ, par une bourse de International Foundation for Sciences (ref : E/4488-1), par le Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire à qui nous exprimons notre gratitude pour leur sollicitude.

Nous tenons également à remercier l'équipe du laboratoire du CSRS et l'ensemble des éleveurs.

## Bibliographie

- 1- ALLERBERGER F.; FRIEDRICH A.W.; GRIF K.; DIERICH M.P.; DORNBUSCH H.J.; MACHE C.J. ; NACHBAUR E. ; FREILINGER M. ; RIECK P. ; WAGNER M. ; CAPRIOLI A. ; KARCH H., et ZIMMERHACK L.B., 2003.-Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic Escherichia coli O26: H infection and consumption of unpasteurised cow's milk. *Int. J. Infect. Dis.*, 7: 42- 45.
- 2- BAD. 2002.- Projet de développement de l'élevage phase II. Évaluation à mi- parcours, Rapport définitif. BDPA. Banque Africaine de Développement.Abidjan. Côte d'Ivoire-215 p.
- 3- BELOMARIA M. ; AHAMI A.O.T. ; ABOUSSALEH Y. ; ELBOUHALI B. ; CERRAH Y. et SOULAYMANI A., 2007.- Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Charda Bni Hssen. *Antropo*, 14 : 83-88.
- 4- BONFOH B. ; FANE A. ; DEM S. ; TRAORE H. ; SIMBÉ C. F. ; ALFAROUKH I. O. ; NICOLET J. ; REHBERGER B. ; FARAH, Z. et ZINSSTAG, J., 2003.- Caractéristiques physico-chimiques et biologiques du lait et des produits laitiers vendus à Bamako. *Sahelian Studies and Research* (8-9):7-12.
- 5- BONFOH B. ; WASEM A. ; TRAORE A.N. ; FANE A. ; SPILLMANN H. ; SIMBÉ C.F. ; ALFAROUKH I.O. ; NICOLET J. ; FARAH Z. et ZINSSTAG J., 2003.- Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14: 495-500.
- 6- BRADY M. S., et KATZ S. E., 1988.- Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *J. Food Protection*, 51 :8-11.
- 7- CARMO L. S.; DIAS R. S.; LINARDI V. R.; SENA M. J.; SANTOS D. A.; FARIA M. E.; PENA E. C.; JETT M. et HENEINE L. G., 2002.- Food poisoning due to enterotoxigenic strain of *Staphylococcus aureus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, 19: 9-14.
- 8- De BUYSER M. L.; DUFOUR B.; MAIRE M., et LAFARGE V., 2001.- Implications of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialized countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 67 : 1-17.

Full Length Research Paper

# Diversity, phylogenetic relationship and antibacterial potential of *Bifidobacterium* species isolated from raw milk production chain in Abidjan (Côte d'Ivoire)

Sylvie Mireille Kouamé-Sina<sup>1,2\*</sup>, Adjéhi Dadié<sup>2</sup>, Kohei Makita<sup>4</sup>, Delia Grace<sup>4</sup>, Marcellin Dje<sup>2</sup>, Bernard Taminiau<sup>3</sup>, Georges Daube<sup>3</sup> and Bassirou Bonfoh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, 01 BP 1303 Abidjan 01. Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>Laboratory of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Food Sciences and Technology, University of Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup>Department of Food Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Boulevard de Colonster, 20 bât .B43b- 4000 Liege Belgium.

<sup>4</sup>International Livestock Research Institute ILRI, Nairobi, P. O. Box 30709 Nairobi, Kenya.

Accepted 31 May, 2011

The local dairy commodity, from farm to retail point, is informal and often escapes safety surveillance and results in high contamination of local milk by pathogens. The objective of this study was to determine the biodiversity of *Bifidobacterium* species in the informal dairy production chain in Abidjan and evaluate their potential antibacterial activity against pathogens. *Bifidobacterium* species were identified after sequencing of hsp60 genes. Results showed that *Bifidobacterium* were present in 9% of samples. Milkers' hands (14%) and cows's udders (14%) were the most contaminated with *Bifidobacterium*. These isolates belong to five different species. Most *Bifidobacterium* isolated are *Bifidobacterium minimum* (53%) and *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *Globosum* (24.4%). The other strains are composed of one strain of *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *suis* and *Bifidobacterium magnum*. The isolated *Bifidobacterium* species have antibacterial activities that are not related to bacteriocins production, but to organic acids production (65%), which exert *in vitro* inhibitory action against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella hadar* and *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O27 and *Escherichia coli* O157H7. However, ensuring milk safety along the local milk production chain requires implementation of good hygiene practices together with adapted technology, such as fermentation.

**Key words:** *Bifidobacterium*, antibacterial, milk, pathogens, Abidjan.

## INTRODUCTION

In Côte d'Ivoire, population growth and urbanization has lead to an increase in the demand for milk and milk products (FAO, 1998). The local dairy commodity chain, from farm to retail sites is informal and often escapes monitoring of quality. In addition, most stakeholders lack knowledge on hygiene and sanitary aspects of their production, which can result in poor production standards

and contamination of local raw milk by pathogens, causing diseases and food poisoning to consumers. In milk, the lactic acid bacteria (LAB) are a heterogeneous group of species with a common feature of lactic acid production. The most common genera that comprise these bacteria are *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus* and *Carnobacterium*. They are used in the dairy industry, baking, winemaking and processing of meat products. Indeed, LAB improves the organoleptic characteristics – texture and flavor of food through the production of various aromatic compounds, and also food safety via the

\*Corresponding author. E-mail: [kouamesylviemireille@yahoo.fr](mailto:kouamesylviemireille@yahoo.fr).  
Tel: 00 225 23 47 27 90, 00 225 01 50 46 43. Fax: 00 225 23 45 12 11.

production of bacteriocins (Piard and Desmazeaud, 1992) which inhibits the growth of pathogenic microorganisms such as *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and spoilage agents (Aymerich et al., 2000).

Among LAB, the genus *Bifidobacterium* is related to human and animal good health because it has probiotic abilities. It prevents constipation, improves lactose tolerance (Jiang et al., 1996), reduces risk of colon cancer and lower blood cholesterol levels (Molder, 1994) and improve immune response (Simone et al., 1992). In addition, Bifidobacteria are involved in the resorption of intestinal infections (Lee et al., 2003) by inhibiting the growth of many potential pathogens (Fooks et al., 1999; Henriksson and Conway, 2001; Sreekumar and Hosono, 1998) and restore intestinal microflora after an antibiotic treatment (Mitsuoka, 1990; Orrhage et al., 1994; O'Sullivan and Kullen, 1998). In addition, bifidobacteria produce bacteriocins as bifidin and bifidocine B (Yildirim and Johnson, 1998; Yildirim et al., 1999). The genus *Bifidobacterium* consists of gram-positive anaerobes with a variety of rod morphologies that appear to be among the most prevalent microflora in the gastro-intestinal tract (GIT) of humans and animals (Biavati et al., 2000; Scardovi, 1984). It has commonly been classified and identified based on phenotypic characteristics, 16SrDNA gene sequencing, some housekeeping proteins such as the 60 kDa heat-shock protein (HSP60) (Jian et al., 2001; Viale et al., 1994; Vaugien et al., 2002), elongation factor (Kamla et al., 1996) and DNA-DNA hybridation (Lauer and Kandler, 1983; Matsuki et al., 1998). These methods provide criteria for the systematic identification of *Bifidobacterium* species (Matsuki et al., 1998; Vaugien et al., 2002).

Due to their intestinal ecology, milk is not the natural environment of bifidobacteria. Their presence in milk is a sign of fecal contamination (Delcenserie et al., 2002) and can therefore serve as a marker of the level of hygiene in the production chain (Beerens et al., 2000). In addition, the species characterization and assessment of antibacterial potential could lead to determine in milk, a selection of food safety strains.

Data related to safety management of dairy production chain are scarce in Côte d'Ivoire. Furthermore, no study has been conducted on species of *Bifidobacterium* contaminating milk and their antibacterial abilities. Therefore, the objective of this study was to determine the diversity and phylogenetic relationship of *Bifidobacterium* species present in milk production chain in Abidjan (Côte d'Ivoire) and assess their potential to inhibit pathogenic bacteria.

## MATERIALS AND METHODS

### Milk production system

The main animal products from Ivorian livestock do not satisfy domestic consumption except for eggs. Côte d'Ivoire is an importer of meat and milk. This deficit leads to uncontrolled breeding of cattle for production of beef or dairy cattle (MIPARH, 2008). Dairy

farming is growing increasingly in peri-urban as well as in forest area around Abidjan for the supply of fresh milk. The cattle ranching, semi-sedentary or transhumant of informal dairy sector provides about 85% of national production (FAO, 2009). Animals used for dairy farms around Abidjan come from the park of slaughterhouse in Port-Bouet, which is the main entrance of animals mostly from the sub-region (Mali, Burkina Faso and Niger). That is why there are in Abidjan small livestock producers and milk. In all farms studied, milking was manual and done according to Fulani traditional. The cows's udders were not washed before milking and very few milkers washed their hands. Milk utensils were not properly washed either. The water used for milking and washing utensils came from a pond in 40% of farms (Kouamé-Sina et al., 2010). In more farms and their environment, there was presence of poultry farms, pig farms, dogs, birds, rodents, and waste disposal facilities.

### Study material and sampling

Data collection was conducted from October to December 2008 in three sites traditional dairy production of Abidjan: Port-Bouet, Lièvre rouge and Abobo. Samples were collected on the site of Port-Bouet (4 farms and 6 milk vendors), on the site of Lièvre rouge, (2 farms and in 2 milk vendors) and on the site of Abobo (7 milk vendors). In these informal dairy farms, the mean of cows number per farm was  $10 \pm 6.08$  (minimum: 5 cows; maximum: 20 cows) and milk quantity produces per milking was  $12.6 \pm 8.68$  L (minimum: 4 L; maximum: 25 L). The selling points are adjacent to farms and milk is sold at retail. These sites were selected based on the willingness of the actors (herdsmen, livestock owners and milk collectors and vendors) to participate in the study.

To know origin of milk contamination by bifidobacteria, raw milk samples were collected from milking to the selling point (raw milk taken from cow's udder, milk stored in tank after milking, milk on sale at selling point) and environmental samples (cow's udders, hands of milker). Sample size was calculated using the following formula:

$$N = P / (1 - P) / (E / 1.96)^2$$

where, N is minimum sample size; P is estimate expected prevalence; E, statistical risk = 5% (WHO, 1991).

According to Delcenserie et al. (2005), 95% of raw milk samples analyzed contained bifidobacteria. With this prevalence, the minimum size of the milk sample should be greater or equal to 70. Taking into account this number, a total of 189 samples were collected during milking in small dairy farms and retail point: 65 swabs of cow's udders and 14 swabs of milkers's hands before milking, 74 milk samples taken directly from cow's udder (individual cow's milk), 6 pool samples from the milk tank (raw milk from the farmer's containers) and 30 samples of raw milk at retail point (vendor's containers) close to farm's. The milk samples were constituted of 100 ml of raw milk. All samples were collected in sterile vials, labeled, stored at 4°C and analyzed within 2 h after sampling.

### Bifidobacteria isolation

Samples were diluted in buffered peptone water (Bio-Rad) containing 0.05% (w/v) cystein-HCl. Each dilution was analysed by Beerens (1998) culture-based methods modified by Delcenserie et al. (2005). One millimeter of dilution was transferred into 9 ml of enrichment medium BHMup (BHI, 37 g/L (oxid, England), 5 ml/L of propionic acid, 0.5g/l Fe-citrate, 0.5 g/l cystein chlorhydrate, 5 g/l yeast extract and 2 g/l agar). Mupirocin 80 mg/L (GSK, England)

**Table 1.** List of primers.

Primer	Sequence (5' to 3')	Specificity	Size of sequence (bp)
16S-f	AATAGCTCCTGGAAACGGGT	<i>Bifidobacterium 16S</i>	1050
16S-r	CGTAAGGGGCATGATGATCT	<i>Bifidobacterium 16S</i>	
P11-f	GTSCAYGARGGYCTSAAGAA	<i>Bifidobacterium hsp60</i>	217
P12-r	CCRTCCTGGCCRACCTGT	<i>Bifidobacterium hsp60</i>	

was added at the time the medium was used. The final pH 5.0 was obtained with the addition of 1 mol/L NaOH solution. Tubes were incubated for 48 h at 37°C with Jars with anaerobic conditions. From each enrichment culture, 0.1 ml was spread on isolation medium CMup (Columbia blood agar, 0.5 g/L Fe-citrate, 5 g/L glucose, 0.5 g/L cystein chlorhydrate). Mupirocin was added (50 mg/L) when the medium must be used. Plates were incubated at 37°C for 72 h with Jars with anaerobic conditions.

Colonies were examined by Gram staining and those showing morphological characteristics (Gram-positive) were cultured in MRS agar and incubated aerobically for 24 h to eliminate aerobes. The anaerobes isolates were tested for intracellular fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) production according to Scardovi (1986) method modified by Orban and Patterson (2000). Isolates were transported to University of Liege (Belgium), Faculty of Veterinary Medicine, Food Sciences Department, Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires (LMDA) for molecular analysis.

#### Molecular analysis

The method used to identify the bifidobacteria species includes three stages: The chromosomal DNA extraction, amplification and sequencing of specific amplified fragment. The resulting sequences were analyzed.

#### DNA extraction

Two milliliters of MRS broth culture of 18 h (oxid, France) were centrifuged for 2 min at 5000 g. The bacterial pellet was resuspended in 180 µl enzymatic lysis buffer containing lysozyme (20 mg/ml). DNA was isolated using DNeasy Blood and Tissue Handbook kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. DNA samples were quantified using the spectrophotometer and diluted with distilled water to obtain a concentration between 25 and 50 µg/ml.

#### PCR detection of *Bifidobacterium* genus

The anaerobic isolates with activity F6PPK were tested for the detection of hsp60 and 16S rDNA genes specific to *Bifidobacterium* genus. The primers used and the size of amplification products are contained in Table 1. The detection of *Bifidobacterium* genus was performed using the PCR procedure described by Delcensier et al. (2005) in 25 µl reaction volume containing 2 mM desoxynucleotide triphosphate (Eurogentec, Belgium), 5%(v/v) DMSO, 10X ThermoPol buffer (BioLabs, New England), 0.2 µM of each primer (Eurogentec, Belgium), 5 U of Taq DNA polymerase (BioLabs, new England) and 1 µl of DNA. Amplification was carried out using a DNA thermal cycler GeneAmp® PCR System 2700(AB Applied Biosystems) according to the following program, 95°C for 5 min, followed by 40 cycles (hsp60) or 35 cycles (16S rDNA) of 95°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 1 min 30 s, followed by a final

extension of 5 min at 72°C. The amplified 16S rRNA and hsp60 genes were loaded on a 2% (w/v) agarose gels for electrophoresis. Gels were stained with 1 mg/l ethidium bromide and photographed under 302 nm UV light.

#### Sequence analysis and phylogenetic tree construction

PCR products (hsp60) were purified using a wizard SV® gel and pcr clean-up system Kit according to the manufacturer's protocol (Promega, USA) and sequenced by DNA vision Agrifood (Belgium). Sequence data assembly and analysis was performed using the CodonCode Aligner software program (version 3.0.2). Assembled sequences were compared to those present in public databases using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequence data were aligned with the ClustalX package (Thompson et al., 1997) and compared with those hsp60 gene sequences listed in Table 2. A phylogenetic tree rooted with *Escherichia coli* was constructed using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). Bootstrap values were computed by resampling 1,000 (phylip, version 3.5). Tree from gene sequences was also drawn using the ClustalX program (National Center for Biotechnology Information) and were visualized with the TreeView program.

#### Evaluation of *Bifidobacterium* antibacterial activity

*Bifidobacterium* strains confirmed by PCR were screened for their ability to inhibit a variety of pathogens (Table 3). This research was conducted using two methods: Spot test and agar diffusion. The spot test was carried out according to the method of Bernet et al. (1993). 15 ml of MRS agar containing 2 g/L sodium bicarbonate were introduced into a sterile Petri plate. Then, the surface of agar was stained with 2 µl of an active culture of an overnight culture of bifidobacteria in MRS broth. Plates were dried for 30 min at room temperature (25°C) and incubated anaerobically at 37°C for 18 h. A 18h BHI (Brain Heart Infusion) broth of pathogenic strain (Table 3) was prepared. 1% (v/v) of BHI broth (final concentration ca 10<sup>6</sup> CFU/ml) was seeded into 10 ml of TSB (Trypticase soy Broth) containing 0.8% agar at 45°C and homogenized. The mixture was used to cover bifidobacteria MRS agar and incubated at 37°C for 18 h anaerobically to observe any inhibition zones. Bifidobacteria showing antagonistic activity against pathogens were then tested for the production of inhibitory substances into their culture medium using the agar diffusion method described by Tagg et al. (1976). A 18 h culture of bifidobacteria in MRS broth was centrifuged at 7000 g for 10 min. As lactic acid bacteria can produce inhibitory substances different from bacteriocins, it was necessary to eliminate the effect of organic acids. This was achieved by measuring the pH of the supernatant and adjusting it to pH 7.0 ± 0.1 with 1 mol/l NaOH and filtering with a filter Millex GP Millipore 0.22 µm (Carrigtwahill, USA). The neutralized supernatant was then tested by the agar diffusion method. 25 ml TSB containing 0.8% agar and 0.6% yeast extract at 45°C were seeded with 1% (v / v) overnight culture of pathogenic strain (final concentration ca 10<sup>6</sup> CFU/ml)

**Table 2.** List of reference strains and GenBank accession numbers used in this study.

Species	Strains n°	GenBank n°
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	JCM <sup>a</sup> 8230	AF240570
<i>Bifidobacterium breve</i>	JCM 1192	AF240566
<i>Bifidobacterium magnum</i>	JCM 1218	AF240569
<i>Bifidobacterium minimum</i>	JCM 5821	AY004284
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	JCM 1214	AY004278
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	JCM 7096	AF240568
<i>Bifidobacterium animalis</i>	JCM 1190	AY004273
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	JCM 1255	AY004280
<i>Bifidobacterium boum</i>	03 - 4 - 8	AY166562
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	JCM 7130	AY166565
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	JCM 1212	AY013247
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	JCM 1213	AY004283
<i>Bifidobacterium dentium</i>	JCM 1195	AF240572
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	JCM 6291	AY004279
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	JCM 8224	AF240575
<i>Bifidobacterium indicum</i>	JCM 1302	AF240574
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	bb52	AY004288
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	JCM 7139	AY166575
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	JCM 8219	AY004277
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	JCM 7040	AY166552
<i>B. pseudolongum</i>		AF240573
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	1 - 25 - 3	AY166545
<i>Bifidobacterium ruminatum</i>	JCM 8222	AF240571
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	JCM 1207	AF240567
<i>Bifidobacterium</i> sp. <i>GC61</i>		EF990664
<i>G. vaginalis</i>	ATCC <sup>b</sup> 14018	AY123673
<i>E. coli</i>	K-12	AE000487

<sup>a</sup>Japan Collection of Microorganisms (JCM). <sup>b</sup>American Type Culture Collection (ATCC).

**Table 3.** Pathogenic microorganisms tested.

Species	LMDA n <sup>ca</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	S0154
<i>L. monocytogenes</i>	S0580
<i>S. aureus</i>	S0155
<i>S. aureus</i>	S0156
<i>S. typhimurim</i>	S0157
<i>S. Hadar</i>	S0066
<i>E. coli</i> O157 :H7	S0231
<i>E. coli</i> O26	S0347

<sup>a</sup> LMDA: Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires, University of Liège, Belgium.

in BHI. The inoculated TSB was poured into a sterile Petri plate and dried at room temperature. Then, six wells (7 mm) were cut in the solidified agar with a sterile metal and filled with 80 µl of neutralized supernatant. The plates were left at 5° C for 2 h to allow diffusion of supernatant and incubated at 37°C for 18 h anaerobically. The antibacterial activity was determined by the presence of an inhibition zone greater than 3 mm.

### Statistical analysis

Database was generated with Epi Info version 3.5.1 and statistical analysis was performed with R version 2.11.1. Chi-square tests and Generalized Linear Model (GLM) with binomial errors were used to test relationships between variables (presence of bifidobacteria by type of sample, by sample site, by actors). The 95% confidence

**Table 4.** Distribution of *Bifidobacterium* strains to different levels of the production chain.

Type of sample	Total of sample (n)	<i>Bifidobacterium</i> positives	Prevalence of <i>Bifidobacterium</i> % [95% CI] <sup>a</sup>
Hand of milker	14	2	14.3 [2.5 - 43.8]
Cow's udder	65	9	13.8 [6.9 - 25.2]
Raw milk taken from cow's udder	74	4	5.4 [1.7 - 13.9]
Milk stored in tank	6	0	0.0 [0.0 - 4 8.3]
Milk on sale	30	2	6.7 [1.2 - 23.5]
Total	189	17	8.9 [5.5 - 14.2]

<sup>a</sup> [95% CI]: 95% confidence interval.

**Table 5.** Sites of isolation of bifidobacteria.

Site	Operators	The number of actors	<i>Bifidobacteria</i> detection site n (%)
Port-Bouët	Milk vendors	6	2 (33)
	Farms	4	2(50)
Lièvre rouge	Milk vendors	2	0 (00)
	Farms	2	2 (100)
Abobo	Milk vendors	7	0 (00)
Total		14	6 (42.9)

intervals were computed with the proportions test (Newcombe, 1998). Differences were considered to be significant for  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Diversity and distribution of *Bifidobacterium* species

Among the 189 samples analyzed, *Bifidobacterium* spp. was positive in 17 (8.9%). The analysis of 17 partial hsp60 gene sequences indicated that they all belong to five different species of *Bifidobacterium*. 9 strains are *Bifidobacterium minimum* (52.9%). In relation to the origin, 3 were isolated from raw milk taken from cow's udder, 3 others from cow's udder, 2 from milker's hands and one (1) from raw milk on sale point. Five others strains identified as *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (29.4%) were all isolated from cow's udders. One strain (5.88%) of each following species was identified as *B. thermophilum* isolated from raw milk on sale, *B. thermacidophilum* subsp. *suis* from cow's udder and *B. magnum* isolated from raw milk taken from cow's udder.

The hands of the milkers showed the highest level of contamination with *Bifidobacterium* (14.3%) (Table 4). However, there was no difference in the prevalence of *Bifidobacterium* by type of samples (by GLM,  $P = 0.3$ ) (Table 4).

*Bifidobacteria* were isolated in 100% of farms of Lièvre rouge but none (0%) of the vendors of this site (Table 5). In Port-Bouet, bifidobacteria were isolated from 50% of the farms. There was no significant interaction between the *Bifidobacterium* prevalence and the factors such as the sampling site and the actors (milkers, vendors) (Using multiple regression by model simplification in GLM with binomial errors,  $P = 0.065$ ).

The study site was not a significant factor affecting the prevalence of bifidobacteria in milk ( $P = 0.24$ ). The actors were found to be associated with the presence of *Bifidobacteria* in milk but the prevalence of bifidobacteria contaminated milk at retail selling point (vendors) (13.3%) was significantly lower than in farms (66.7%; SE = 1.15;  $P = 0.026$ ).

### Phylogenetic relationship

#### Sequence similarity in partial HSP60 genes

The GenBank accession numbers for the hsp 60 sequences obtained in this study are listed in Table 2. A phylogenetic analysis based on the partial hsp60 gene sequences of Abidjan strains plus GenBank strains of each recognized species and subspecies of the genus *Bifidobacterium* was performed. This analysis resulted in the phylogenetic tree developed in Figure 1.

For all the 17 different bifidobacteria strains from Abidjan, the partial hsp60 DNA sequences were conserved, with a similarity ranging from 89 to 100% (mean 97.24%). For the strains within the same species of *B. minimum*, the hsp60 sequence similarity ranged from 95 to 99% (mean 97.56%). Concerning the species of *B. pseudolongum*, the hsp60 sequences were highly conserved, the similarity ranged from 95 to 100% (mean 98.2%). The three strains *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum*, *B. magnum* showed similarities of 98, 97 and 89%, respectively.

### Phylogenic profile

Based on partial hsp60 gene, a phylogenetic tree including bifidobacteria of Abidjan as well as the species of reference *bifidobacterium* and *Gardnerella vaginalis* was constructed (Figure 1). This tree confirms the phylogenical identification of 17 isolates of Abidjan bifidobacteria. *Bifidobacterium* species were grouped into three different clusters. The cluster 1 contains several subclusters, three of which are formed by bifidobacteria isolated in Abidjan. *B. pseudolongum* subsp. *globosum* CI 53, CI 35, CI 42, CI 38, CI 31 formed one subcluster with *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (AY166545) and *B. pseudolongum* (AF240573). *B. minimum* CI 43, CI 16, CI 22, CI 36, CI 06, CI 34, CI 14, CI 46, and CI 21 form with *B. minimum* (AY004284) with another one. *B. thermophilum* CI 20 and *B. thermacidophilum* CI40 are part of the same subcluster with *B. thermophilum* (AF240567) and *B. boum* (AY166562). The cluster 2 contains *B. asteroides* (AF240570) and *B. indicum* (AF240574). *B. magnum* CI 13 and *G. vaginalis* (AY123673) form an independent cluster 3.

### Inhibition of pathogenic bacteria by bifidobacteria

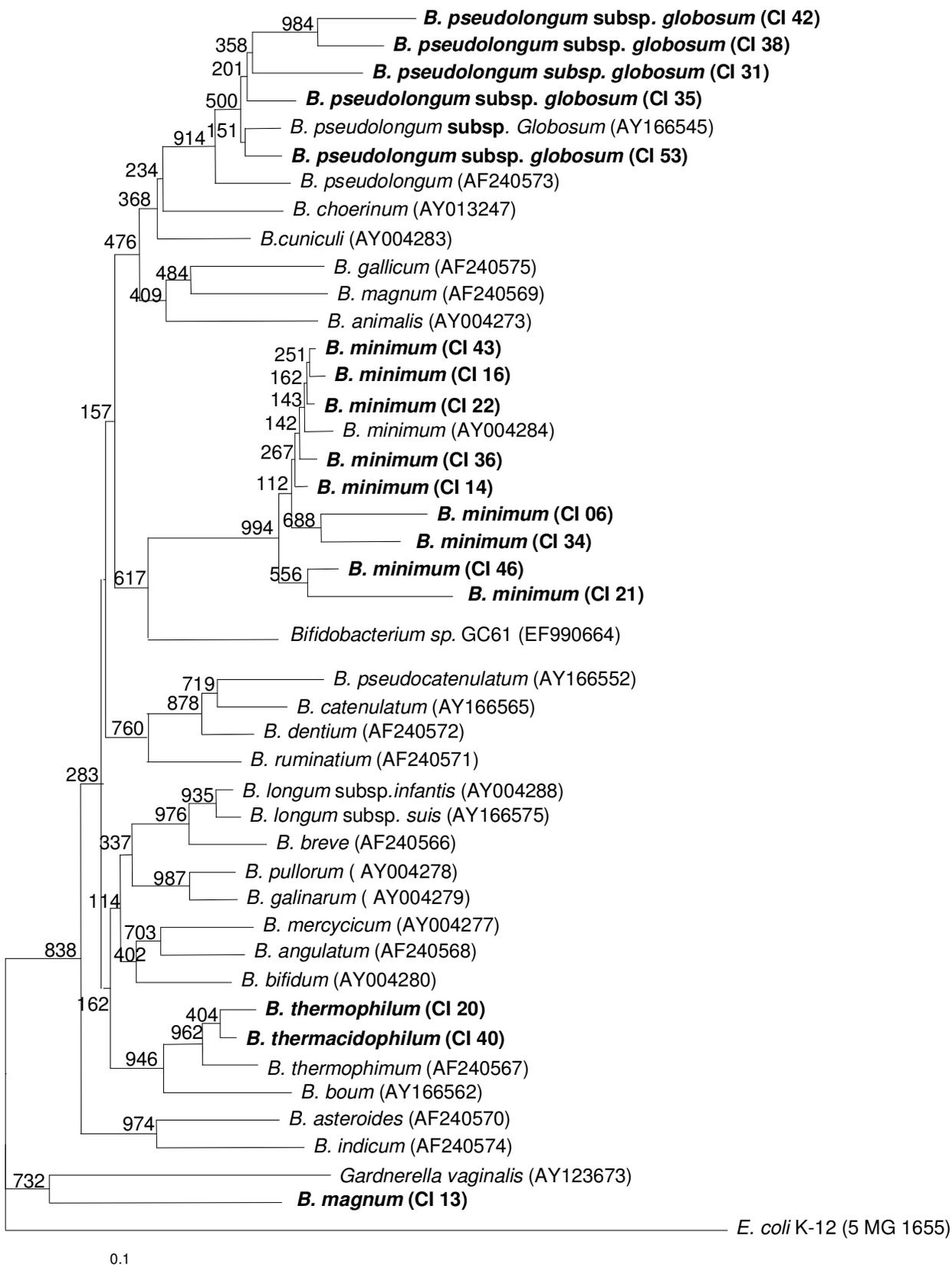
The evaluation of the antibacterial activity of bifidobacteria indicated that 11 out of 17 bifidobacteria strains (64.7%) showed an inhibition zone ranging from 8 to 35 mm in diameter (Table 6). The inhibition is related to the acidity of culture supernatant pH and was important at pH ranging from 3.7 to 4.3. Above a pH value of 4.42, no inhibition was detected. After neutralization of the culture supernatant of bifidobacteria and its application by agar diffusion method, no inhibition of pathogenic bacteria was detected. Bifidobacteria strains tested showed no inhibitory activity against pathogens, associated with bacteriocins production, but rather to organic acids.

### DISCUSSION

The sequencing of 16S rDNA genes, heat shock protein(hsp60) and elongation factors have been increasingly used for characterization and classification

of *Bifidobacterium* species (Kamla et al., 1996; Matsuki et al., 1998; Jian et al., 2001). The application of this method in the current study allowed identification and typing of *Bifidobacterium* isolated in the dairy chain production in Abidjan. The diversity of bifidobacteria strains was observed as belong to five different species: 9 strains of *B. minimum*, 5 strains of *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, one strain of *B. thermophilum*, one strain of *B. thermacidophilum* subsp. *suis* and one strain of *B. magnum*. *Bifidobacterium* species have been isolated from a number of environments such as sewage (Scardovi and Trovatielli, 1974), anaerobic digester (Dong et al., 2000) and fermented milk (Meile et al., 1997), but their major habitat is considered to be the intestine of human and animals (Scardovi and Zani, 1974; Lauer, 1990; Biavati and Mattarelli, 1991). *B. minimum* was the main specie isolated in the current study. This species is generally isolated from sewage (Delcenserie et al., 2002; Scardovi and Trovatielli, 1974). Three other strains were isolated from cow's udder milk and probably came from the cows's udder (3 strains) or from the un-washed milkers's hands (2 strains). These species occur in sewage so and are an indication of cross-contamination between milkers's hands, cows's udders, and the farm environment. This is supported by direct observations of sewage, sludge and waste in most farms vicinities. The milk contamination by Bifidobacteria is also an indicator of fecal contamination (Beerens et al., 2000) and is due to the lack of hygiene on farms. In the production system context, milk may contain pathogens (*S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus*, *Brucella*), antibiotic residues that are harmful to consumer's health (Bonfoh et al., 2002a, b, 2003b; Kouamé-Sina et al., 2010).

*B. thermophilum* was only isolated from raw milk at selling point. In previous studies, habitat of *B. thermophilum* was sewage and feces of animals such as pigs and poultry (Delcenserie et al., 2005; Ventura et al., 2007). Its presence in raw milk at selling point indicates poor hygiene practices along the milk production chain. Faecal contamination occurs between farms and selling points (Beerens, 1998; Delcenserie et al., 2002). *B. thermacidophilum* subsp. *suis* was isolated from cow's udder and probably come from fecal contamination. This specie was previously isolated from faeces of newborns and animal (Kheadr et al., 2007; Zhu et al., 2003). Animal housing did not allow a good physical separation of animals from different species (Kouamé-Sina et al., 2010). The cows stables were not protected and are accessible to dogs, birds and rodents. Thus cross contamination by faeces is possible, for example via contact with cow's udders with contaminated environment or via farmer's hands. The presence of *B. magnum* in milk from cow's udder is probably due to cross-contamination with different micro-ecological environments or animal faeces contaminating cow's udder and sent to raw milk during milking (Scardovi and Zani, 1974; Ventura et al., 2001).



**Figure 1.** Phylogenetic tree based on partial hsp 60 gene sequences. The tree was rooted with *E. coli* and constructed using a neighbor-joining algorithm. Bootstrap values of 1000 data sets, are given at each node. Numbers in parentheses correspond to the GenBank accession numbers. Strains of Côte d'Ivoire are written in bold. Bar, 0.1 sequence divergence.

**Table 6.** Pathogens inhibition of bifidobacteria isolated.

Bifidobac-teria of Côte d'Ivoire	pH of the culture supernatant in MRS	Diameter of inhibition (mm)							
		<i>Salmonella</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Escherichia</i>		<i>Listeria</i>	
		<i>hadar</i> (S066)	<i>typhimurim</i> (S0157)	<i>aureus</i> (S0156)	<i>aureus</i> (S0155)	<i>coli</i> O26 (S0347)	<i>coli</i> O157:H7 (S0231)	<i>monocytogenes</i> (S0580)	<i>monocytogenes</i> (S0154)
CI <sup>a</sup> 6	3.75	35	27	28	30	22	12	20	23
CI 16	3.76	23	28	23	28	20	30	20	23
CI 22	3.76	30	30	24	24	22	24	33	25
CI 21	3.77	21	26	22	25	22	30	20	29
CI 40	3.77	17	22	18	32	20	26	21	23
CI 42	3.77	22	27	16	32	20	22	28	23
CI 14	3.81	20	20	22	30	22	28	28	23
CI 34	3.86	21	26	19	28	21	23	25	20
CI 13	4.09	25	30	22	31	26	25	20	22
CI 31	4.11	22	20	14	30	29	12	20	26
CI 36	4.33	16	8	8	19	16	9	20	18
CI 46	4.42	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 43	4.43	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 35	4.55	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 20	4.64	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 38	4.78	0	0	0	0	0	0	0	0
CI 53	4.90	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> CI : Laboratory numbers of Bifidobacteria strains of Côte d'Ivoire.

*B. pseudolongum* subsp. *globosum* was only isolated on cow's udders. It is a bacteria found in sewage, bovine rumen, feces of pigs and rabbit (Gavini and Beerens, 1999; Marounek et al., 1998; Mitsuoka, 1969; Slovakora et al., 2002; Viale et al., 1994). Its presence on cow's udder reflects environmental contamination with feces of other animals living on farms or in the vicinity. Our results indicated no significant variation in the prevalence of *Bifidobacterium* along the dairy production chain. Contamination by *Bifidobacterium* was present at all stages of milk production. It was high on milkers's hands (poor

hygiene), decreased at milking (cow's udder milk, milk stored in tank) before slightly increasing in milk at selling points. These results indicate fecal contamination at all stages of the production chain, from production to selling point of raw milk. This suggests a lack of sanitary education of farmers and milk vendors. This sanitary education of farmers is important especially on good hygiene practices through simple actions like washing and disinfecting of hands, cow's udders and milking utensils (Bonfoh et al., 2003a, 2006).

The results of phylogenic identification of strains in the current study, show similarities of partial

hsp60 DNA sequences obtained in this study are similar with those obtained by Jian et al. (2001) and Zhu et al. (2003) on interspecies and intraspecies relationships of bifidobacteria. According to Zhu et al. (2003), the level of bifidobacteria partial hsp60 DNA sequence is 80 to 96% at the interspecies level, 96.5 to 100% for intraspecies and 95.5 to 97% between subspecies. Concerning the phylogenetic analysis based on tree constructed with *G. vaginalis* and rooted with *E. coli*, three (3) clusters were formed as in the study of Jian et al. (2001), 2 small clusters and one large cluster containing the

majority of species (40 of 44). Moreover *B. magnum* CI 13 and *G. vaginalis* (AY123673) form an independent group. *Bifidobacterium* species isolated from dairy production chain in Abidjan had the same phylogenetic clusters as those isolated in other countries.

Analysis of antibacterial activity showed that *Bifidobacteria* species inhibited the growth of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella hadar* and *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O27, *E. coli* O157H7 and *S. aureus* in culture. The *Bifidobacteria* tested, did not produce bacteriocin, but organic acids that inhibit pathogenic bacteria. *Bifidobacterium* species isolated are species of animal origin which have no antibacterial activity. They differ from the strains of human origin such as *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, which showed antagonistic properties against *E. coli*, *Klebsiella ozaenae*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *G. vaginalis* (Korshunov et al., 1999; Touré et al., 2003; Henriksson and Conway, 2001). The fermentation of milk containing *Bifidobacterium* species in such conditions could together with other LAB permit the reduction of number of pathogenic bacteria by organic acids produced during the fermentation. Consumption of fermented milk has antibacterial effects on enteropathogens and reduces the number of diarrhea episodes in children because of lactic acid bacteria present (Mensah, 1997; Guerin-Danan et al., 1998). We suggest the awareness on good hygiene practices and the fermentation of heat-treated milk when ever it is possible for the stakeholders in the dairy commodity

## Conclusion

*Bifidobacterium* has been isolated for the first time from milk and typed in Côte d'Ivoire. The hygienic quality of local raw milk was assessed as poor, based on the detection of the *Bifidobacterium* in raw milk. The *Bifidobacterium* species isolated in this study did not produce any bacteriocin to inhibit the growth of pathogenic microorganisms; they only produced lactic acid. In order to improve the microbiological quality of local raw milk, fermentation as well as heating is needed to inhibit the growth of contamination germs. Therefore the *Bifidobacterium* isolated in this study, cannot solve the problem of poor hygienic quality of the locally produced milk. They are rather an indication of poor hygiene. The safety strategy should be developed, with good hygiene practices related to cleanliness of animals and their environment as well as sanitation of the milking process (milker's hands, milking utensils).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the International Foundation for Science (IFS) (ref: E/4488-1), by the Agence Universitaire de la Francophonie

(AUF), by International Livestock Research Institute ILRI / BMZ, the Laboratoire de Microbiologie des Denrées Alimentaires (LMDA), University of Liege and the Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS) and the consortium Afrique One. We would like to thank the livestock producers and vendors of milk who participated in the study and Dr. Solenne Costard for her support in the preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Aymerich MT, Garriga M, Monfort JM, Nes I, Hugas M (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiol.*, 17(1): 33- 45.
- Beerens H (1998). *Bifidobacteria* as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *Inter. J. Food Microbiol.*, 40: 203-207
- Beerens H, Hass Brac de la Perriere B, Gavini F (2000). Evaluation of the hygienic quality of raw milk based on the presence of bifidobacteria: the cow as a source of faecal contamination. *Inter. J. Food Microbiol.*, 54: 163- 169.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser A, Servin L (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen–cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4121- 4124.
- Biavati B, Mattarelli P, (1991). *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 163-168.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V (2000). *Bifidobacteria*: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*, 50: 117- 131.
- Bonfoh B, Fané A, Traoré NA, Coulibaly Z, Simbé CF, Alfaroukh OI, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J (2002a). Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le District de Bamako au Mali. *Bioterre, Rev. Inter. Sc. de la Vie et de la Terre, Special Issue: 242 - 250.*
- Bonfoh B, Fané A, Traoré AP, Tounkara K, Simbé CF, Alfaroukh OI, Schalch L, Farah Z, Nicolet J, Zinsstag J (2002b). Use of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in fermented cow milk. *Milk Sc. Inter.*, 57(7): 361- 420.
- Bonfoh B, Wasem A, Traoré AN, Fané A, Spillmann H, Simbé CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J (2003a). Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14: 495- 500.
- Bonfoh B, Dem S, Keita O, Delorenzi S, Traoré H, Simbé CF, Alfaroukh IO, Farah Z, Nicolet J, Zinsstag, J (2003b). Assessment of antibiotic residues by microbial inhibitor tests in fresh cow milk sold in Bamako (Mali). *Milk Sc. Inter.*, 58: 304- 307.
- Bonfoh B, Roth C, Traore AN, Fané A, Simbe CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J (2006). Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food Control*, 17: 153- 161.
- Delcenserie V, Bechoux N, China B, Daube G, Gavini F (2005). A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture based methods. *J. Microbiol. Methods*, 61: 55- 67.
- Delcenserie V, China B, Gavini F, Beerens H, Daube G (2002). Proposition d'un nouveau standard indicateur de contamination d'origine fécal dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Med. Vét.*, 146: 279- 293.
- Dong X, Xin Y, JianW, Liu X, Ling D (2000). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 119-125.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *FAO Collection: Alimentation et nutrition*, number 28, ISBN 92-5-20534-6.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009). State plant genetic resources for food and agriculture. *Second National*

- Report, FAO-views, October 2009.
- Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR (1999). Probiotic, probiotic and human gut microbiology. *Inter. Dairy J.*, 9: 53- 61.
- Guerin-Danan C, Andrieux C (1998). Nutritional and health benefits of fermented milks in young infants. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 33(6): 384- 389.
- Gavini F, Beerens H (1999). Origin and identification of bifidobacteria strains isolated from meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 46: 81- 85.
- Henriksson A, Conway PL (2001). Isolation of human faecal bifidobacteria which reduce signs of *Salmonella* infection when orogastrically dosed to mice. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 223- 228.
- Jian W, Zhu L, Dong X (2001). New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1633- 1638.
- Jiang T, Mustapha A, Savaiano DA (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sc.*, 79: 750- 757.
- Kamla V, Henrich B, Hadding U (1996). Phylogeny based on elongation factor to reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16SrRNA. *Gene*, 171: 83-87.
- Kheadr E, Dabour N, Von AH U, Lacroix C, Meile L, Fliss I (2007). Genetic and phenotypical diversity of *Bifidobacterium thermacidophilum* fecal isolates from newborns. *Can. J. Microbiol.*, 53: 1348-1359.
- Korshunov VM, Urtaeva ZA, Smeianov VV, Efimov BA, Sarkisov SE, Krymshokalova ZA, Bainov NA, Pikina AP, Korshunova OV (1999). The antagonistic activity of bifidobacteria *in vitro* and *in vivo* studied by using gnotobiological technology. *Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 5: 72- 77.
- Kouamé-Sina SM, Bassa A, Dadié A, Makita K, Grace D, Dje M, Bonfoh B (2010). Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire). *RASPA*, 8(S): 35-42.
- Lauer E (1990). *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 100- 102.
- Lauer E, Kandler O (1983). DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 4: 42- 64.
- Lee YJ, Yu W-K, Heo TR (2003). Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from health infant faeces. *Inter. J. Antimicrobial Agents*, 21: 340- 346.
- Marounek M, Rada V, Benda V (1998). Biochemical characteristics and fermentation of glucose and starch by rabbit caecal strains of *Bifidobacterium globosum*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 43: 113-116.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H (1998). Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species and group-specific primers, *FEMS Microbiol. Lett.*, 167: 113-121.
- Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasen G, Wenger S, Teuber M (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20: 57- 64.
- Mensah P (1997). Fermentation - the key to food safety assurance in Africa? *Food Control*, 8(5): 271- 278.
- MIPARH- Ministry of animal production and fish resources of Côte d'Ivoire (2008). Estates general of livestock and meat sector. Guidance Note: 1-13.
- Mitsuoka T (1969). Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals, including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec. and *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec. *Infektionskrankhh. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A.*, 210(52): 64-85.
- Mitsuoka T (1990). Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indust. Microbiol.*, 6: 263-268.
- Molder HW (1994). Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. *Inter. Dairy J.*, 4: 383- 407.
- Newcombe RG (1998). Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods. *Stat. Med.*, 17: 857- 872.
- Orban JI, Patterson JA (2000). Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods*, 40: 221- 224.
- Orrhage K, Brismar B, Nord CE (1994). Effects of supplements of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microbial Ecol. Health Dis.*, 7: 17- 25.
- O'Sullivan DJ, Kullen MJ (1998). Tracking of probiotic bifidobacteria in the intestine. *Inter. Dairy J.*, 8: 513- 552.
- Piard JC, Desmazeaud MJ (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances, *Lait*, 72: 113-142.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406- 425.
- Scardovi V, Trovatelli LD (1974). *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 21- 28.
- Scardovi V (1984). Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen, 1924. In Krieg, NR & Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. The Williams and Wilkins, Baltimore, MD., pp. 1418-1434.
- Scardovi V (1986). Genus *Bifidobacterium*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md., pp. 1418-1434.
- Scardovi V, Zani G (1974). *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic bifidobacterium isolated from rabbit feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 29- 34.
- Simone CD, Ciardi A, Grassi A, Gardini SL, Tzantzoglou S, Trinchieri V, Moretti S, Jirillo E (1992). Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gutmucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 14: 333- 340.
- Slovakora L, Duskova D, Marounek M, (2002). Fermentation of pectin and glucose and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35: 126-130.
- Sreekumar O, Hosono A (1998). The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines. *Can. J. Microbiol.*, 44: 1029-1036.
- Tagg JR, Adjoin AS, Watchmaker LW (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 40: 722- 756.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4876 - 4882.
- Touré R, Kheadr E, Lacroix C, Morino O, Fliss I (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, 95: 1058-1069.
- Vaugien L, Prevots F, Roques C (2002). Bifidobacteria identification based on 16S rRNA and pyruvate kinase partial gene sequence analysis. *Anaerobe*, 8: 341- 344.
- Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R (2001). Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecology*, 36: 113-121.
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, Van Sinderen D (2007). From bacterial genome to functionality: case bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 2-12.
- Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC, Ferreyra RG (1994). Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 527-533.
- World Health Organization (1991). Manuel d'épidémiologie pour la gestion de la santé au niveau du district, Jouve (Eds.), p. 187.
- Yildirim Z, Johnson M (1998) Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food Prot.*, 6: 47- 51.
- Yildirim Z, Winters D, Johnson M (1999). Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 45- 54.
- Zhu L, Li W, Dong X (2003). Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. porcinum subsp. nov. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1619- 1623.

# Hazard identification and exposure assessment for bacterial risk assessment of informally marketed milk in Abidjan, Côte d'Ivoire

Sylvie Mireille Kouamé-Sina, Kohei Makita, Solenne Costard, Delia Grace, Adjehi Dadié, Marcellin Dje, and Bassirou Bonfoh

## Abstract

**Background.** Animal-source foods are important causes of food-borne illness, and milk and dairy products can contain pathogenic microorganisms.

**Objective.** We conducted a stochastic assessment of the risk of ingesting milk contaminated with specific microbial pathogens (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus spp.*) in Abidjan, Côte d'Ivoire.

**Methods.** We carried out structured interviews and focus group discussions with farmers ( $n = 15$ ), vendors ( $n = 17$ ), and consumers ( $n = 188$ ) to characterize dairy production systems and milk consumption behavior. Microbiological sampling was conducted at different points between milking and sale. A risk model was developed, and the risk of consuming contaminated raw milk was estimated by Monte Carlo simulation.

**Results.** The investigation into local raw milk consumption patterns showed that the proportion of raw milk consumption was 51.6% in people who consume milk. The probability of ingestion of marketed raw milk that failed to meet standards for this group of bacteria was 29.9% and about 652 consumers per day were estimated to ingest contaminated milk. Microbiological tests from the farm showed that 7.2% of samples taken from milkers' hands, 4.4% of water samples (water used to

rinse milk containers or milking utensils (calabash, plastic bottle, filters, buckets), 4.4% of environmental samples (air pollution), 13.2% of samples from milking utensils, and 4.9% of samples from cows' udders were contaminated with one or more of these pathogens. About 624.6 L of marketed raw milk would need to be discarded per day if discarding milk was chosen as the option of risk reduction. The destruction of this milk would result in a potential loss of €623.9 per day for all producers.

**Conclusions.** The risk of human illness from consumption of raw milk could be mitigated by raising awareness about heat treatment of milk and good hygiene practices in the dairy chain.

**Key words:** Abidjan, Côte d'Ivoire, hygiene practices, milk quality, raw milk, risk assessment

## Introduction

Food-borne disease is an important and growing public health and economic problem in many countries. Although billions of people suffer from food-borne illness yearly, it is difficult to obtain accurate estimates of the incidence of food-borne disease, especially in developing countries such as Côte d'Ivoire [1, 2]. In Côte d'Ivoire, people with gastrointestinal symptoms (diarrhea, vomiting, stomach cramps, fever) rarely go to the hospital, because they lack medical coverage; therefore, the rate of food poisoning is underreported. The pathogenic microorganisms most frequently consumed in food are *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, and *Escherichia coli* [3–7].

Animal-source foods are important causes of food-borne illness. Milk and other dairy products from cows, sheep, and goats can contain pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., and *Staphylococcus aureus* [8, 9]. In much of Africa, dairy production is in the informal smallholder sector, using traditional practices. Unhygienic hand milking by producers as well as

---

Sylvie Mireille Kouamé-Sina, Adjehi Dadié, and Marcellin Dje are affiliated with the Nanguy Abrogoua University, Abidjan, Côte d'Ivoire; Sylvie Mireille Kouamé-Sina and Bassirou Bonfoh are affiliated with the Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, Abidjan; Kohei Makita and Delia Grace are affiliated with the International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya; Solenne Costard is affiliated with the Royal Veterinary College, London, United Kingdom and her correspondence address is at EpiX Analytics, Colorado, USA; Kohei Makita is affiliated with the School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan.

Please direct queries to the corresponding author: Sylvie Mireille Kouamé-Sina, Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS), Km 17 route de Dabou, 01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire; e-mail: kouamesylviemireille@yahoo.fr.

transportation and sales under hot ambient temperatures are likely to lead to milk of poor hygiene being sold. This is the case in neighboring countries of Côte d'Ivoire, where microorganisms (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Enterococcus*) contaminate the dairy chain. Indeed, in Burkina Faso [10–12], Mali [13, 14], and Ghana [15], the milk is of poor hygienic quality all along the production chain from farm to market. The risk to human health is increased if milk is consumed without heat treatment or other processing capable of reducing microbial contamination. However, despite the known association of raw milk with infectious diseases [16], some consumers may prefer raw milk [17]. Preference for consuming raw milk could increase the risk of zoonoses from milk.

In developing countries, milk is an important source of nutrition, and the production and sale of milk support the livelihoods of many poor people. It is important to assess the health risks associated with milk to inform appropriate management to reduce the burden of disease without compromising the availability of nutritious foods, the livelihoods of milk producers, or economic development. Quantitative risk assessment is a rigorous and credible method for establishing health risk. There are several published quantitative risk assessments for dairy products [18–21], but the method has not been widely applied in developing countries. We report a risk assessment carried out to answer the following question: What is the risk of ingestion of raw milk contaminated by a group of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, and *Enterococcus* spp.) for consumers in Abidjan, Côte d'Ivoire?

## Materials and methods

### Study area

This study was conducted from October 2008 to September 2010 in six municipalities in urban and periurban areas of Abidjan: Port-Bouet, Abobo, Yopougon, Cocody, Bingerville, and Songon. Ethical approval for the study was obtained from the Scientific Council of the Centre Suisse de Recherches Scientifiques in Côte d'Ivoire. The sites were selected based on the willingness of the participants in the study (herdsmen, livestock owners, and milk collectors and vendors).

### Production and marketing chain and bacterial contamination

Budgetary constraints precluded investigation of more than a few hazards, and we selected pathogens on the basis of their likely importance. In previous studies, *S. aureus*, *E. coli*, and *Enterococcus* spp. were isolated from raw milk and milk products [9, 22] and could cause infections and intoxications in consumers [23, 24].

These microbes may gain entry into raw milk directly from dairy cows with subclinical or clinical mastitis, from the farm environment, from the supply of water used for washing hands, milk utensils or containers, or from the utensils used for milking, or as a result of insanitary and unhygienic conditions of production and handling on the farm or during transportation [9, 25]. They are capable of rapid multiplication when exposed to high ambient temperatures, such as occur in the chain of traditional milk production and marketing in Abidjan.

### Sampling and bacterial enumeration

Raw cow milk samples were collected from 15 informal dairy farms and 17 milk vendors on five sites after consent had been obtained from the farmers and vendors. In the municipality of Abobo, the sites of Abobo Derrière les rails (nine vendors) and N'dotrè (eight farms) were selected. In the municipalities of Port-Bouet, Yopougon, and Songon, the sites of Abattoir (four farms, six vendors), Lièvre Rouge (two farms, two vendors), and Songon-Té (one farm) were selected. To determine the origin of bacterial contamination of cow's milk, we sampled along the risk pathway from farm to consumption. Before milking, samples were taken of water used for milking ( $n = 15$ ), water used for rinsing utensils ( $n = 15$ ), swabs of cows' udders ( $n = 113$ ), and swabs of milkers' hands ( $n = 20$ ). During milking, a vial containing sterile water was exposed for 15 minutes to assess environmental pollution ( $n = 15$ ) and milk taken from the udders ( $n = 118$ ). After milking, samples were taken from milk storage containers at the farm ( $n = 15$ ) and retail sales points close to the farms ( $n = 17$ ). The volume of the milk samples collected was 100 mL; all samples were collected in sterile vials, labeled, stored at 4°C, and analyzed within 2 hours after sampling.

Decimal dilutions (1:10) of all samples were made in buffered peptone water (BioRad), and in all cases, duplicate counting plates were prepared of appropriate dilutions. To enumerate *E. coli* (AFNOR NF V 08-017), 1 mL of appropriate dilution ( $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ) was plated into a sterile Petri dish; 15 mL of Rapid *E. coli* 2 agar was rapidly poured into this dish, and incubated at 44°C for 21 hours. Eosin methylene blue (EMB) agar that give pink to violet colonies and API 20E were used to confirm colonies as *E. coli*.

To count *S. aureus* (AFNOR NF V 08-057), 0.2 mL of appropriate dilution ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ) was plated on Baird-Parker agar (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 hours. Typical black to grayish colonies surrounded by clear zones were selected and tested for the presence of coagulase and DNase.

To enumerate enterococci (NF I90-461), 0.1 mL of dilution ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ) was plated on Slanetz and Bartley agar and incubated at 36°C for 44 hours. All red or brown colonies were counted as presumptive

enterococci. The typical colonies were transferred to Bile Esculin Azide Agar (BEA), and the plates were incubated at  $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . On this medium, enterococci produce colonies surrounded by a black halo after 24 hours of incubation. A test for catalase activity was also performed and should give a negative result [26]. These enumerations were performed in all samples according to the published methods of the Manuel Suisse des Denrées Alimentaires [27] and the International Dairy Federation [28]. Regulation 2073/2005/EC [29] was used to determine whether the bacterial load in the milk was acceptable or not.

#### Marketing chain and consumption practices

Questionnaire surveys were conducted with farmers and milk vendors in all informal milk markets in Abidjan (see list in **table 3**). For milk vendors, the questions included the source of the milk, the average amount of milk sold per day, boiling practices, the mode of milk transportation, and destination of milk (retail sales). This analysis of the milk chain value and practices helped to determine farm management practices and the risks associated with actors' behaviors and system of local milk production. A dairy value chain model was developed synthesizing the data from the farm survey and the milk vendors' survey. The value chain model consisted of the amount of milk produced in farms per day in both urban and periurban areas and sold in informal markets. A survey was conducted of 188 customers at different sale points to investigate patterns of consumption of local milk using a structured questionnaire.

#### Data analysis

The data were digitized with EpiInfo, version 3.5.1, and analyzed with software R, version 2.11.1. For quantitative variables, the frequencies and the average, standard deviation, and minimum and maximum values were calculated. Descriptive statistics were calculated for all variables [30]. Confidence intervals (90%) were calculated for proportions [31].

#### Risk assessment

A risk assessment of the health impacts of consumption of local raw milk in Abidjan was performed, following the first two steps of the Codex Alimentarius nomenclature [32]: hazard identification and exposure assessment. The risk assessment was not carried to completion because information on the dose effect was lacking.

#### Hazard identification

Unpasteurized cow's milk (raw milk) has been associated with many serious diseases. Bacteria can contaminate raw milk and cause food-borne diseases [33]. In this study, we identified *S. aureus*, *E. coli*, and

*Enterococcus* spp. as hazards of concern because they cause food-borne infections in Côte d'Ivoire [6, 34, 35]. These bacteria can cause serious health problems, such as fever, vomiting, diarrhea, kidney failure, and even death. Children, pregnant women, elderly people, and people with impaired immune systems are particularly at risk. In our study, hazard consists of bacterial contaminants of milk, and risk describes the probability of consumption of contaminated raw milk.

#### Exposure assessment

Exposure assessment estimates how likely an individual is to be exposed to a microbial hazard and what numbers of the microorganism are likely to be ingested. In the present study, the probability of ingestion of pathogens from local raw milk was estimated using parameters such as the concentration of pathogens in contaminated milk ( $C_p$ ), the quantity of raw milk contaminated daily ( $Q_c$ ), the proportion of raw milk consumption ( $P_{rmc}$ ) in people who consume milk, the number of daily raw milk consumers in Abidjan ( $N_A$ ), the total quantity of daily raw milk sales in informal markets in urban and periurban Abidjan ( $Q_{dm}$ ), and the probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_i$ ) (**table 1**).

The probability of ingestion of contaminated raw milk ( $P_i$ ) in people who consume milk, was determined as the product of the proportion of the Abidjan population consuming raw milk (not boiled) ( $P_{rmc}$ ) and the prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{>N}$ ) (**table 1**). The average daily number of consumers ingesting contaminated milk in Abidjan was calculated by dividing the total quantity of daily raw milk sales in informal markets ( $Q_{dm}$ ) by the average quantity of milk consumed. The average daily quantity (in liters) of raw milk sales not meeting standards of microbiological quality was estimated as the product of the prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{>N}$ ) (Regulation 2073/2005/EC) and the total quantity of daily raw milk sales in informal markets ( $Q_{dm}$ ).

The Monte Carlo simulation was run for 5,000 iterations using the statistical software Model Risk 3.0 (Vose Software). The values of parameters were estimated based on the results from fieldwork described below.

#### Risk mitigation scenarios

Risk mitigation simulations were run to determine the updated probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{ij}$ ) after implementation of control measures. Two scenarios were simulated (**table 2**): implementation of a control option to decrease the prevalence of contaminated milk marketed by discarding milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{>N}$ ) at farms or sale points; and implementation of an awareness campaign on

TABLE 1. Description and distribution of variables and models for risk assessment

Variable	Parameter	Distribution/model
$N_A$	Number of daily raw milk consumers in Abidjan	$Q_{dm}$ /average quantity of milk consumed
$Q_c$	Quantity of raw milk contaminated daily in Abidjan	$Q_{dm} * P_p$
$P_{E.coli}$	Probability that marketed milk is contaminated with <i>E. coli</i>	Beta (12 + 1, 17 - 12 + 1) (marketed milk analysis)
$P_{S.aureus}$	Probability that marketed milk is contaminated with <i>S. aureus</i>	Beta (3 + 1, 17 - 3 + 1) (marketed milk analysis)
$P_E$	Probability that marketed milk is contaminated with <i>Enterococcus</i>	Beta (10 + 1, 17 - 10 + 1) (marketed milk analysis)
$P_p$	Probability that marketed milk is contaminated with pathogens	Beta (13 + 1, 17 - 13 + 1) (marketed milk analysis)
$C_p$	Concentration of pathogens in milk	Discrete uniform (data)
$P_{rmc}$	Proportion of raw milk consumption (milk not boiled) in people who consume milk	Beta (97 + 1, 188 - 97 + 1) (consumption surveys analysis)
$P_{>N}$	Prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality	Beta (10 + 1, 17 - 10 + 1) (marketed milk analysis)
$P_i$	Probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality	$P_i = P_{rmc} * P_{>N}$

TABLE 2. Parameters of risk mitigation by simulations

Variable	Description	Distribution/model					
		Control option			Awareness campaigns		
$P_i$	Probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality (observed probability)	—	—	—	—	—	—
$P_{>N}$	Prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality	5%	10%	20%	—	—	—
$P_{rmc}$	Proportion of raw milk consumption in people who consume milk	—	—	—	10%	20%	30%
$P_{if}$	Future probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality (predicted probability after 5,000 iterations)	$P_{rmc} * 0.05$	$P_{rmc} * 0.1$	$P_{rmc} * 0.2$	$P_{>N} * 0.1$	$P_{>N} * 0.2$	$P_{>N} * 0.3$
$R_r$	Reduction in rate of risk	$P_i - P_{if}$					

milk boiling to decrease the proportion of the Abidjan population consuming raw milk ( $P_{rmc}$ ) in people who consume milk.

The reduction of the risk of ingestion of contaminated milk was calculated by subtracting the probability of ingestion of raw milk contaminated after implementation of the control option or awareness campaigns ( $P_{if}$ ) from the probability of ingestion of contaminated milk ( $P_i$ ) in the absence of control or awareness measures. Scenarios were simulated with 5,000 iterations of Monte Carlo simulation in Model Risk.

## Results

### Description of the informal production chain for milk

Apart from milk consumed on the farm, all of the milk produced (periurban and urban) was transported for sale in the informal markets of Abidjan. The investigation of all informal milk markets in Abidjan estimated the total quantity of daily raw milk sales at about 1,090 L (table 3). The milk distributed to urban consumers was more often sourced from urban areas (58.2%) than from periurban areas (41.8%). Milk produced in urban and periurban areas was sold to collectors and also was partly consumed on farms (fig. 1). The collectors either sold milk to sellers in informal

markets or sold milk themselves. Various modes of milk sales were observed: by traders with milk cans on a bicycle, by mobile street vendors, and by roadside vendors. None of the milk sold was refrigerated.

**Milk consumption patterns**

The investigation into local milk consumption patterns showed that the proportion of milk consumed raw (not boiled) ( $P_{rmc}$ ) in people who consume milk, after purchase was 51.6% (90% CI, 45.7% to 57.4%) (table 4). Among survey participants, 28% consumed milk on a daily basis, and the average quantity of milk consumed was 0.5 L/person/day (table 4). Several household consumption patterns were observed: in 58.0% of households, the whole family consumed milk; in 10.6% only young people (16–30 years) consumed milk; in 4.3%, only children (0–15 years) consumed milk; and 25.0% of respondents consumed milk on their own. Based on the average consumption and the estimation of total milk consumption, the number ( $N_A$ ) of daily consumers in Abidjan per day is estimated at 2,180.

**Risk assessment**

**Fault tree of events leading to gastroenteritis after milk consumption**

Figure 2 shows the sequence of events occurring from the farm to the consumer that could result in gastroenteritis following consumption of local milk. The microorganisms tested in this study (*E. coli*, *S. aureus*, and *Enterococcus*) can be introduced into milk

TABLE 3. Estimated quantity of milk available every day in all informal markets in Abidjan

Municipality	Production area	Informal market site	Quantity (L/day)
Port-Bouet	Abattoir	Abattoir	413
	Adjouffou	Adjouffou	
	Bendekosso	Bendekosso Koumassi	
Yopougon	Azito	Azito	390
	Béago	Béago	
	Lièvre Rouge	Lièvre Rouge	
Songon	Songon-Té	Yopougon	37
		Adjamé	
		Treichville	
Abobo	Abobo Baoulé	Abobo Baoulé	230
	Derrière les rails	Derrière les rails	
	Entrée d'Abobo	Entrée d'Abobo	
	N'dotré	N'dotré	
Bingerville	Bingerville	Cocody-Riviera II	20
Total			1,090

by several routes. We found one or more of these species of bacteria in 6.4% of samples of milk taken from the udder, 7.2% of samples taken from milkers' hands, 4.4% of water samples, 4.4% of samples from the environment, 13.2% of samples from milking utensils, and 4.9% of samples from cows' udders. In all of these cases, contamination of the milk occurred at the farm. Pathogens can be also introduced at later stages, e.g., as a result of mixing of milk from different farms or from

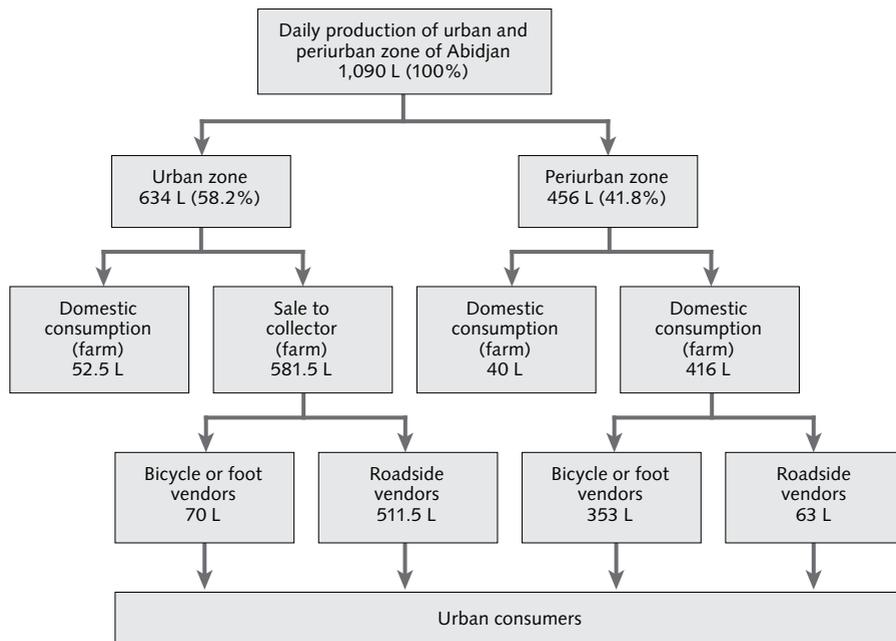


FIG.1. Diagram showing milk value chain in urban and periurban areas of Abidjan

TABLE 4. Consumption patterns of raw milk

Variable	Characteristic	Frequency (%)
Frequency of purchase of milk	Once a day	53 (28.2)
	Weekly	26 (13.8)
	2 or 3 to 4 times/week	94 (50.0)
	Every 2 weeks or more	15 (8.0)
Quantity of milk consumed per person per day (L)	0.1–0.5	152 (80.9)
	0.6–1	22 (11.7)
	> 1–2	14 (7.4)
	Average 0.5	
Consumption mode	Direct	175 (93.0)
	Fermented milk	3 (1.6)
	Mixed with other foods (rice, millet, maize)	10 (5.3)
Treatment of milk before consumption	No treatment	97 (51.6)
	Boiled	91 (48.4)
Household members who consume purchased milk	Only 1 person	47 (25.0)
	Children (0–15 years)	8 (4.3)
	Young people (16–30 years)	20 (10.6)
	Elderly (60 years and over)	3 (1.6)
	Whole family	110 (58.5)

contact with the hands of milk collectors or vendors or with milk containers. The absence of refrigeration or heat treatment would allow bacterial growth, which, however, would be reduced by natural fermentation. Before consuming the milk, 48.4% of consumers boiled it, which reduces the risk of contamination. For the 51.6% of consumers who did not boil milk, the risk of gastroenteritis is assumed to be proportional to the bacterial load and the susceptibility of the consumer.

#### Hazard identification

Analysis of the milk samples showed the presence of one or more of the three pathogens (*E. coli*, *S. aureus*, and *Enterococcus*) in 76.5% of milk samples (observed prevalence). The prevalence rates of *E. coli*, *S. aureus*, and *Enterococcus* in marketed milk were 70.5%, 17.6%, and 58.8%, respectively (table 5). After simulations, the probability that marketed milk is contaminated with at least one of these bacteria was 73.7% (90% CI, 56.1% to 88.3%) (fig. 3). The specific probabilities of contamination with *E. coli*, *S. aureus*, and *Enterococcus* were 68.4% (90% CI, 50.2% to 84.4%), 21.5% (90% CI, 8.0% to 37.7%), and 57.9% (90% CI, 39.2% to 75.6%) (table 6). The average bacterial load of marketed raw milk was 103,214 cfu/mL.

#### Exposure assessment

The prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{>N}$ ) was 58.1% (90% CI, 44.0% to 75.8%). The probability of ingestion of marketed raw milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_i$ ) for this group of pathogens (*E. coli*, *S. aureus*, and *Enterococcus*) was 29.9% (90% CI, 20.1% to 39.5%) (table 6). Taking into

account this probability ( $P_i$ ) and the number of daily raw milk consumers in Abidjan ( $N_A$ ), an estimated 652 (90% CI, 458 to 881) consumers per day in the Abidjan area ingest contaminated milk not meeting standards of microbiological quality.

#### Risk mitigation

##### Risk mitigation by milk quality control

Simulation of reduction of contamination at the point of sale. Table 7 shows the updated probabilities of ingestion of raw milk contaminated ( $P_{if}$ ) after milk quality control was implemented. The decrease in the prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{>N}$ ) to the level of 20%, 10%, and 5% reduces  $P_{if}$  to 10.3% (90% CI, 09.1% to 11.4%), 5.2% (90% CI, 4.8% to 5.7%), and 2.5% (90% CI, 2.2% to 2.8%), respectively. With these options,  $P_{if}$  is reduced by 19.5% (90% CI, 9.9% to 29.2%), 24.6% (90% CI, 14.6% to 34.4%), and 27.2% (90% CI, 17.1% to 37.2%), respectively. The reduction of risk would be greatest (27.2%) at 5% of  $P_{>N}$  if milk not meeting standards of microbiological quality were discarded (table 7).

*Economic impact.* The quantity of daily raw milk contaminated with at least one of the three bacteria studied in Abidjan was 801 L (90% CI, 619.3 to 956.7 L)

TABLE 5. Prevalence of bacteria in marketed raw milk

Species	Prevalence (%)
<i>Escherichia coli</i>	70.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	17.6
<i>Enterococcus</i> spp.	58.8
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>Enterococcus</i> spp.	76.5

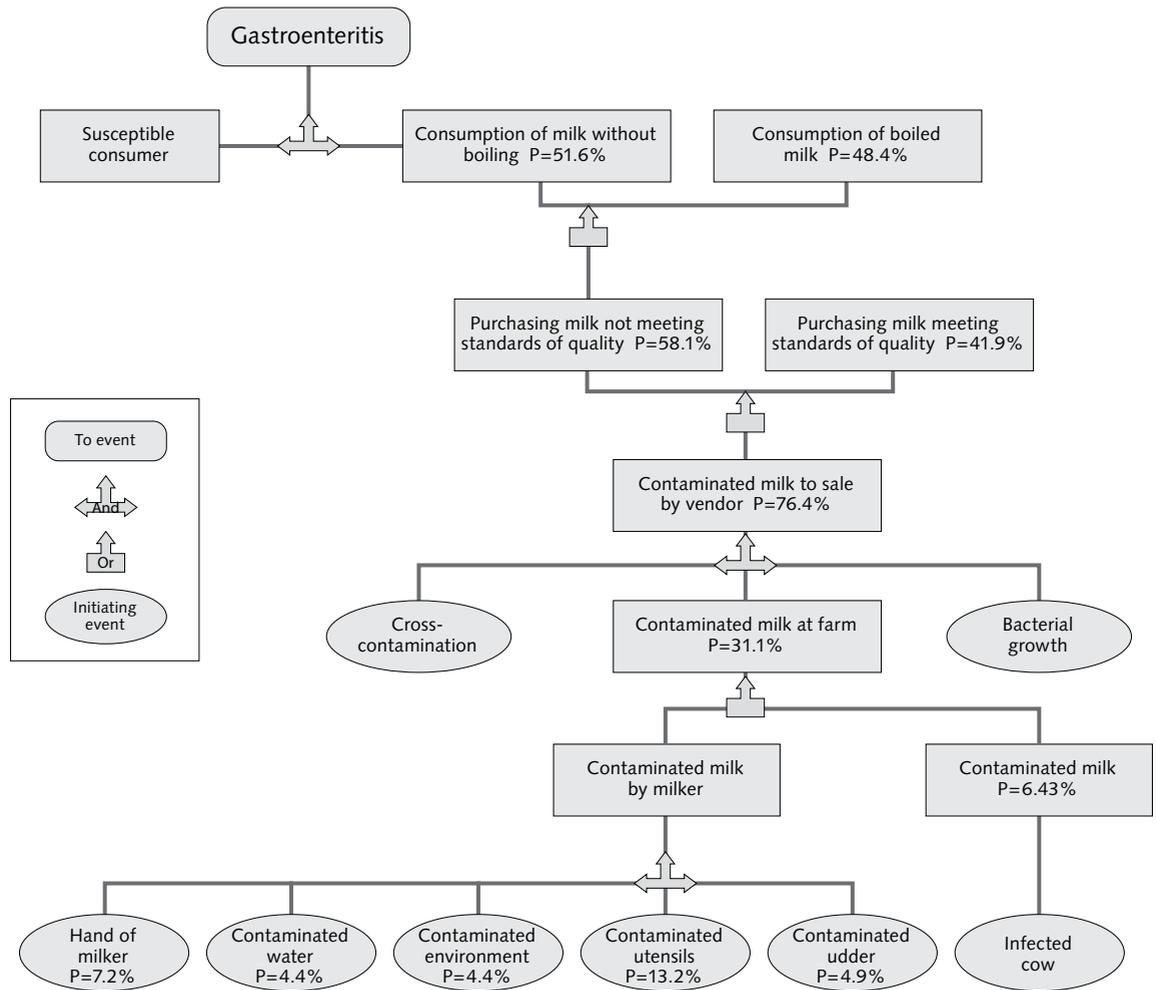


FIG. 2. Fault tree showing events leading to gastroenteritis. P, prevalence

TABLE 6. Outputs of the model (5,000 iterations)

Parameter	Mean (90% CI)	Min	Max
Quantity of raw milk contaminated daily in Abidjan	801 L (619.3–956.7 L)	252.2 L	1,056.2 L
Quantity of raw milk daily not meeting standards of microbiological quality in Abidjan	624.6 L (424.6–778 L)	210.5 L	965.6 L
Probability of loss per day in study area	€623.9 (€428.7–€769.1)	€233.3	€966.8
Probability that marketed milk is contaminated with <i>Escherichia coli</i>	68.4% (50.2%–84.4%)	26.9%	96.2%
Probability that marketed milk is contaminated with <i>Staphylococcus aureus</i>	21.5% (8.0%–37.7%)	1.6%	61.2%
Probability that marketed milk is contaminated with <i>Enterococcus</i>	57.9% (39.2%–75.6%)	19.2%	90.2%
Probability that marketed milk is contaminated with 1 or more of the above pathogens	73.7% (56.1%–88.3%)	31.9%	96.8%
Concentration of pathogens in milk	103,214 cfu/mL	0 cfu/mL	520,000 cfu/mL
Prevalence of marketed milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_{>N}$ )	58.1% (44.0%–75.8%)	19.6%	92.7%
Proportion of raw milk consumption (milk not boiled) ( $P_{rnc}$ ) in people who consume milk	51.6% (45.7%–57.4%)	36.9%	65%
Probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality ( $P_i$ )	29.9% (20.1%–39.5%)	9.3%	52.9%

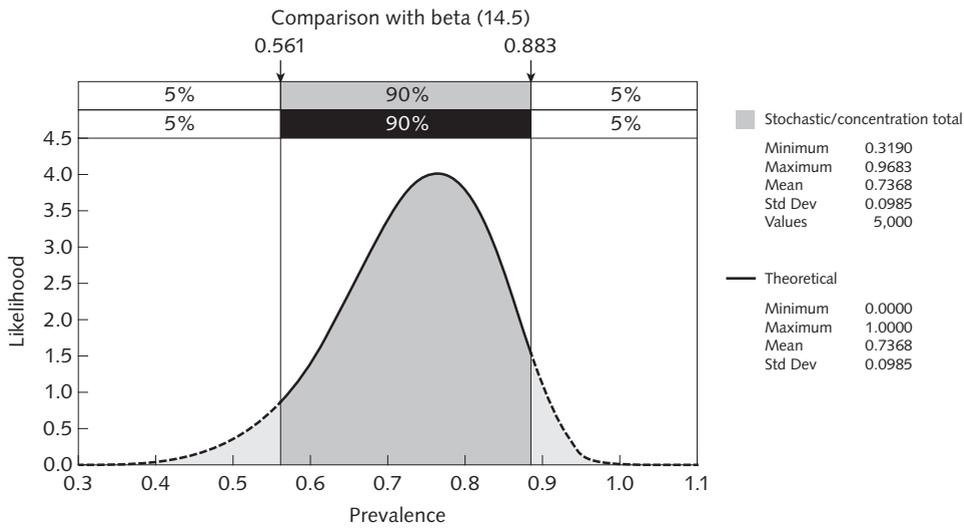


FIG. 3. Simulation of frequency of contamination of raw milk by pathogens (5,000 iterations)

TABLE 7. Predicted probability after control options and awareness campaigns by simulation

Risk mitigation options	Parameters	Predicted probability ( $P_{ij}$ ) (90% CI)	Reduction rate (90% CI)
Control options by discarding milk and implementing good hygiene practices	$P_{>N} = 20\%$	10.3% (9.1%–11.4%)	19.5% (9.9%–29.2%)
	$P_{>N} = 10\%$	5.2% (4.8%–5.7%)	24.6% (14.6%–34.4%)
	$P_{>N} = 05\%$	2.5% (2.2%–2.8%)	27.2% (17.1%–37.2%)
Awareness campaigns on boiling milk	$P_{rmc} = 20\%$	11.6% (7.7%–15.1%)	18.3% (11.7%–25.5%)
	$P_{rmc} = 10\%$	5.7% (3.8%–7.5%)	24.0% (15.8%–32.5%)
	$P_{rmc} = 05\%$	2.9% (1.5%–3.5%)	27.1% (17.8%–34.1%)

at informal sale points. Taking into account the milk contaminated beyond the levels of acceptability for human consumption (Regulation 2073/2005/EC) for the three pathogens studied, it was estimated that 624.6 L (90% CI, 424.6 to 778 L) of raw milk destined for the market would have to be discarded daily if this was chosen as an option. The destruction of contaminated milk would cause a potential daily loss of €623.9 (90% CI, €428.7 to €769.1) across all producers in the study area through direct losses of milk. Imposing discarding milk would also have other costs associated with the detection of contaminated milk and enforcement of discarding.

**Awareness campaigns about the risk**

The second risk-reduction option considered was awareness campaigns recommending that consumers boil milk before consumption. Awareness campaigns on boiling milk leading to a decrease of the proportion of raw milk consumption ( $P_{rmc}$ ) in people who consume milk to the levels of 20%, 10%, and 5% would reduce the probability of ingestion of contaminated milk ( $P_{ij}$ ) by 18.3% (90% CI, 11.7% to 25.5%), 24.0% (90% CI, 15.8% to 32.5%), and 27.1% (90% CI, 17.8% to 34.1%), respectively (table 7).

**Discussion**

Risk assessment associated with consumption of milk produced in urban and periurban areas of Abidjan was conducted through the analysis of milk contamination by pathogens and consumer behavior. The traditional milking and sale system explains the high percentage of marketed raw milk that did not meet quality standards for microbiological pathogens (*S. aureus*, *E. coli*, and *Enterococcus*). Fault-tree analysis indicated that the most important point of contamination was on the farm rather than during transport or sale. Sources of contamination included cows, farmers’ hands, water, the farm environment, and milking utensils. According to the Codex Alimentarius Commission [36] and Rohrbach et al. [37], the prevalence of these pathogens in milk could be influenced by several factors, such as geographic area, season, farm size, number of animals on the farm, hygiene practices, and farm management practices. In the study area, dairy production followed traditional farming practices. All milk was produced on smallholder farms with low average milk production. The analysis of the local actors’ behavior is an important tool for risk characterization and determination of the origin of milk contamination. In our previous

study [38], the majority of dairy farmers in this area did not wash their hands and the cows' udders before milking.

The farmers also did not wash their hands after milking each cow, which posed a risk of transferring germs from one cow to another. All of these habits may increase the risk of contamination of milk [38]. The risk is exacerbated by practices of the vendors. None of the sales points had milk cooling systems; milk was sold in unhygienic environments and without prior heat treatment. This is consistent with the results of our fault tree showing the origins of the contamination of milk from farm to consumer. The study showed that the quantity of milk available daily in the informal markets of Abidjan is low. The milk produced in periurban areas is sent to the urban area to be sold in the informal markets of Abidjan.

This contrasts to the situation in Bamako, the capital of neighboring Mali, which has several milk collection centers and markets belonging to farmers' organizations of different periurban communities. The collection centers are equipped with refrigerated tanks, generators, and equipment to measure milk quality. Most centers collect between 200 and 250 L of milk per day, and some collect more than 1,000 L per day. The milk is sold on site very quickly in a few hours to dealers who distribute it in Bamako or to local consumers. The surplus is sometimes boiled in pots or transformed into curds [39]. In Mali, only a small part of the marketable surplus of local milk goes to industrial processing units. The distribution of local milk and derived products is essentially the domain of the informal sector (collectors, street vendors, small shops, and individual producers). In the main urban areas of Mali (Bamako, Segou-Niono, Sikasso-Koutiala, and Mopti), most milk processing is done by small craft businesses producing sour milk, butter, or butter oil or by mini-dairies or small pasteurization plants. More than Mali, Burkina Faso, and Niger, Senegal has a rich experience in processing both local fresh milk and milk powder.

Unlike Bamako, where the collection, distribution, sales, and processing of milk are well established and developed with the installation of mini-dairies, the sales system for milk is not well established in Abidjan.

The number of milk consumers was low in Abidjan. In Abidjan and in the rest of the country, milk is not part of the customary diet. The only people in Côte d'Ivoire who consume large quantities of local fresh milk belong to one ethnic group in the northern regions that shares the same pastoral tradition as the people in Mali, Burkina Faso, and Senegal, [33, 40].

Monte Carlo simulations suggested a high probability that raw milk sold to consumers was contaminated with the pathogens studied and a high probability of ingestion of raw milk not meeting standards of microbiological quality in Abidjan. The presence of

*E. coli*, *Enterococcus*, and *S. aureus* in milk suggests the possible presence of other pathogens that were not investigated in this study. Raw milk may contain *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis* [41], *E. coli* O157 [42], *Salmonella* spp. [43], and *Campylobacter* spp. [44]. Despite the risk linked to the consumption of raw milk, half of the consumers in Abidjan consumed raw milk directly after purchase without boiling it. We did not estimate the likelihood of human illness related to contaminated milk; however, consumption of milk that fails to meet standards is likely to result in illnesses. The consumption of inadequately pasteurized milk or raw milk has been associated with enteric disease in Abidjan [38]. The symptoms reported were nausea, vomiting, stomach cramps, and diarrhea. An association between raw milk and gastrointestinal illness has been reported by several authors [45–50].

This risk assessment was not carried to completion, because information was lacking on the dose effect. Despite the quantity of raw milk consumed daily, reports of outbreaks are relatively rare. No outbreaks of bacterial food-borne illness associated with consumption of raw milk have been reported in Abidjan. However, it is probable that many cases are not reported. In addition, the long-term effects on human health of continuous or repeated exposure to pathogens in local milk are largely unknown.

To assess control measures to reduce the probability of ingestion of contaminated milk in Abidjan, two risk mitigation scenarios were simulated. The first scenario was the implementation of a control option to decrease the prevalence of contaminated milk marketed, and the second was the implementation of an awareness campaign on boiling milk. Control options based on discarding milk that does not meet microbiological quality standards would greatly reduce the risk of ingestion of contaminated milk. However, the costs of these control options, in particular the financial loss to producers and the cost of enforcement, would be a major challenge to their implementation. In addition, they would probably result in an increase in the retail price of milk, which would be unpopular with consumers. The other mitigation strategy considered was the implementation of an awareness campaign on milk boiling. With this scenario, the risk of ingestion of contaminated milk would be reduced by 27.1%, slightly below the reduction rate of the first control options. Boiling milk for less than 2 minutes over a direct flame provides the consumer with the required safety. It is simple and inexpensive and preserves the nutritive value and flavor of milk [51]. The World Health Organization (WHO) recommends boiling milk for African countries and describes the process in its training manual. Boiling milk is a simple process and does not need temperature gauges or timing devices, which limit the use of pasteurization. The awareness campaign for consumers would be less expensive,

easier to achieve, and more rapid and effective than discarding contaminated milk. Pasteurization or boiling of milk is the most basic method of controlling diseases in humans caused by milk consumption. This option would place a realistic financial burden on policymakers and stakeholders of the milk production chain. Boiling milk cannot absolutely prevent diseases caused by the consumption of milk in Abidjan; it should be integrated with the promotion of good hygiene practices from farm-to-fork. Fermentation of local milk may reduce the pathogenic bacterial load by the production of organic acids during fermentation. Consumption of fermented milk has antibacterial effects on enteropathogens and reduces the number of diarrheal episodes in children because of the lactic acid bacteria present [52, 53]. Monitoring of milk and dairy products made from raw milk could decrease cases of gastroenteritis associated with consumption of these products. Farmers must be aware of the good hygiene practices and inspections by public health authorities should also be implemented to improve the quality of the products of this sector.

## References

1. World Health Organization. WHO global strategy for food safety. Geneva: WHO, 2002.
2. Grace D, Randolph T, Olawoye J, Dipelou M, Kang'ethe E. Participatory risk assessment: a new approach for safer food in vulnerable African communities. *Dev Pract* 2008;18:611–8.
3. Kouamé BD, Ouattara O, Dick RK, Roux C. Résultats du traitement des perforations typhiques de l'enfant à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Med Afr Noire* 2000;47:508–11.
4. Michel R, Garnotel E, Spiegel A, Morillon M, Salou P, Boutin JP. Outbreak of typhoid fever in vaccinated members of the French Armed Forces in the Ivory Coast. *Eur J Epidemiol* 2005;20:635–42.
5. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Système national de sécurité sanitaire des aliments et ses impacts socio-économiques et sanitaires (préparé par la Côte d'Ivoire). Document de séance 16, Conférence régionale FAO/OMS sur la sécurité sanitaire des aliments pour l'Afrique. Harare, Zimbabwe, 3–6 October 2005:1–6. Available at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/af082f.pdf>. Accessed 28 September 2012.
6. République de Côte d'Ivoire. Plan d'Action National de Sécurité Sanitaire des Aliments, 2010:1–48.
7. Koffi-Nevry R, Judaicé ACB, Assemmand EF, Wognin AS, Koussemon M. Origine de contamination fécale de l'eau d'arrosage de la laitue cultivée dans d'Abidjan. *J Appl Biosci* 2012;52:3669–75.
8. Johnson EA, Nelson JH, Johnson M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part 1: microbiology. *J Food Prot* 1990;53:441–52.
9. Garg SK, Mital BK. Enterococci in milk and milk products. *Crit Rev Microbiol* 1991;18:15–45.
10. Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Ouattara AS, Barro N, Traoré AS. Microorganisms involved in fulani

## Conclusions

The microbiological quality of local milk can be improved through introduction of good hygienic practices among farmers. Given the high level of contamination found in our study and consumption behavior that puts consumers at risk, we recommend awareness of good hygienic practices and the benefits of fermentation and boiling of milk among all dairy stakeholders.

## Acknowledgments

This study was conducted with financial support from the International Foundation for Science (IFS) (ref: E/4488-1), the International Livestock Research Institute (ILRI)/Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH through the "Safe Food, Food Fair" project, and the Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS). The authors would like to thank the farmers and milk vendors who participated in this study.

11. Millogo V, Ouédraogo GA, Agenäs S, Svennersten-Sjaunja K. Survey on dairy cattle milk production and milk quality problems in peri-urban areas in Burkina Faso. *Afr J Agric Res* 2008;3:215–24.
12. Millogo V, Svennersten Sjaunja K, Ouédraogo GA, Agenäs S. Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food Control* 2010; 21:1070–4.
13. Bonfoh B, Wasem A, Traoré AN, Fané A, Spillmann H, Simbé CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J. Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control* 2003;14:495–500.
14. Bonfoh B, Roth C, Traoré AN, Fané A, Simbé CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J. Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food Control* 2006;17:153–61.
15. Donkor ES, Aning KG, Quaye J. Bacterial contaminations of informally marketed raw milk in Ghana. *Ghana Med J* 2007;41:58–61.
16. Dufour B, De Buyser ML, Brisabois A, Espié E, Delmas G. La sécurité microbiologique: implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire. In: La sécurité des produits laitiers, 5ème conférence européenne d'Arilait (CREAL 2004). Paris: Arilait Recherches, 2005:13–21.
17. Hegarty H, O'Sullivan MB, Buckley J, Faley-Nolan C. Continued raw milk consumption on farms: why? *Commun Dis Public Health* 2002;5:151–6.
18. Bemrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW, Cerf O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pak J Nutr* 2004;3:134–9.

- consumption of soft cheese made from raw milk. *Prev Vet Med* 1998;37:129–45.
19. Bemrah N, Bergis H, Colmin C, Beaufort A, Millemann Y, Dufour B, Benet JJ, Cerf O, Sanaa M. Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *Int J Food Microbiol* 2003;80:17–30.
  20. Sanaa M, Cerf O. La démarche d'analyse quantitative des risques de maladies infectieuses transmises par les aliments. *Épidémiologie et santé animale* 2002;41:157–68.
  21. Lindqvist R, Sylvén S, Vagsholm I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol* 2002;78:155–70.
  22. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implications of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialized countries. *Int J Food Microbiol* 2001;67:1–17.
  23. Murinda SE, Nguyen LT, Nan HM, Almeida RA, Headrick SJ, Oliver SP. Detection of sorbitol-negative and sorbitol-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathog Dis* 2004;1:97–104.
  24. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis* 2005;2:1115–29.
  25. Adesiyun AA, Stoute S, David B. Pre-processed bovine milk quality in Trinidad: prevalence and characteristics of bacterial pathogens and occurrence of antimicrobial residues in milk from collection centres. *Food Control* 2007;18:312–20.
  26. Hartman PA, Deibel RH, Sieverding LM. Enterococci. In: Downes FP, Ito K, eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, DC: American Public Health Association, 2001:83–7.
  27. Berger T, Bütikofer U, Reh Ch, Eckhart J, Dubach A, Stalder M, Luczinski K, Schmid R, Walder R, Stalder U. Lait. In: *Manuel suisse des denrées alimentaires*, partial revision 2004 eds. Bern, Switzerland: Office fédéral de la santé publique, 2004:1–11.
  28. International Dairy Federation. *Handbook on milk collection in warm developing countries*. IDF Special Issue No. 9002. Brussels: International Dairy Federation, 1990:1–148.
  29. Commission des Communautés Européenne. Commission regulation (EC) n° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off J Eur Union* 2005;338/331–338/326.
  30. Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*, 3rd ed. Oxford, UK, Blackwell Publishing, 2005.
  31. Newcombe RG. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat Med* 1998;17:857–72.
  32. Commission Codex Alimentarius. *Principes et directives pour la gestion des risques microbiologiques*. Geneva: Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2007.
  33. Food and Agriculture Organization. *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine*. Collection FAO: alimentation et nutrition, n°28. Rome: FAO, 1998.
  34. Dosso M, Coulibaly M, Kadio A. Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. *Bull Soc Pathol Exot* 1998;5:402–405.
  35. Dadié A, Karou T, Adom N, Ketté A, Dosso M. Isolation of enteric pathogenic agents in Cote d'Ivoire: *Escherichia coli* 0157:H7 and enteroaggregative *E. coli*. *Bull Soc Pathol Exot* 2000;93:95–96.
  36. Codex Alimentarius Commission. *Foods standards program Codex Alimentarius Commission*. Report of the 28th session of the Codex committee on food hygiene. Washington, DC, 27 November–1 December 1995. ALINORM 97/13;1995. [http://www.fao.org/waicent/search/simple\\_s\\_result.asp?cgiar=&publication=1&webpage=2&photo=3&press=5&video=9&agrovoc=36899&agrovoc\\_dett=36899](http://www.fao.org/waicent/search/simple_s_result.asp?cgiar=&publication=1&webpage=2&photo=3&press=5&video=9&agrovoc=36899&agrovoc_dett=36899).
  37. Rohrbach RW, Draughon FA, Davidson PM, Oliver SP. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *J Food Prot* 1992;55:93–7.
  38. Kouamé-Sina SM, Bassa A, Dadié A, Makita K, Grace D, Dje M, Bonfoh B. Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)* 2010;S(8):35–42.
  39. Ministère de l'Élevage et de la Pêche. *Stratégie de valorisation du lait cru local au Mali*. Octobre 2008. Available at: [http://www.apimali.gov.ml/uploads/news/id18/strat%C3%A9gie\\_de\\_d%C3%A9veloppement\\_du\\_lait\\_local.pdf](http://www.apimali.gov.ml/uploads/news/id18/strat%C3%A9gie_de_d%C3%A9veloppement_du_lait_local.pdf). Accessed 12 August 2012.
  40. Gidel R, Albert JP, Le Mao G, Retif M. La brucellose bovine en Afrique occidentale et son incidence sur la santé publique. Résultats de 10 enquêtes épidémiologiques effectuées en Côte d'Ivoire, Haute-Volta et Niger de 1970 à 1973. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1974;27:403–18.
  41. Faye B, Castel V, Lesnoff M, Rutabinda D, Dhalwa J. Tuberculosis and brucellosis prevalence survey on dairy cattle in Mbarara milk basin (Uganda). *Prev Vet Med* 2005;67:267–81.
  42. Kang'ethe EK, Ekuttan CE, Kimani VN, Kiragu MW. Investigation into the prevalence of bovine brucellosis and the risk factors that predispose humans to infection among urban dairy and non-dairy farming households in Dagoretti Division, Nairobi, Kenya. *East Afr Med J* 2007;84:96–100.
  43. Nero LA, de Mattos MR, Barros Mde A, Ortolani MB, Beloti V, Franco BD. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses Public Health* 2008;55:299–305.
  44. Heuvelink A E, Van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg JJ, Bos MH, Heilmann FG, Hofhuis A, Hoekstra T, de Boer E. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cow's milk. *Int J Food Microbiol* 2009;134:70–4.
  45. Smoot LM, Pierson MD. Indicator microorganisms and microbiological criteria. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, eds. *Fundamentals of food microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1997:66–82.
  46. Zmirou D, Kelley JP, Collin JF, Charrel M, Berlin J. A follow-up study of gastro-intestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. *Am J*

- Public Health 1987;7:582–84.
47. Haeghebaert S, Le Querrec F, Gallet A, Bouvet P, Gomez M, Vaillant V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1999–2000. Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) 2002;23:105–9.
  48. Haeghebaert S, Le Querrec F, Bouvet P, Gallet A, Espié E, Vaillant V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) 2002;50:249–53.
  49. Belomaria M, Ahami AOT, Aboussaleh Y, Elbouhali B, Cherrah Y, Soulaymani A. Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Chrarda Bni Hssen. Antropo 2007;14:83–8.
  50. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, Pena EC, Jett M, Heneine LG. Food poisoning due to enterotoxigenic strain of *Staphylococcus aureus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiol 2002;19:9–14.
  51. Metwally AMM, Dabiza NMA, El-Kholy WI, Sadek ZI. The effect of boiling on milk microbial contents and quality. J Am Sci 2011;7:110–4.
  52. Mensah P. Fermentation—the key to food safety assurance in Africa? Food Control 1997;8:271–8.
  53. Guerin-Danan C, Andrieux C. Nutritional and health benefits of fermented milks in young infants. Cahiers de nutrition et de diététique 1998;33:384–9.