

# SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
1.1. <i>CAMPYLOBACTER</i> :.....	2
1.2. <i>SALMONELLA</i> :.....	3
1.3. FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DE LA VIANDE DE VOLAILLE PAR <i>SALMONELLA</i> ET <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	4
<b>2. MATERIELS ET METHODES :.....</b>	<b>5</b>
2.1. ENQUÊTES DE TERRAIN :.....	5
2.2. RECHERCHE DES MICRO-ORGANISMES :.....	5
2.2.1. <i>Prélèvements</i> .....	5
2.2.2. <i>Micro-organismes indicateurs d'hygiène</i> .....	6
2.2.3. <i>Campylobacter</i> .....	6
2.2.4. <i>Salmonella</i> :.....	6
2.3. CARACTÉRISATION GÉNOTYPIQUE PAR MACRORESTRICTION.....	7
2.3.1. <i>Préparation de l'ADN</i> :.....	7
2.3.2. <i>Macrorestriction</i> .....	7
2.3.3. <i>Capture des images et analyse des profils</i> .....	7
2.4. ANALYSES STATISTIQUES :.....	7
<b>3. RESULTATS :.....</b>	<b>8</b>
3.1. EVALUATION DU STATUT SANITAIRE DE LA PRODUCTION AVICOLE.....	8
3.1.1. <i>Couvoirs</i> :.....	8
3.1.2. <i>Elevages</i> :.....	8
3.1.2.1. <i>Pratiques d'élevage</i> :.....	8
3.1.2.2. <i>Statut Microbiologique des élevages</i> .....	8
3.1.3. <i>Tueries</i> :.....	8
3.1.3.1. <i>Pratiques d'abattage</i> .....	8
3.1.3.2. <i>Statut Microbiologique des carcasses</i> .....	11
3.1.4. <i>Impact des Pratiques d'élevage et d'abattage</i> :.....	11
3.2. ANALYSE DE LA DIVERSITÉ DES <i>CAMPYLOBACTER</i> :.....	11
3.2.1. <i>Identification par PCR</i> :.....	11
3.2.2. <i>Caractérisation génotypique par Macrorestriction</i> :.....	18
3.2.2.1. <i>Caractérisation par macrorestriction avec l'enzyme SmaI</i> .....	18
3.2.2.2. <i>Caractérisation par macrorestriction avec l'enzyme KpnI</i> .....	18
3.2.2.3. <i>Analyse des génotypes obtenus par combinaison des deux techniques de macrorestriction</i> .....	24
3.2.2.4. <i>Répartition des types combinés dans les élevages et les marchés</i> .....	26
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>26</b>
4.1. CONTAMINATION AU COUVOIR :.....	26
4.2. CONTAMINATION À L'ÉLEVAGE :.....	26
4.3. CONTAMINATION À L'ABATTAGE :.....	27
4.4. DIVERSITÉ ET RÉPARTITION DES <i>CAMPYLOBACTER</i> :.....	28
4.4.1. <i>Identification de l'espèce par PCR</i> :.....	28
4.4.2. <i>Caractérisation par Macrorestriction</i> :.....	29
<b>CONCLUSION :.....</b>	<b>30</b>

L'aviculture industrielle est en plein essor actuellement dans le monde. En 1997, la production mondiale de volailles s'est élevée à 51 millions de tonnes. En 5 ans (de 1992 à 1997), cette production a augmenté de 40 p.cent alors que pendant la même période, les productions de viande bovine et ovine ont diminué de 5 et 8 p. cent respectivement.

Au Sénégal, pour répondre à une démographie citadine sans cesse croissante et à une demande en protéines animales en constante augmentation, une aviculture semi-industrielle de proximité dans l'espace urbain et périurbain s'est développée. La région de Dakar regroupe l'essentiel de cette activité dans un rayon de 100 km autour de la capitale et représente 6 millions de poulets de chair sur une année. De 1992 à 1998, cette production a augmenté de 20 p. cent passant de 6000 à plus de 7000 tonnes par an ; l'amélioration de la productivité a permis de réduire les coûts de production et aujourd'hui, le poulet produit par ces élevages modernes fournit la viande la moins chère aux consommateurs sénégalais (1350 F CFA le Kilo).

Cependant, cette production ne bénéficie pas d'un secteur aval développé : absence d'abattoir de poulets de chair notamment et les produits qui sont commercialisés (carcasses, rares éléments de découpe) sont souvent d'une qualité hygiénique douteuse.

En outre, au Sénégal, le contrôle de la qualité des denrées alimentaires d'origine animale est encore peu développé sauf dans la filière de la pêche où le commerce international impose des conditions draconiennes. La qualité se résume à des conditions sur le produit qui s'établissent entre le client et le fournisseur mais qui n'abordent jamais le problème de la contamination microbiologique. Or, il est grand temps de se pencher sur ce problème car depuis les crises successives de la vache folle et de la dioxine, la confiance du consommateur sénégalais a été fortement ébranlée et il importe de restaurer celle-ci pour espérer faire prospérer la filière avicole. De plus, les nouveaux tarifs douaniers, dans le cadre de l'UEMOA<sup>1</sup>, vont permettre l'entrée sur le territoire national de produits avicoles dont la qualité aura été contrôlée ; les produits sénégalais devront, pour résister à la concurrence, offrir au moins les mêmes garanties sanitaires.

Les objectifs de ce travail consistent, d'une part, à évaluer la qualité microbiologique de la viande de poulet de chair pour déterminer le risque potentiel pour la santé publique. D'autre part, il s'agit de recenser les points à risque de la fourche à la fourchette qui peuvent introduire un danger microbiologique ou en faciliter sa multiplication en s'attachant particulièrement à *Salmonella* et à *Campylobacter* qui sont les bactéries les plus fréquemment incriminées lors d'intoxication alimentaire causée par la consommation de viande de volailles.

## 1. INTRODUCTION

### 1.1. *Campylobacter* :

Les *Campylobacter* appartiennent à la famille des *Campylobacteraceae*. Plusieurs espèces de *Campylobacter* ont été décrites (Quinn *et al.*, 1994) ; toutes se développent à 37°C mais certaines d'entre elles ont la particularité de pousser également à 42°C et constituent le groupe des thermotolérants. Ce groupe est composé de quatre espèces : *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis* ; il est principalement responsable d'entérites chez l'homme et par conséquent il est l'objet d'un intérêt particulier dans le domaine alimentaire. Les espèces les plus fréquemment isolées, dans ces entérites, sont *C. jejuni* et *C. coli* ; *C. jejuni* est l'espèce prédominante et représente de 80 à 90 % des cas de gastro-entérites provoquées par

<sup>1</sup> Union Economique et Monétaire de l'Ouest Africain

*Campylobacter* chez l'homme (Skirrow, 1990). Ces deux espèces sont principalement associées à la viande de volaille (Altekruse, 1999).

Ce sont des bacilles fins, incurvés, en forme de S et pouvant présenter une ou plusieurs ondulations. Leur motilité caractéristique en tire-bouchon est due à la présence d'un flagelle à l'une ou aux deux extrémités. Dans certaines conditions, notamment dans les cultures âgées, il est possible d'observer des bacilles incurvés immobiles qui seraient viables mais non cultivables par les techniques classiques ainsi que des formes coccoïdes qui correspondraient à un état de dégénérescence (Boucher *et al.*, 1994). Ce sont des bactéries microaérophiles qui nécessitent une atmosphère appauvrie en oxygène pour se développer.

Tout récemment, le Centre Sanger vient de terminer le séquençage complet du génome de la souche de *C. jejuni* NCTC11168, et affiche un total de 1 641 480 pb (Parkill et Barell, 1999), avec 25 régions polymorphiques riches en guanine. Il s'agit d'une très petite taille comparativement au génome de *Myxococcus xanthus* (9,45 Mb) ou d'*E. coli* (4,55 Mb). Cette caractéristique concorde avec la nature délicate de la bactérie, ainsi qu'avec son besoin de milieu supplémenté, son incapacité à fermenter les carbohydrates ou à dégrader les substances complexes et avec sa relative inertie biochimique.

La souche de *C. jejuni*, récemment séquencée, a un taux de G+C de 31 %. Il se situe dans la limite inférieure des valeurs G+C % observées chez les organismes vivants (25 à 75 %) (Véron et Fauchère, 1990).

Cette bactérie est actuellement considérée comme la principale cause de diarrhée dans les pays développés (White *et al.*, 1997). Les symptômes décrits sont une diarrhée aqueuse accompagnée de crampes abdominales mais certaines infections prennent la forme d'un syndrome pseudo-grippal avec des myalgies, de la fièvre et des douleurs abdominales. Certains cas peuvent évoluer vers des complications nerveuses (syndrome de Guillain-Barré et syndrome de Miller-Fisher).

#### Caractérisation des *Campylobacter*

La caractérisation des *Campylobacter* a, dans un premier temps, été basée sur le phénotype, notamment sur des caractères biochimiques et sérologiques (Lior, 1984 ; Penner et Hennessy, 1980). Ces méthodes de typage ne permettent pas d'obtenir une discrimination suffisante et de nouvelles techniques génotypiques ont été développées. Ces méthodes permettent d'acquérir une meilleure connaissance sur la dissémination de la bactérie (sources et voies de transmission) et de définir l'existence d'une parenté clonale entre différentes souches de *Campylobacter* (Yan *et al.*, 1991) La particularité du génome de *Campylobacter*, dit « génome mosaïque », complique ce dernier point (Wang et Taylor, 1990). Les techniques de typage utilisées doivent permettre de caractériser finement la bactérie, tout en favorisant la mise en évidence de liens de parenté pouvant être masqués par des phénomènes de transformation et de recombinaison. L'utilisation d'une méthode, hautement discriminante, étudiant la globalité du génome, telle que la macrorestriction, combinée avec l'étude du polymorphisme de restriction de certains gènes semble être le système de typage le mieux adapté à l'étude de *Campylobacter* (Slater *et al.*, 1998). C'est cette stratégie que nous avons choisie pour notre étude.

### **1.2. *Salmonella* :**

Les salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les hybridations ADN-ADN ont montré qu'il n'y avait qu'une espèce génomique dans le genre *Salmonella* et sept sous espèces dont *Salmonella enterica* ssp *enterica* qui nous intéresse dans ce travail. Ces Salmonelles sont ensuite identifiées par leur sérotype avec la méthode d'agglutination sur lame de Kaufmann. Ce sont des bacilles droits à Gram négatif, souvent mobiles, poussant sur des milieux ordinaires,

aréo-anaérobies. Certains caractères permettent l'identification phénotypique des salmonelles : absence d'uréase, absence de fermentation du lactose, production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate, décarboxylation fréquente de la lysine et pousse fréquente sur le milieu au citrate de Simmons (Quinn *et al.*, 1994).

Les *Salmonella* sont essentiellement des parasites intestinaux des Vertébrés. La sous-espèce *enterica* est adaptée aux animaux à sang chaud et à l'homme ; les autres sous-espèces sont principalement associées aux animaux à sang froid ou retrouvées dans l'environnement. Parmi les sérotypes de la sous-espèce *enterica*, la plupart sont ubiquitaires et certains montrent une spécificité d'hôte soit humaine (*S. Typhi* ou *S. Paratyphi A*) soit animale. Les sérotypes ubiquistes représentent la très grande majorité des sérotypes de *Salmonella* (*Typhimurium*, *Enteritidis*, *St Paul*, *Virchow...*) et sont responsables des toxi-infections alimentaires collectives (Humbert et Salvat, 1997).

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

### 1.3. Facteurs de risque de contamination de la viande de volaille par *Salmonella* et *Campylobacter*

A l'élevage, l'application de pratiques hygiéniques strictes apparaît fondamentale dans la maîtrise des contaminations des oiseaux par *Salmonella* et *Campylobacter* (Humphrey *et al.*, 1988 ; Humbert et Salvat, 1997 ; Van de Giessen *et al.*, 1998 ; White *et al.*, 1997). Ces bactéries se transmettent surtout par voie horizontale et de nombreux vecteurs environnementaux peuvent intervenir dans la contamination des volailles :

- les volailles : Le non respect du principe de la bande unique, la présence d'élevages mixtes poulets de chair – pondeuses, le maintien dans l'élevage d'animaux malades (White *et al.*, 1997) sont autant de facteurs qui favorisent la contamination entre les oiseaux. En effet, les volailles peuvent héberger des salmonelles sans exprimer de symptômes (portage sain et chronique) ou lors de déficit immunitaire manifester des signes cliniques, ils représentent des sources de contamination majeures et la transmission se fait surtout par voie orale (Humbert et Salvat, 1997). Pour *Campylobacter*, la transmission de la bactérie à tous les animaux du bâtiment est expliquée par la coprophagie (Jacobs-Reitsma, 1997 ; Shanker *et al.*, 1990).
- Les rongeurs : ces derniers sont considérés comme des sources récurrentes de *Salmonella* (Henzler et Opitz, 1992, Gronstol *et al.*, 1974) et de *Campylobacter* (Gregory *et al.*, 1997, Kapperud *et al.*, 1993). Une étude récente de Réfrégier-Petton *et al.* (2000) a d'ailleurs considéré l'absence de contrat de dératisation comme un facteur de risque important de la contamination des élevages.
- La litière : elle est très souvent incriminée dans la contamination des volailles par *Salmonella* (Harvey, 1973 ; Simmons et Byrnes, 1972) mais beaucoup moins pour *Campylobacter* (Jacobs-Reitma, 1997).
- L'aliment et l'eau : ils constituent des facteurs de risque de contamination par *Salmonella* fréquemment cités (Brown *et al.*, 1992 ; Bisgaard et Hansen, 1994). La contamination est liée à la présence d'excréments souillés (rongeurs, volailles) L'aliment ne semble pas

constituer un risque important pour la contamination par *Campylobacter* (Gregory *et al.*, 1997) mais l'eau, notamment par l'existence de formes viables non cultivables, peut intervenir dans la contamination (Altekruse *et al.*, 1999).

- L'homme : il est souvent cité comme source de contamination (Lahellec *et al.*; 1986) et intervient surtout en tant que vecteur indirect par ses vêtements et ses chaussures (Jacobs-Reitsma ; 1997).

**A l'abattage**, les pratiques hygiéniques ont aussi un impact significatif sur la contamination des carcasses et chaque étape de la préparation de la carcasse peut introduire ou permettre le développement de bactéries :

- L'échaudage : les eaux du bac d'échaudage peuvent être contaminées par le plumage souillé des volailles, par les fientes libérées lors du relâchement consécutif à la mort, par les pattes des animaux ou lorsque le nettoyage et la désinfection du bac sont mal effectués (Salvat, 1997). Cette étape peut donc être le siège de contamination croisée (Laisney et Colin, 1993).
- La plumaison : La plumaison peut constituer une source de contamination : les doigts de la plumeuse exercent une pression sur la peau et entraînent un transfert de la contamination des plumes, gorgées d'eau d'échaudage chargée de microorganismes, vers les follicules plumeux et la surface de la peau (Oosterom *et al.*, 1983 ; Salvat, 1997). Au cours de la plumaison, la carcasse subit un refroidissement progressif de la surface de la peau (après l'échaudage) qui entraîne la fermeture des follicules plumeux dilatés qui emprisonnent les bactéries (Thomas et Mc Meekin, 1980).
- L'éviscération : C'est une étape bien maîtrisée mais des ruptures de l'intestin peuvent arriver lors de mauvais réglage des machines. Des possibilités de contamination par les mains des opérateurs subsistent (Salvat, 1997).

Les étapes finales de bridage et d'entreposage ne sont pas considérées comme des étapes contaminantes mais les contacts nombreux avec des surfaces (tables, sacs, couteaux, torchons...) et les manipulations humaines peuvent être à l'origine de contaminations croisées (Salvat *et al.*, 1993 ; Yang et Shih, 2000). L'absence de tenue spécifique et la multiplicité des tâches pour le même personnel ne font qu'amplifier le phénomène (Rozier *et al.*, 1985).

## **2. MATERIELS ET METHODES :**

### **2.1. Enquêtes de Terrain :**

Elles se sont déroulées dans la région de Dakar et se sont intéressées aux différents maillons de la filière en insistant particulièrement sur les points d'abattage. Les sites d'enquête ont été choisis au hasard, par tirage au sort.

Deux questionnaires (annexes 1 et 2) ont été élaborés afin d'une part d'identifier les défauts majeurs dans la conduite hygiénique des élevages et d'autre part d'estimer les pratiques à risque lors de l'abattage qui peuvent permettre l'introduction ou le développement d'un danger microbiologique dans la viande de volaille.

### **2.2. Recherche des Micro-organismes :**

#### **2.2.1. Prélèvements**

- Couvoirs : 400 poussins d'un jour (10 par éclosion) ont été analysés pour déterminer leur statut sanitaire vis à vis de *Salmonella*. Les poussins ont été directement récupérés au couvoir dans leur carton de transport et ramenés au laboratoire pour analyse immédiate.

- Elevages : Un pool de dix fientes fraîches réparties dans le poulailler a été prélevé dans 35 élevages visités, avant abattage. Ces fientes sont introduites dans un sachet plastique stérile puis ramenées au laboratoire dans une glacière et analysées immédiatement. L'analyse porte sur la recherche de *Salmonella* et de *Campylobacter*.

- Tueries : Des lots composés de 3 à 5 carcasses (290 au total) ont été achetés immédiatement après abattage dans 76 tueries (35 situées en élevage et 42 dans les marchés de Dakar). Les carcasses ont été transportées dans des glacières directement au laboratoire puis soumises à analyse.

Préparation de l'échantillon : Deux prélèvements de peau (l'un au niveau du cou, l'autre au niveau du bréchet) et un de muscle (bréchet) sont effectués sur chaque carcasse. Le muscle est cautérisé en surface à l'aide d'un bec bunsen avant d'effectuer le prélèvement en profondeur. Les prélèvements (10g) sont ensuite introduits dans un sachet Stomacher contenant du bouillon Preston ou de l'eau peptonée (90 ml) avant de subir un broyage de 2 minutes dans un Stomacher (Prolabo). Les analyses cherchent à mettre en évidence les flores indicatrices d'hygiène, les *Salmonella* et les *Campylobacter*.

### **2.2.2. Micro-organismes indicateurs d'hygiène:**

Les micro-organismes indicateurs d'hygiène sont constitués par la flore aérobie mésophile totale (FAMT), les coliformes thermotolérants (CT) et les staphylocoques coagulase positifs (STAPH). Les milieux et la méthode utilisée sont décrits dans les annexes 3, 4 et 5.

### **2.2.3. Campylobacter:**

La technique bactériologique de recherche des *Campylobacter* utilisée est celle décrite dans la norme NF ISO 10272 (schématisée en annexe 6).

La conservation des isolats de *Campylobacter* se fait par inondation de culture sur gélose au sang par 2,5 ml de bouillon bruceÿla adjuvé de 15% de glycérol. Les colonies de *Campylobacter* sont remises en suspension et transférées dans un cryotube avant d'être stockées dans un surgélateur à -70°C.

L'identification biochimique des *Campylobacter* est complétée par un test génétique fondée sur une PCR qui permet d'identifier *Campylobacter jejuni* et *C. coli* (Denis *et al.*, 1999). Cette identification est réalisée sur 126 isolats-à partir d'une culture pure obtenue sur gélose au sang après 48 heures d'incubation en microaérophilie à 42°C. Les amorces et la méthode qui sont utilisés sont décrites par Denis *et al.*, 1999.

L'analyse de la PCR (10 µl de la réaction) se fait par électrophorèse en gel de 1,5% d'agarose dans du TBE1X en présence de Bromure d'Ethidium à 0,2µg/ml dans un champ électrique de 3 à 3,5 volts/cm pendant 2 heures.

L'observation se fait directement sous lumière ultraviolette. Les images des gels sont capturées par un système numérique (gelDOC 1000, BioRad, France)

### **2.2.4. Salmonella :**

Deux méthodes ont été utilisées soit pour l'analyse des poussins (annexe 7) soit pour celle des fientes et des carcasses (annexe 8). L'identification des *Salmonella* se poursuit par sérotypage (séroagglutination avec des antiséra du commerce (BioRad Pasteur, France)). La conservation des isolats de *Salmonella* se fait dans des cryotubes contenant du bouillon glycérolé et stockés au surgélateur à -70°C.

## 2.3. Caractérisation génotypique par macrorestriction

Cette caractérisation n'a été réalisée que sur des isolats de *Campylobacter* et a porté sur 126 isolats issus des carcasses de poulets et sur deux souches de *C. jejuni* d'origine humaine appartenant à la collection du laboratoire (BOF et UA).

### 2.3.1. Préparation de l'ADN :

A partir d'une culture pure obtenue sur gélose au sang, après 48 heures d'incubation en microaérophilie à 42°C, les cellules bactériennes sont remises en suspension dans 2,5 ml d'une solution tampon de Tris 10 mM-HCl pH 8, NaCl 1 M (TN) puis centrifugées à 5000g pendant 10 minutes. Le culot bactérien est ensuite traité selon la méthode développée par Ragimbeau *et al.* (1998).

### 2.3.2. Macrorestriction

La digestion et la méthode électrophorétique suivent la démarche de Ragimbeau *et al.*, 1998. Pour chaque digestion enzymatique, l'ADN est digéré par *Sma*I (Roche Diagnostics, France) ou par *Kpn*I (Roche Diagnostics, France) dans un volume réactionnel contenant le tampon de digestion fourni par le fabricant (A pour *Sma*I et L pour *Kpn*I). L'incubation est effectuée pendant 5 heures à 25°C pour *Sma*I ou 37°C pour *Kpn*I. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés par une électrophorèse en champs pulsés avec le système CHEF DRIII (BioRad, France) à 14°C dans un champ électrique de 6,6 V.cm<sup>-1</sup>. Pour séparer les fragments générés par *Sma*I, les conditions électrophorétiques sont les suivantes : 22 heures avec des temps de pulse de 15 à 45 secondes suivi de 2 heures avec des temps de pulse de 2 à 8 secondes. Dans le cas de la digestion avec l'enzyme *Kpn*I, l'électrophorèse dure 24 heures avec des temps de pulse de 2 à 25 secondes.

### 2.3.3. Capture des images et analyse des profils

Les profils d'ADN sont visualisés par une coloration fluorescente en immergeant les gels dans une solution de bromure d'éthidium à 0,3 µg.ml<sup>-1</sup> pendant 1h pour les électrophorèses en champs pulsés. Après une décoloration rapide, les profils sont révélés sous une lumière ultraviolette (602 nm). Les images des gels sont capturées par un système numérique (gelDOC 1000, BioRad, France). L'estimation de la taille des fragments et l'analyse des similarités ont été effectuées en utilisant le logiciel Molecular Analyst software Fingerprinting (BioRad, France). Les similarités entre les profils, basées sur la position des fragments restreints sont calculées à l'aide du coefficient de Dice avec une tolérance maximale de 1% (Struelens, 1996). Des dendrogrammes ont été construits suivant la méthode Unweight Pair Group Method (UPGMA) utilisant une moyenne arithmétique (Struelens, 1996).

## 2.4. Analyses Statistiques :

Les données sont regroupées dans des tables (**Microsoft Access**). Les informations relatives aux pratiques d'élevage et d'abattage sont soumises à une Analyse factorielle des Correspondances Multiples (AFCM) couplée à une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) afin de déterminer des catégories de pratiques (**Winstat**).

Ensuite, il est procédé à une évaluation de l'impact de ces pratiques sur le statut sanitaire des élevages et sur la contamination des carcasses par une analyse de variance (log à base 10 de FAMT, CT et STAPH) et par un test du Khi 2 (*Salmonella* et *Campylobacter*) (**SPSS**).

### 3. RESULTATS :

#### 3.1. Evaluation du Statut sanitaire de la Production Avicole

Le statut sanitaire de la production avicole sénégalaise a été évaluée depuis les couvoirs jusqu'à l'abattage.

##### 3.1.1. Couvoirs :

Dans les couvoirs, la présence de salmonelle n'a pu être mise en évidence que dans un lot de 10 poussins provenant de la même éclosion. Le sérotypage a permis de conclure qu'il s'agissait de *Salmonella* Enteritidis.

##### 3.1.2. Elevages :

###### 3.1.2.1. Pratiques d'élevage :

Concernant les élevages, quatre catégories de pratiques d'élevage relatives à l'application des règles hygiéniques ont été mises en évidence :

La première catégorie (21%) est constituée d'éleveurs peu rigoureux; possédant des poulaillers sans litière épaisse, conservant des oiseaux malades dans le poulailler et des animaux domestiques au sein de l'exploitation, n'employant pas de personnel spécifique et recevant souvent la visite d'autres éleveurs.

La deuxième catégorie (29%) regroupe les éleveurs compétents appliquant des opérations de décontamination rigoureuses, employant du personnel rattaché spécifiquement à un poulailler et portant une tenue spécifique sur leur lieu de travail, entretenant régulièrement leur matériel (mangeoires et abreuvoirs), utilisant l'eau du réseau public pour leurs animaux, se débarrassant systématiquement des individus malades et menant une lutte permanente contre les rongeurs.

La troisième catégorie (15%) correspond aux éleveurs dont les pratiques sont les plus mauvaises : ils cumulent les erreurs de la première catégorie, effectuent des opérations de décontamination insuffisantes, ne luttent pas contre les rongeurs, entretiennent mal leur matériel (abreuvoirs) au cours de la bande et ne changent pas la litière lorsque que celle-ci est humide.

La quatrième catégorie (31%) rassemble des éleveurs acceptables, interdisant l'accès aux poulaillers aux autres éleveurs, bannissant la présence d'animaux domestiques dans l'exploitation, entretenant régulièrement la litière des poulaillers mais commettant encore des erreurs techniques : opérations de décontamination médiocres, utilisation de mangeoires longitudinales, personnel non spécifique d'un poulailler, sans tenue de travail spécifique.

###### 3.1.2.2. Statut Microbiologique des élevages

L'analyse des fientes, reflet du statut microbiologique des élevages, a permis de mettre en évidence *Salmonella* dans 10 prélèvements (28.5%) et *Campylobacter* dans 27 prélèvements (77 %).

##### 3.1.3. Tueries :

###### 3.1.3.1. Pratiques d'abattage

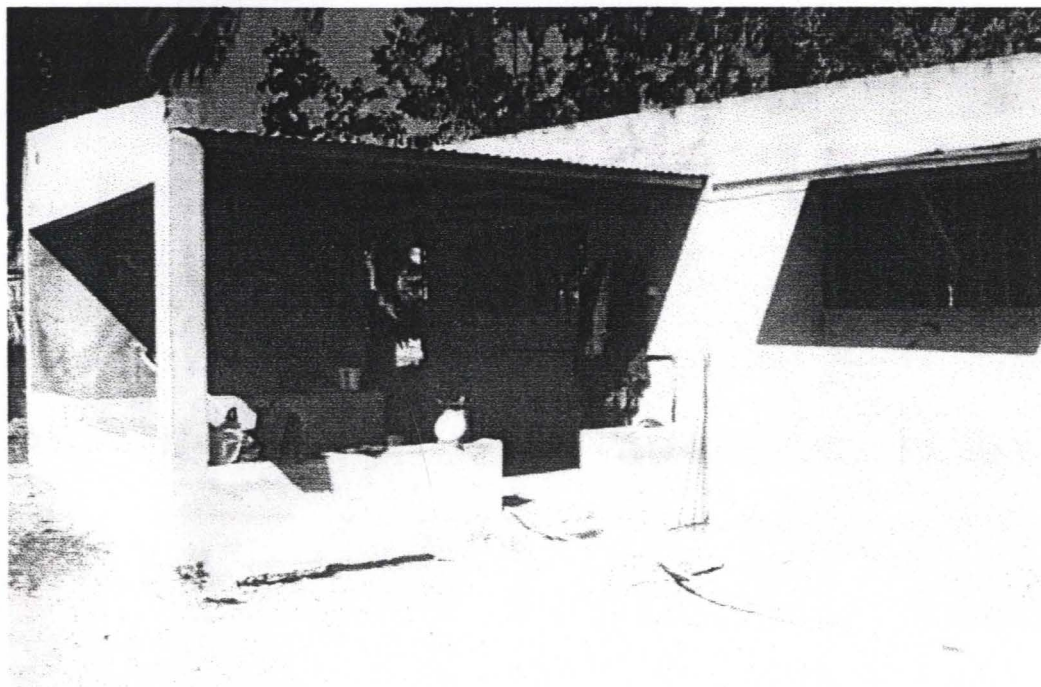
Concernant les tueries d'élevages et de marchés, la combinaison de l'AFCM et de la CAH a permis de mettre en évidence 3 catégories de pratiques d'abattage :

La première catégorie (50%) regroupe les tueries où les abattages se déroulent à sec (pas d'échaudage ni de lavage) et dans des conditions d'hygiène médiocres : pas de mise à jeun des animaux, pas d'éviscération soignée, entreposage des carcasses sur des bâches à la finition, pas de salle d'abattage spécifique ou abattage à l'extérieur, pas de nettoyage de la surface d'abattage.





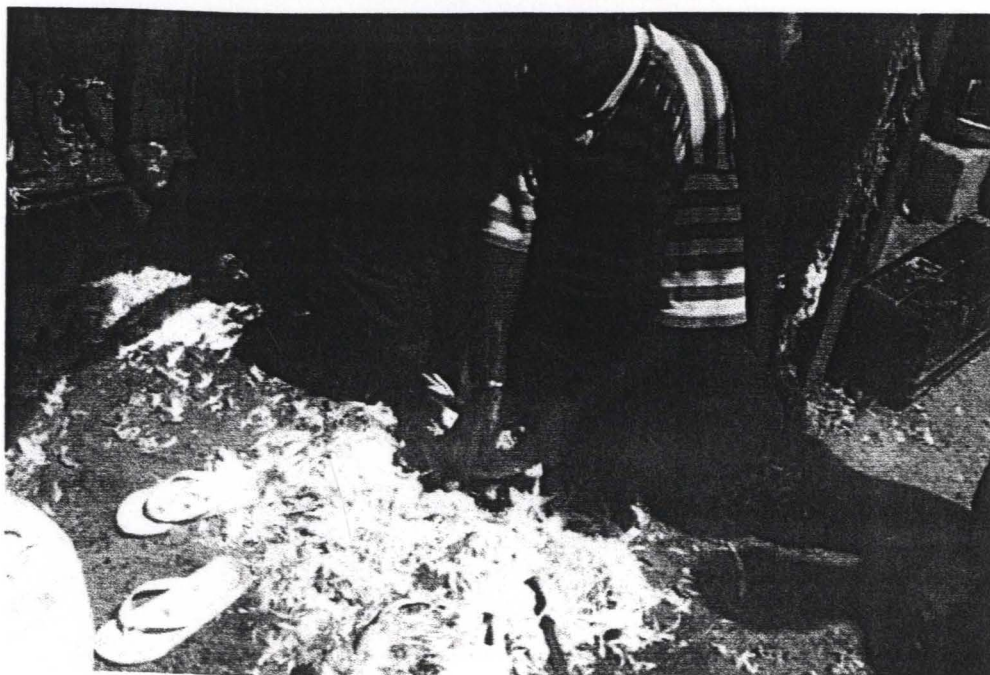
**Figure 1** : Environnement d'un poulailler de la catégorie 3



**Figure 2** : Environnement d'un poulailler de la catégorie 2



**Figure 3 : Abattage Humide (Catégorie 3) dans un élevage de Keur Massar**



**Figure 4 : Plumaison à sec (Catégorie 1) dans un marché de Dakar**

La deuxième catégorie (7%) représente les tueries de bonne qualité hygiénique : respect du principe de marche en avant lors des opérations d'abattage ; nettoyage et désinfection systématique après abattage, personnel spécifique d'une opération portant une tenue spécifique, saignée verticale, couteau régulièrement nettoyé et désinfecté en cours de travail. Quelques unes de ces tueries possèdent des plumeuses mécaniques.

La troisième catégorie (43%) rassemble les tueries où les abattages se déroulent en ambiance humide (échaudage, rinçage après plumaison, lavage à la finition) et dans des conditions d'hygiène médiocres similaires à la première catégorie.

### 3.1.3.2. Statut Microbiologique des carcasses

L'analyse des carcasses a permis de déterminer leur statut microbiologique vis à vis des indicateurs d'hygiène, de *Salmonella* et de *Campylobacter*. Les contaminations de la peau et du muscle des carcasses par la flore aérobie mésophile totale, les coliformes thermotolérants et les staphylocoques coagulase positifs (exprimées en log<sub>10</sub> UFC par gramme) sont présentées dans la figure 5. Les contaminations de la peau sont globalement plus importantes que celles du muscle.

La recherche de *Salmonella* s'est révélée positive sur 65 carcasses (22%) : 41 isolats de *Salmonella* ont été retrouvés sur la peau (14%) et 32 dans le muscle (11%). La liste des sérotypes identifiés est présentée sur le tableau I. Les sérotypes S. Brancaster et S. Glostrup représentent plus de 50% des isolats.

*Campylobacter* a été isolé sur 255 carcasses (88%) : sur les 76 tueries visitées, cette bactérie n'a pu être mise en évidence sur les carcasses issues de 6 tueries d'élevages et de 3 tueries de marchés.

### 3.1.4. Impact des Pratiques d'élevage et d'abattage :

L'impact des pratiques d'élevage sur le statut microbiologique des élevages et donc sur la contamination des animaux a été établi par l'analyse statistique. Le test du Khi 2 a permis de montrer des relations significatives entre les pratiques d'élevage et la présence de *Salmonella* ( $p < 0.05$ ) et de *Campylobacter* ( $p < 0.05$ ) dans l'élevage. Les fientes des élevages des catégories 2 et 4 sont moins contaminées par *Salmonella* ( $p < 0.05$ ) que celles des élevages des catégories 1 et 3 (21% contre 50%).

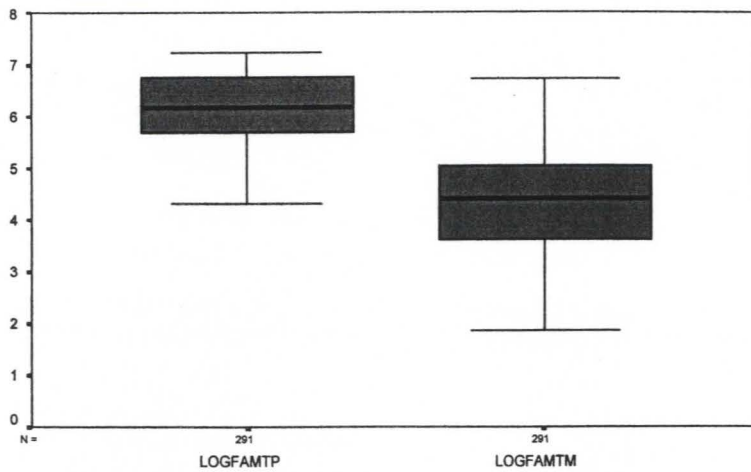
L'analyse de variance a permis de montrer un impact significatif des pratiques d'abattage sur la contamination de la carcasse par les flores indicatrices d'hygiène (figures 6, 7 et 8) : les carcasses de la catégorie 2 sont significativement moins contaminées que celles de la catégorie 1 ; ces dernières sont elles-mêmes significativement moins contaminées que celles de la catégorie 3 ( $p < 0.0001$ ). De même, le test du Khi 2 a montré une relation significative entre la contamination des carcasses par *Salmonella* et la catégorie d'abattage ( $p < 0.05$ ) ainsi que le type d'abattage (humide ou sec : 55% contre 42% des lots contaminés) ( $p < 0.05$ ). La contamination par *Salmonella* est moins importante pour les carcasses issues de la catégorie 2 (25% des lots) que pour celles de la catégorie 1 (42% des lots) ( $p < 0.05$ ) ; les carcasses de la catégorie 1 sont moins contaminées par *Salmonella* que celles de la catégorie 3 (59% des lots) ( $p < 0.05$ ).

## 3.2. Analyse de la diversité des *Campylobacter* :

### 3.2.1. Identification par PCR :

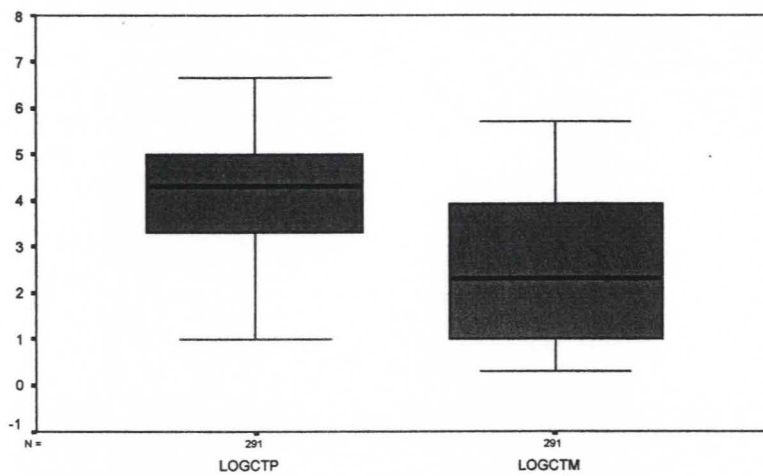
126 isolats de *Campylobacter* ont été analysés par PCR Multiplex (figure 9) afin de déterminer leur espèce (Denis *et al.*, 1999) et confirmer les résultats des tests biochimiques. 59 % des isolats appartiennent à l'espèce *Campylobacter jejuni* et 41% à l'espèce *Campylobacter coli*. Les isolats issus des carcasses de tueries d'élevage et des fientes prélevées en élevage sont constitués de 57%

Contamination  
(log UFC/g)



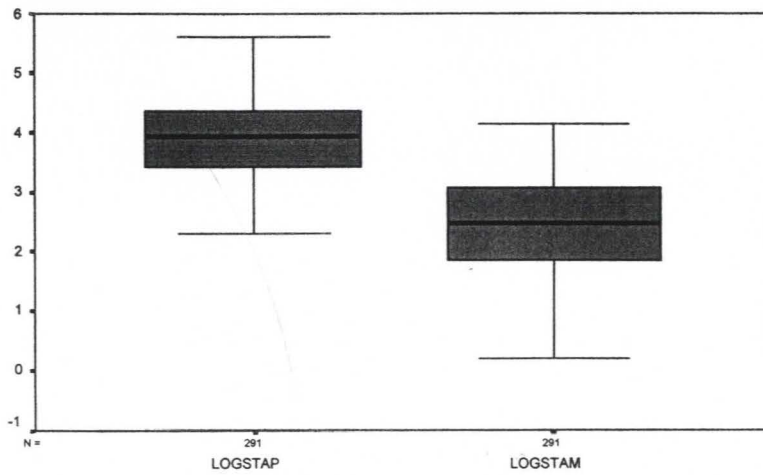
**FAMT de la Peau et du Muscle**

Contamination  
(log UFC/g)



**CT de la Peau et du Muscle**

Contamination  
(log UFC/g)

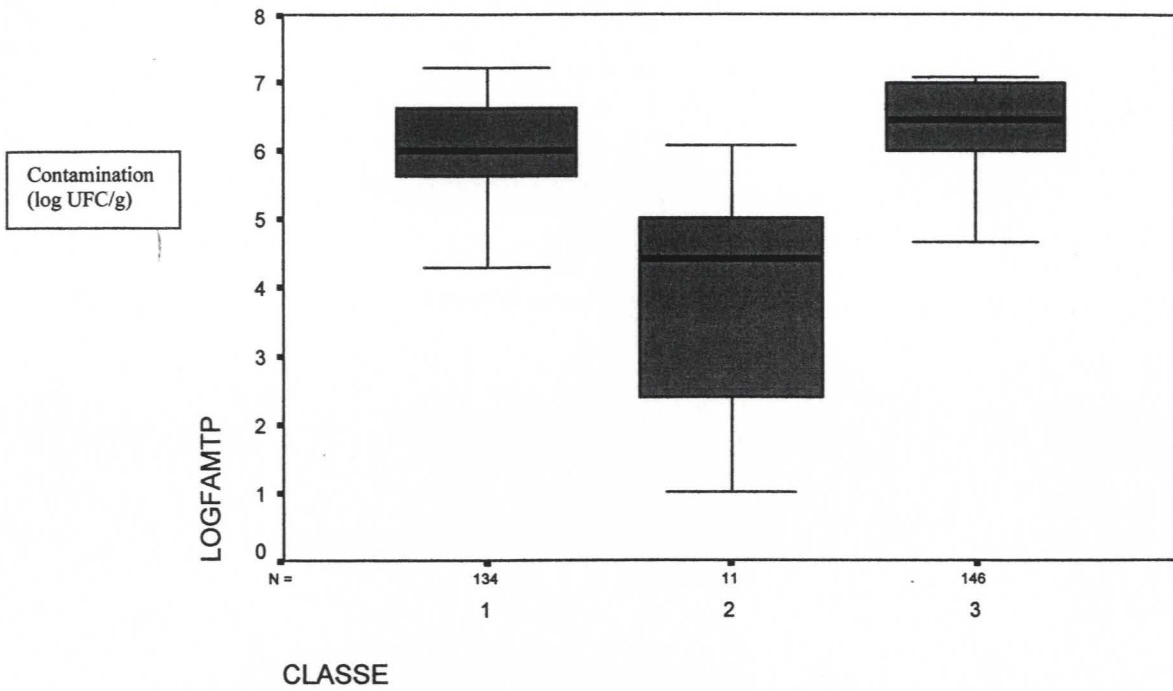


**STAPH de la Peau et du Muscle**

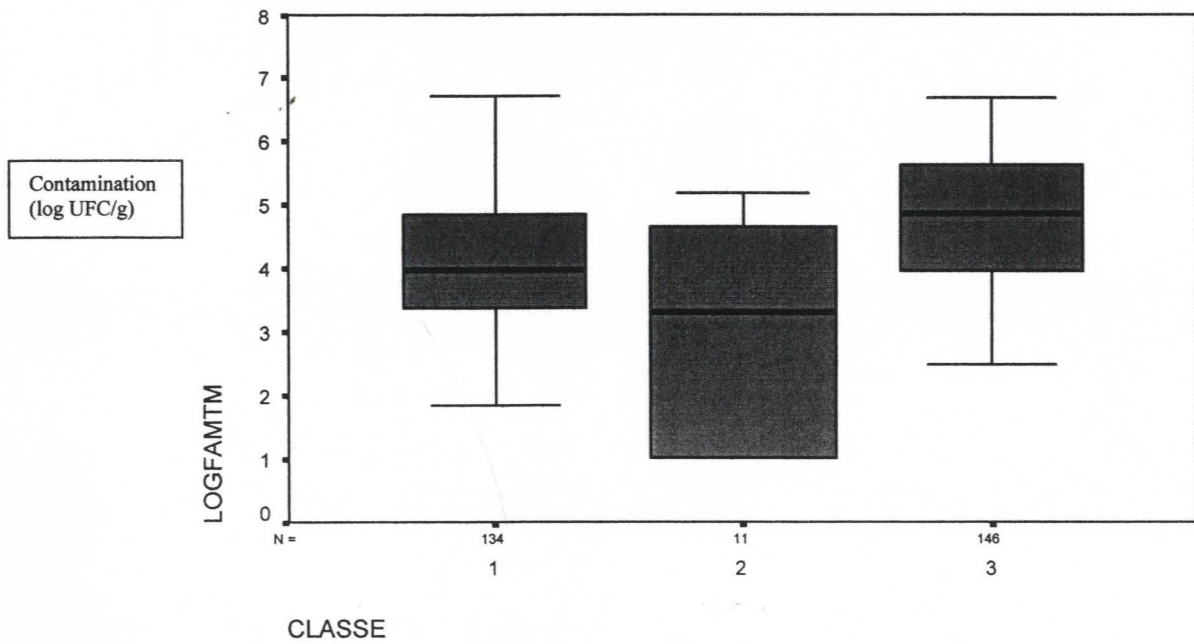
**Figure 5 : Contaminations des carcasses par les flores indicatrices d'hygiène** (Flore aérobie mésophile totale, Coliformes thermotolérants et Staphylocoques coagulase positifs). Les représentations sont des boîtes à moustache qui indiquent les traits marquants de la série de données observées : la médiane (milieu de la série) est indiquée par le trait noir et les extrémités du cadre rouge sont les écarts interquartiles (25% et 75%) et rendent compte de la dispersion. N correspond à l'effectif total de carcasses analysées

**Tableau I :** Sérotypes de Salmonelles isolés dans les prélèvements de peau et de muscle de carcasse de volaille

Sérovars	Prélèvement de Peau	Prélèvement de Muscle	Total
<i>S. O4B</i>	2		2
<i>S. 0 : 3-1(E1)</i>	1		1
<i>S. Magherafelt</i>	1		1
<i>S. Glostrup</i>	12	6	18
<i>S. Agona</i>	5	6	11
<i>S. California</i>		1	1
<i>S. OMC</i>		2	2
<i>S. Brancaster</i>	13	5	18
<i>S. Wernigerode</i>		1	1
<i>S. Stanleyville</i>		1	1
<i>S. Istanbul</i>	1		1
<i>S. Cyprus</i>		1	1
<i>S. Chailey</i>	1		1
<i>S. Tshiongwe</i>		1	1
<i>S. Ruzizi</i>	1		1
<i>S. Albany</i>	2	3	5
<i>S. Duisburg</i>	1		1
<i>S. Kentucky</i>		1	1
<i>S. Dabou</i>	1	1	2

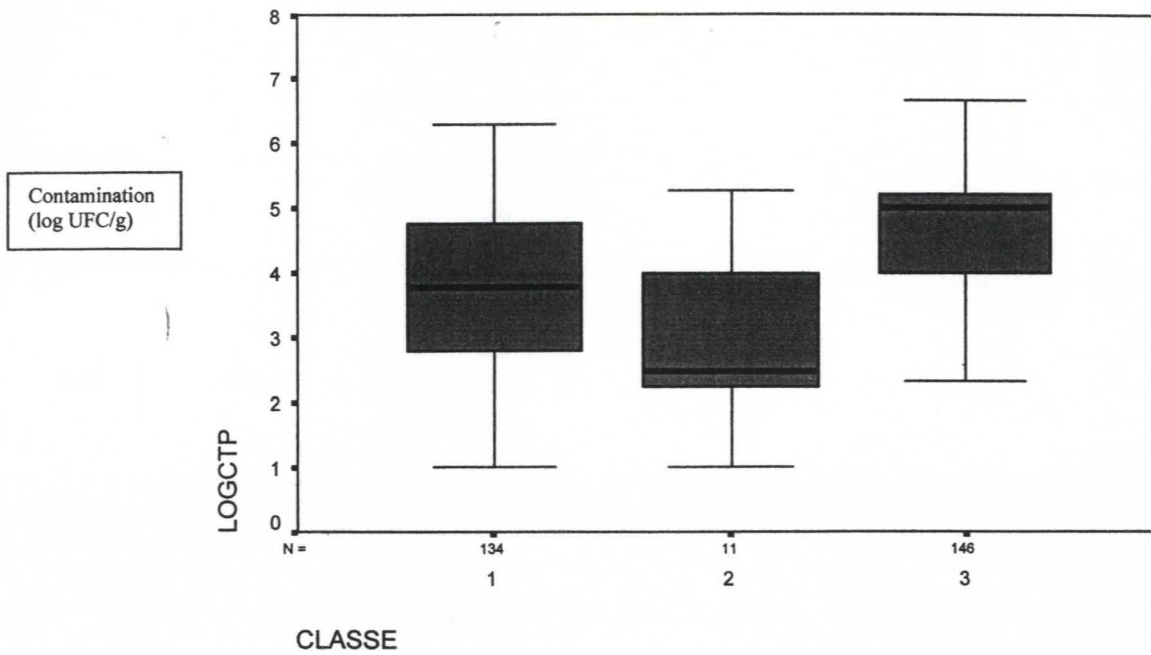


**Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination de la peau par la FAMT**

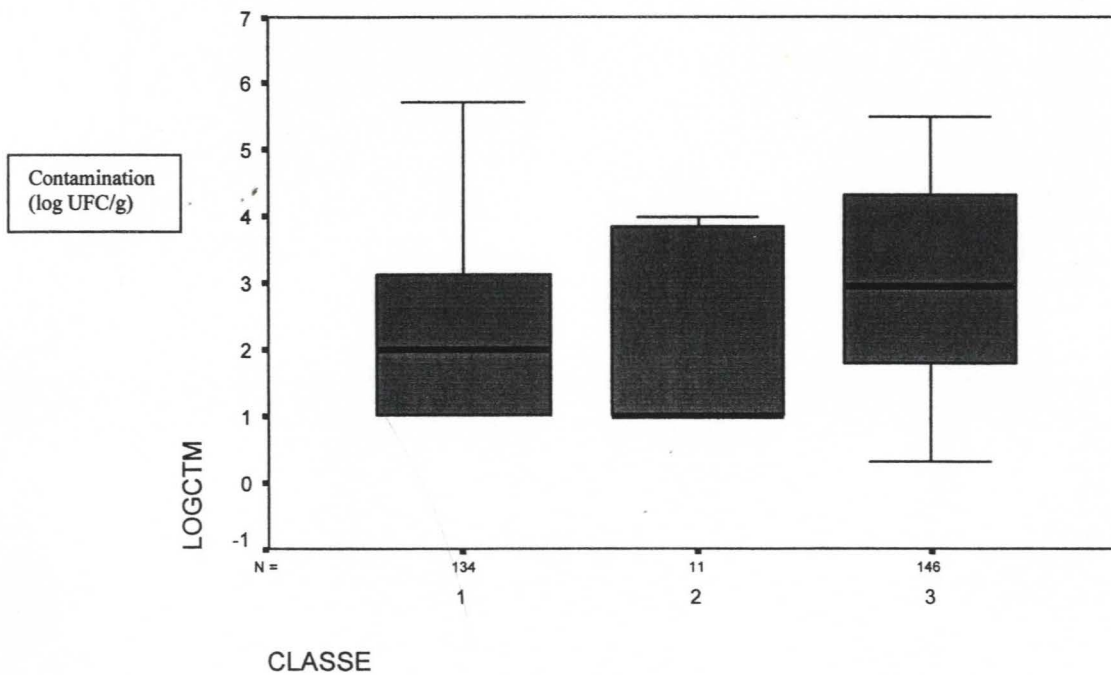


**Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination du muscle par la FAMT**

**Figure 6 : Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination des carcasses par la flore aérobie mésophile totale. les représentations sont des boîtes à moustache ; la médiane est indiquée par le trait noir et les extrémités du cadre rouge sont les écarts interquartiles (25% et 75%). N correspond aux effectifs de carcasses analysées par classe d'abattage.**

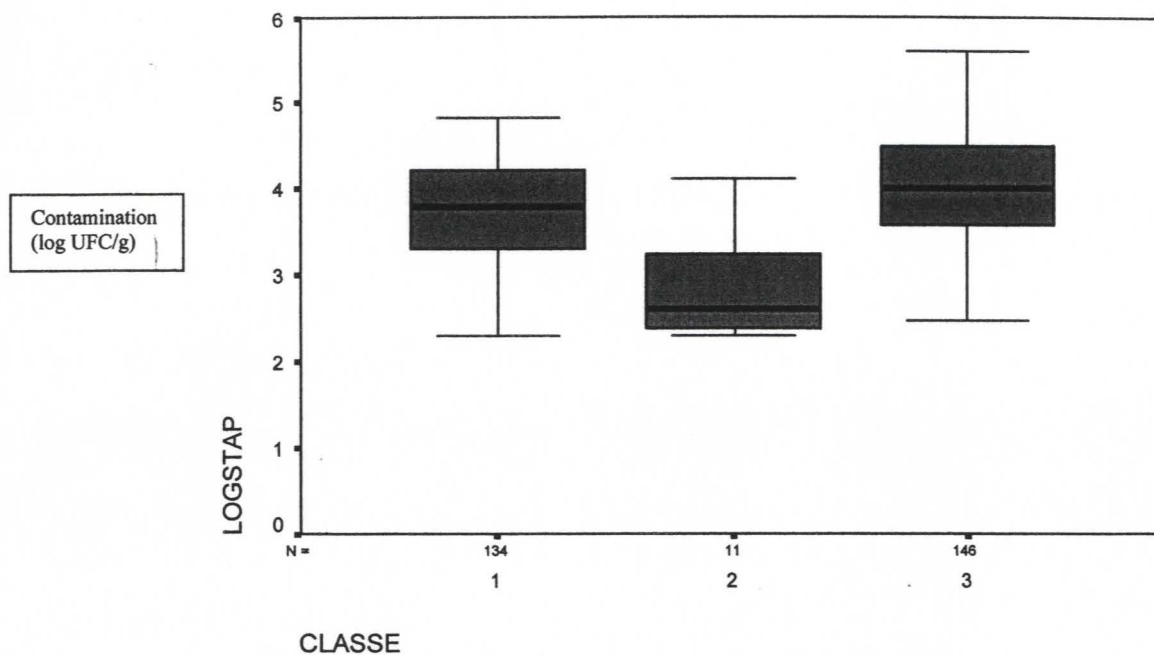


**Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination de la peau par les CT**

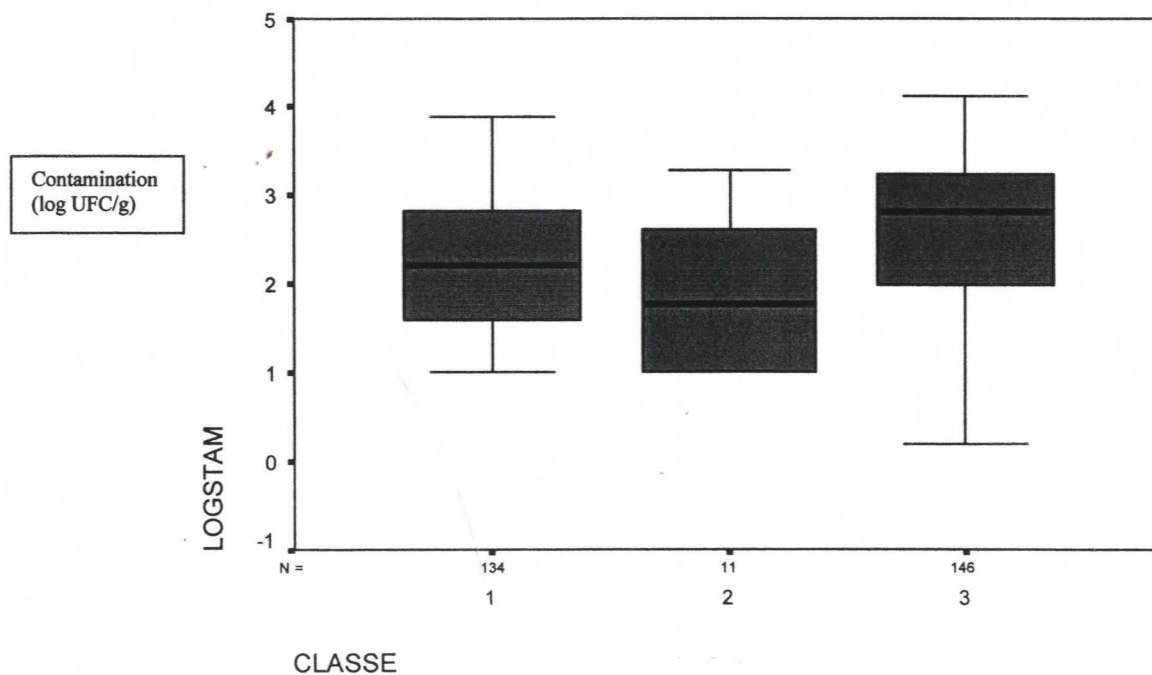


**Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination du muscle par les CT**

**Figure 7 : Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination des carcasses par les coliformes thermotolérants.** les représentations sont des boîtes à moustache ; la médiane est indiquée par le trait noir et les extrémités du cadre rouge sont les écarts interquartiles (25% et 75%). N correspond aux effectifs de carcasses analysées par classe d'abattage.



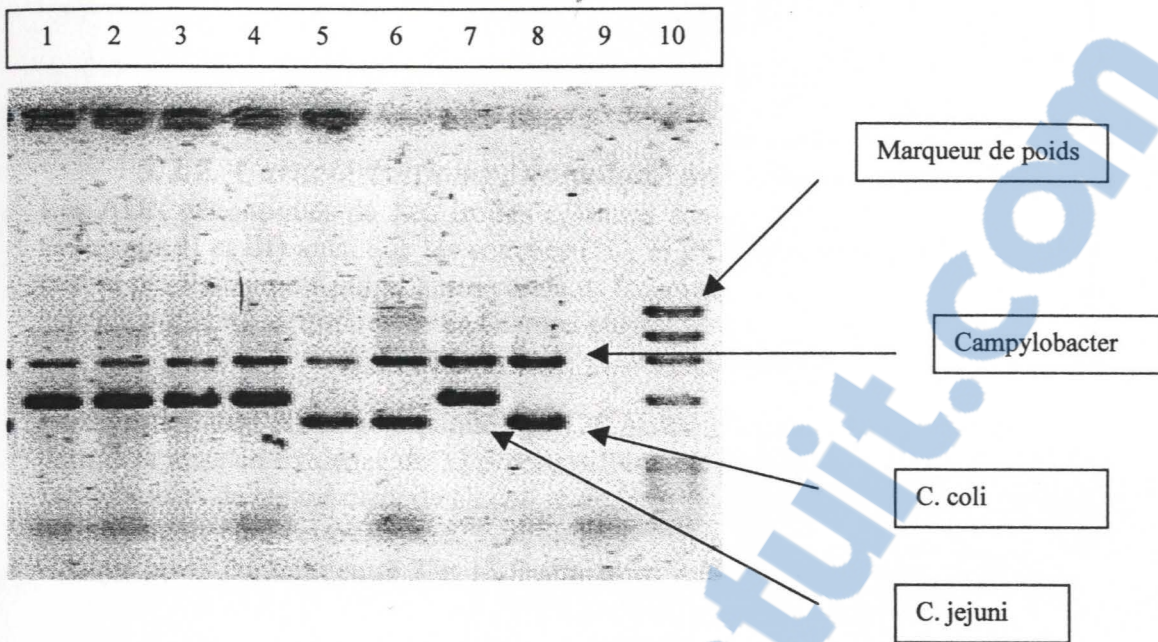
**Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination de la peau par les STAPH**



**Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination du muscle par les STAPH**

**Figure 8 : Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination des carcasses par les staphylocoques coagulase positifs.** les représentations sont des boîtes à moustache ; la médiane est indiquée par le trait noir et les extrémités du cadre rouge sont les écarts interquartiles (25% et 75%). N correspond aux effectifs de carcasses analysées par classe d'abattage.





**Figure 9 : Identification d'isolats de *Campylobacter* par PCR (Denis *et al.*, 1999)**

Les puits 1 à 6 correspondent à des isolats de *Campylobacter* récoltés au cours de ce travail. Les pistes 7, 8, 9 et 10 correspondent respectivement à une souche de *C. jejuni*, une souche de *C. coli*, un témoin négatif et au marqueur de poids moléculaire.

de *Campylobacter jejuni* et 43% de *Campylobacter coli*. Les isolats issus des carcasses de tueries de marché sont constitués de 43% de *Campylobacter jejuni* et de 57% de *Campylobacter coli*.

### 3.2.2. Caractérisation génotypique par Macrorestriction :

Les ADN génomiques de 126 isolats collectés sur les carcasses de volailles et dans les fientes (Tableaux II et III) ainsi que les souches (UA et BOF) ont été digérés par l'enzyme *SmaI*, d'une part et par l'enzyme *KpnI*, d'autre part. Les fragments d'ADN générés ont, dans les deux cas, été séparés par une électrophorèse en champs pulsés.

#### 3.2.2.1. Caractérisation par macrorestriction avec l'enzyme *SmaI*

La digestion de l'ADN génomique des 128 isolats de *Campylobacter* spp. par l'enzyme *SmaI* a permis la mise en évidence de 33 profils différents représentés schématiquement sur la figure 10. Les génomes de trois isolats de *C. coli* et de trois isolats de *C. jejuni* (dont la souche BOF), n'ont pu être digérés par cette enzyme.

Chaque profil contient entre 7 et 13 fragments d'ADN de tailles comprises entre 45 kb et 590 kb. Leur analyse par le logiciel Molecular Analyst a permis la construction d'un dendrogramme (figure 10). Ce dendrogramme montre les relations entre les différents profils et distingue les profils de *C. coli* et de *C. jejuni*. Certains profils ne présentent que quelques fragments d'ADN de différence et les taux de similarités calculés sont alors très élevés. Entre 80 et 99 % de similarité, deux isolats présentant des profils différents sont proches. Les profils présentant de telles similarités ont été regroupés en groupes de similarité répertoriés dans le tableau IV.

Pour les isolats de *C. coli*, il existe 5 groupes de similarité (Cs1 à Cs5) regroupant 84 % des isolats de *C. coli* typables et ne variant entre eux que par la taille d'un fragment ou par la présence d'un ou deux fragments supplémentaires (figure 10; tableau IV). Les 4 autres profils de *C. coli* caractérisés ne montrent aucune similarité particulière entre eux ou avec les autres profils rassemblés en groupe de similarité.

Les groupes de similarité cs1 et cs5 rassemblent respectivement 23.2% et 21.5% des isolats de *C. coli*. La différence entre les profils est due à la présence d'un fragment d'ADN. (Tableau IV)

Les trois autres groupes de similarité rassemblent entre 12.5% et 14.2% des isolats de *C. coli*.

Pour les isolats de *C. jejuni*, seul un groupe de similarité regroupant 9.5% des isolats typables a pu être constitué. Les 15 autres profils mis en évidence par les isolats de *C. jejuni* sont indépendants les uns des autres (figure 10).

#### 3.2.2.2. Caractérisation par macrorestriction avec l'enzyme *KpnI*

Les ADN de 3 isolats de *C. jejuni* (dont la souche BOF) et de 3 isolats de *C. coli* se sont révélés réfractaires à la digestion par l'enzyme *KpnI*, et non donc pas pu être typés par cette technique. Un total de 35 profils distincts (les profils K28 et K32 n'existent pas) a été mis en évidence parmi les 122 isolats caractérisés. (Figure 11). Chaque profil contient entre 8 et 14 fragments d'ADN de taille comprise entre 40 et 430 kb.

L'analyse des similarités entre les profils par le logiciel Molecular Analyst ne permet pas de distinguer les profils de *C. coli* et les profils de *C. jejuni*, comme c'était le cas avec l'enzyme *SmaI*. Cependant, plusieurs profils présentent des similarités importantes et des groupes ont été déterminés au sein de chaque espèce. Ces groupes de similarité sont répertoriés dans le tableau V.

Au sein des isolats de *C. coli*, il existe 5 groupes de similarité, appelés ck1 à ck5 (tableau V). le groupe ck3 représente 17.6% des isolats typables de *C. coli* (Tableau II). Les autres groupes de

**Tableau II : Résultats de la caractérisation des isolats de *C. coli* par macrorestriction.**

<i>Profil Sma I</i>	<i>Profil Kpn I</i>	Nombre d'isolats	Origine	Type de prélèvement
1	1	8	Elevage 51 (L Diouf 1)	1 Carcasse
			Elevage 53 (L Diouf 3)	1 Fiente
			Elevage 55 (L Diouf 4)	1 Carcasse
			Elevage 56 (L Diouf 5)	1 Fiente
			Elevage 70 (L. Diouf 6)	3 carcasses
			Marché Sandaga 47	1 Carcasse
8	9	1	Marché Roukjine 46	1 Carcasse
10	11	4	Marché Sandinieri 44	1 Carcasse
			Elevage (A Kane)	1 Carcasse
			Elevage (C Sarr)	2 Carcasses
11	14	6	Marché Sandinieri 61	1 Carcasse
			Marché Tylène 63	3 Carcasses
			Elevage (Mezzo)	1 Carcasse
			Elevage (EISMV)	1 Carcasse
14	13	2	Marché Castor 62	1 Carcasse
			Elevage (J Petit)	1 Carcasse
15	15	2	Elevage (M Ndiaye)	2 Carcasses
17	17	5	Elevage (I Samb)	1 Carcasse
			Elevage (A Kane)	2 Carcasses
			Elevage (C Sarr)	1 Carcasses
			Elevage (M Diaw)	1 Fiente
18	18	6	Elevage (L Diouf 2)	3 Carcasses ; 1 Fiente
			Elevage (L Diouf 3)	1 Carcasse
19	18	1	Elevage (L Diouf 3)	1 Carcasse
22	22	4	Elevage (I Samb)	1 Fiente
			Marché Castor 58	1 Carcasse
			Elevage (A Kane)	1 Fiente
			Elevage (C Sarr)	1 Fiente
23	23	2	Elevage (J Petit)	1 Carcasse
			Elevage (Sodavi)	1 Fiente
25	25	1	Elevage (M Ndiaye)	1 Carcasse
27	27	7	Marché Castor 40	1 Carcasse
			Marché Castor 41	1 Carcasse
			Marché Castor 42	3 Carcasses
			Marché Colobane 43	2 Carcasses
28	22	1	Elevage (M Diallo)	1 Fiente
29	29	1	Marché Colobane 43	1 Carcasse
30	30	4	Elevage (L Diouf 4)	1 Fiente
			Elevage (A Dieye)	3 Carcasses; 1 Fiente
31	31	2	Elevage (M Mbengue)	2 Carcasses

**Tableau III : Résultats de la caractérisation des isolats de *C. jejuni* par macrorestriction.**

<i>Profil Sma I</i>	<i>Profil Kpn I</i>	Nombre d'isolats	Origine	Type de prélèvement
2	2	4	Marché Sandaga 47 Elevage (W Diop)	1 Carcasse 3 Carcasses
3	3	4	Marché Sandinieri 61 Elevage (C Sonkho)	2 Carcasses 2 Carcasses
3	4	4	Marché Tylène 45 Elevage (EISMV)	2 Carcasses 2 Carcasses
3	21	3	Marché Castor 40 Elevage (C Sarr)	1 Carcasse 1 Carcasse ; 1 Fiente
4	5	6	Elevage (C Diop) Elevage (M Diaw)	3 Carcasses 3 Carcasses
5	6	4	Elevage (M Sene) Elevage (M Diallo)	3 Carcasses 1 Carcasse
6	7	2	Elevage (M Diallo)	2 Carcasses
7	8	3	Elevage (O Faye)	3 Carcasses
9	10	9	Marché Roukjine 46 Elevage (Niang et Kone) Elevage (I Sabary)	2 Carcasses 3 Carcasses 3 Carcasses ; 1 Fiente
12	12	3	Marché Castor 62 Elevage (J Petit)	1 Carcasse 1 Carcasse ; 1 Fiente
16	16	4	Marché Sandinieri 44 Elevage (M toure)	1 Carcasse 3 Carcasses
20	19	3	Marché Sandaga 47 Elevage (AG Ndiaye)	1 Carcasse 2 Carcasses
21	20	3	Elevage (L Diouf 4) Elevage (L Diouf 5)	1 Carcasse 2 Carcasses
24	24	1	Elevage (Mezzo)	1 Carcasse
26	26	2	Marché Castor 41	2 Carcasses
32	33	1	Elevage (M Gueye)	1 Carcasse
33	34	6	Elevage (F Diokh) Elevage (I Gaye)	3 Carcasses 3 Carcasses
34	36	1	Elevage (F Diokh)	1 Fiente

NB : la souche de profil s13 n'a pas été mentionnée car le profil Kpn I n'a pu être déterminé

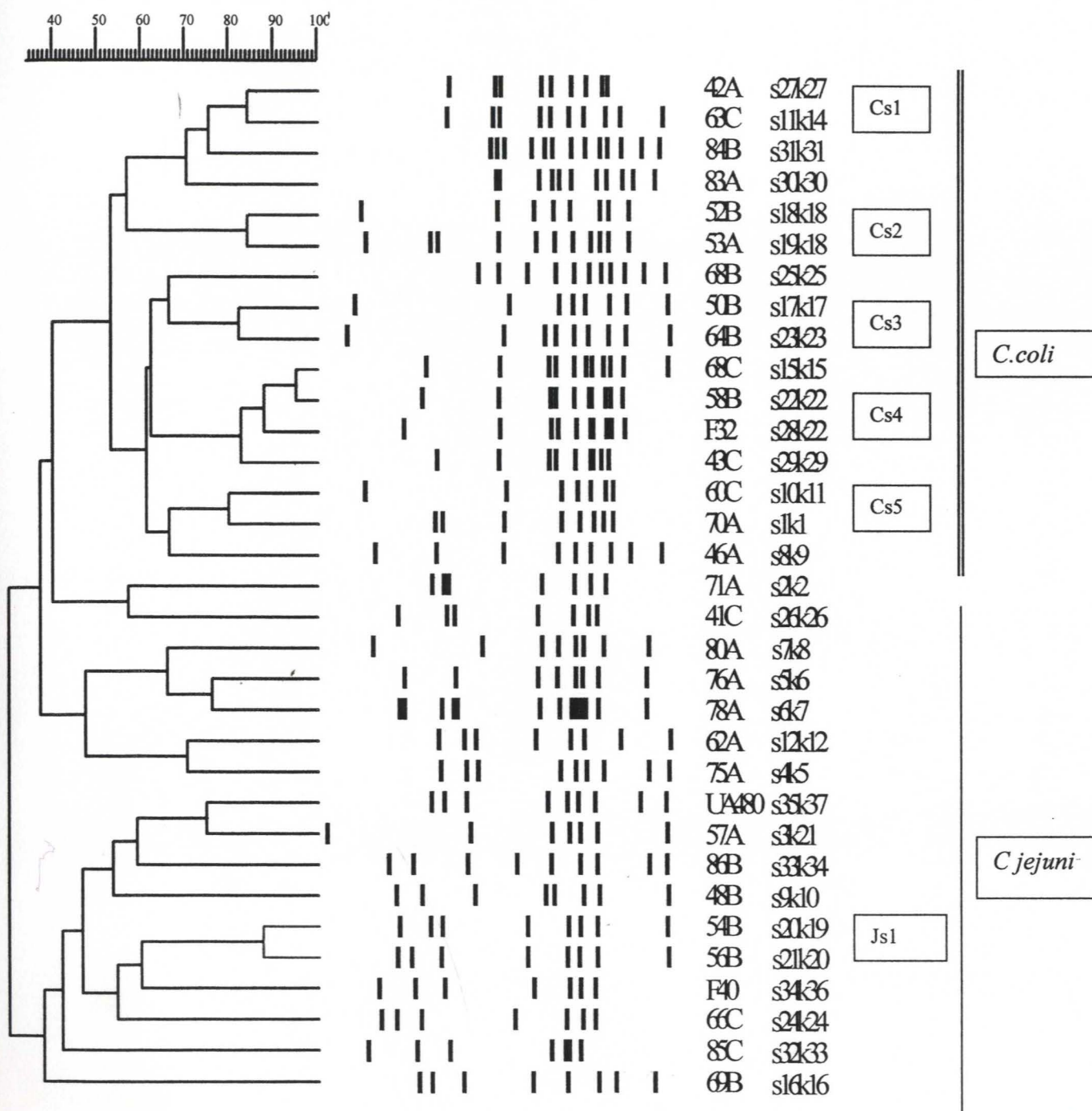
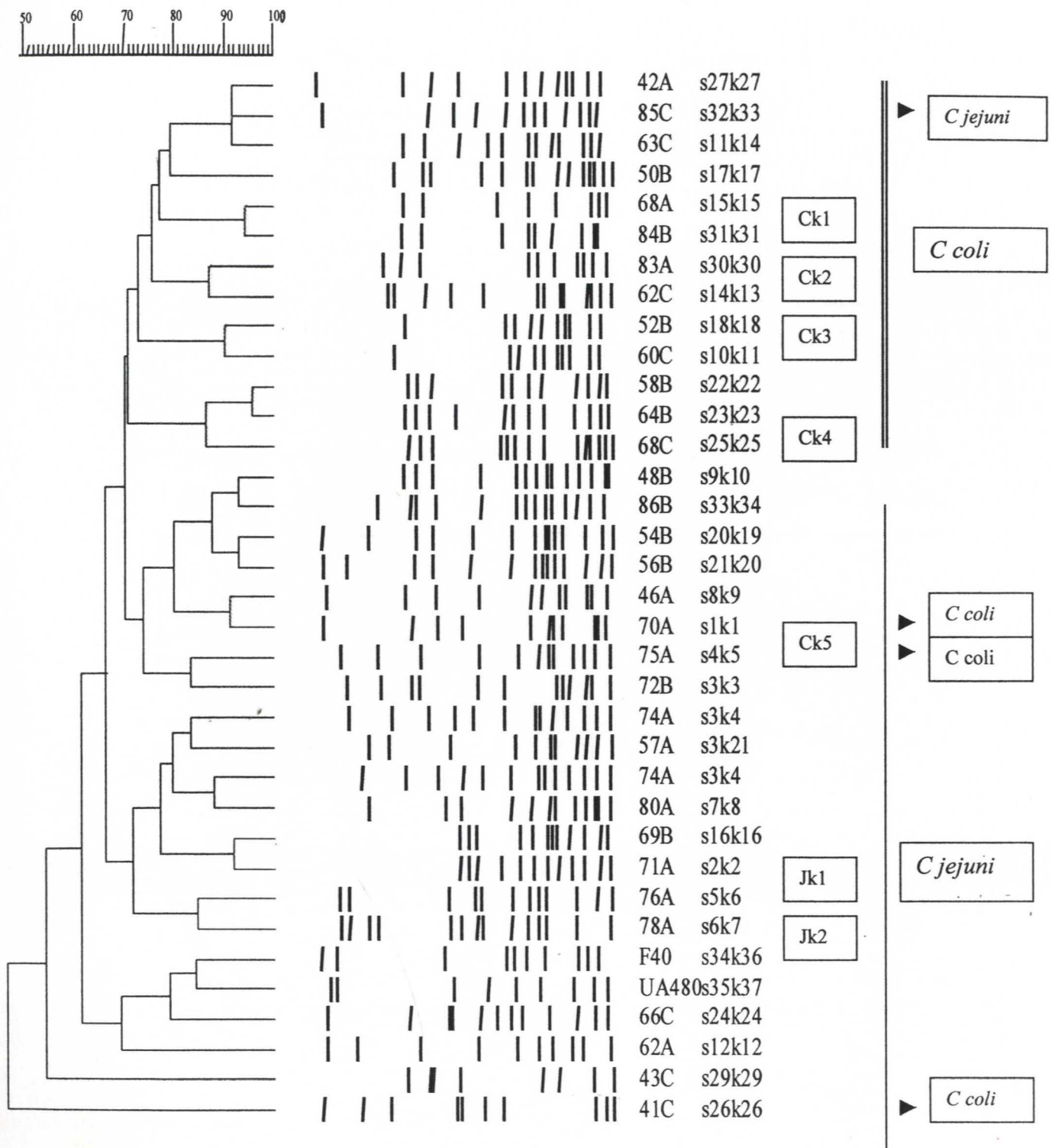


Figure 10 : Représentation schématique des 33 profils obtenus par macrorestriction de l'ADN génomique des isolats de *Campylobacter* spp. par l'enzyme *Sma*I. Les similitudes entre les profils ont été estimées par le coefficient de Dice, avec une tolérance sur la position des bandes de 1 %. Les profils ont été regroupés selon la méthode « Unweighted Pair Group linkage Analysis Method » (UPGMA).



**Figure 11: Représentation schématique des 35 profils obtenus par macrorestriction de l'ADN génomique des isolats de *Campylobacter* spp. par l'enzyme *KpnI*. Les similitudes entre les profils ont été estimées par le coefficient de Dice, avec une tolérance sur la position des bandes de 1 %. Les profils ont été regroupés selon la méthode « Unweighted Pair Group linkage Analysis Method » (UPGMA).**

**Tableau IV :** Composition des groupes de similarité définis pour la macrorestriction avec l'enzyme *SmaI*, pourcentage d'isolats et différences observées.

Espèce	Profils concernés	% d'isolats	Différences observées
<i>C. coli</i>	Cs1	S27, S11	23.2 un fragment de 50 kb
	Cs2	S18, S19	12.5 trois fragments d'ADN (380 kb, 375 kb, 145 kb)
	Cs3	S17, S23	12.5 un fragment de 195 kb
	Cs4	S15, S22, S28, S29	14.2 un fragment de 50kb taille d'un fragment (380 kb, 430 kb, 340 kb)
	Cs5	S1, S10	21.5 un fragment de 350kb taille d'un fragment (450 kb, 370 kb)
<i>C. jejuni</i>	Js1	S20, S21	9.5 taille d'un fragment (430 kb, 380 kb)

**Tableau V:** Composition des groupes de similarité définis (avec au moins 80 % de similarité entre les profils) pour la macrorestriction avec l'enzyme *KpnI*, pourcentage d'isolats et différences observées.

Espèce	Groupe de Similarité	Profils concernés	% d'isolats	Différences observées
<i>C. coli</i>	Ck1	K15, K31	6.2	Un fragment (85 Kb)
	Ck2	K30, K13	10.6	trois fragments (160 kb, 125kb)
	Ck3	K18, K11	17.6	Taille d'un fragment (190 kb, 220 kb)
	Ck4	K22, K25	8.7	Un fragment (15 kb) Deux fragments (50 kb, 70kb)
	Ck5	K9, K1	15.8	Taille de trois fragments
<i>C. jejuni</i>	Jk1	K16, K2	12.7	Taille d'un fragment (115 kb)
	Jk2	K6, K7	9.5	Deux fragments

similarité représentent 15.8% (ck5), 10.6% (ck2), 10.6% (ck4) et 65.2% (ck1) des isolats typables de *C. coli*. Un groupe ne présente aucune similarité avec les autres.

Au sein des isolats de *C. jejuni*, 4 profils ont été regroupés en 2 groupes de similarité, appelés jk1 et jk2 et répertoriés dans le tableau V. Quatorze profils mis en évidence par les *C. jejuni* sont indépendants les uns des autres (figure 11). Aucune similarité particulière n'a pu être mise en évidence entre eux ou avec des profils rassemblés en groupes de similarité.

Les groupes jk1 et jk2 représentent respectivement 12.7% et 9.5% des isolats typables de *C. jejuni*. (tableau V).

### 3.2.2.3. *Analyse des génotypes obtenus par combinaison des deux techniques de macrorestriction*

La combinaison des deux techniques de digestion par *SmaI* et *KpnI* permet de définir 34 génotypes dont 16 correspondent à l'espèce *C. coli* (le profil S14K13 est absent du dendrogramme) et 18 à l'espèce *C. jejuni* (figure 12).

Les profils combinés ont été regroupés par similarité avec le logiciel Molecular Analyst. Cette comparaison a permis de construire un dendrogramme composé de trois groupes principaux, les deux premiers correspondant aux génotypes de *C. jejuni* et le troisième aux génotypes de *C. coli*. Les génotypes composés d'un profil obtenu par une seule technique, les ADN des isolats s'étant montrés réfractaires à l'une ou l'autre des enzymes, ne sont pas inclus dans cette comparaison.

#### ➤ **Génotypes combinés de *C. coli***

Dans la plupart des cas, les profils *SmaI* et les profils *KpnI* concordent, c'est à dire qu'un ensemble d'isolats possédant le même profil avec *SmaI* présente également un profil identique par *KpnI*. Cependant, des isolats présentant un même profil avec une enzyme peuvent être subdivisés par l'autre enzyme comme c'est le cas pour les génotypes S22K22 et S28K22.

Plusieurs génotypes présentent des taux de similarité importants : avec une similitude de 85%, les génotypes S18K18 et S10K11 rassemblent 17.8% des isolats de *C. coli*. Les génotypes S1K1, S19K18 et S8K9, avec une similitude de 81%, représentent 17.8% des isolats de *C. coli*. Les génotypes S22K22, S28K22 et S15K15 ont une similitude de 88% et regroupent 12.5% des isolats de *C. coli*. Les génotypes S17K17 et S23K23, correspondant à 12.5% des isolats de *C. coli*, montrent une similitude de 86%. Les génotypes S25K25, S31K31 et S30K30 rassemblent 10.7% des isolats de *C. coli* avec un taux de similarité de 80%. Enfin, les génotypes S27K27 et S11K14 ont un taux de similarité de 93% et regroupent 23.2% des isolats de *C. coli*. Un génotype diffère complètement des autres.

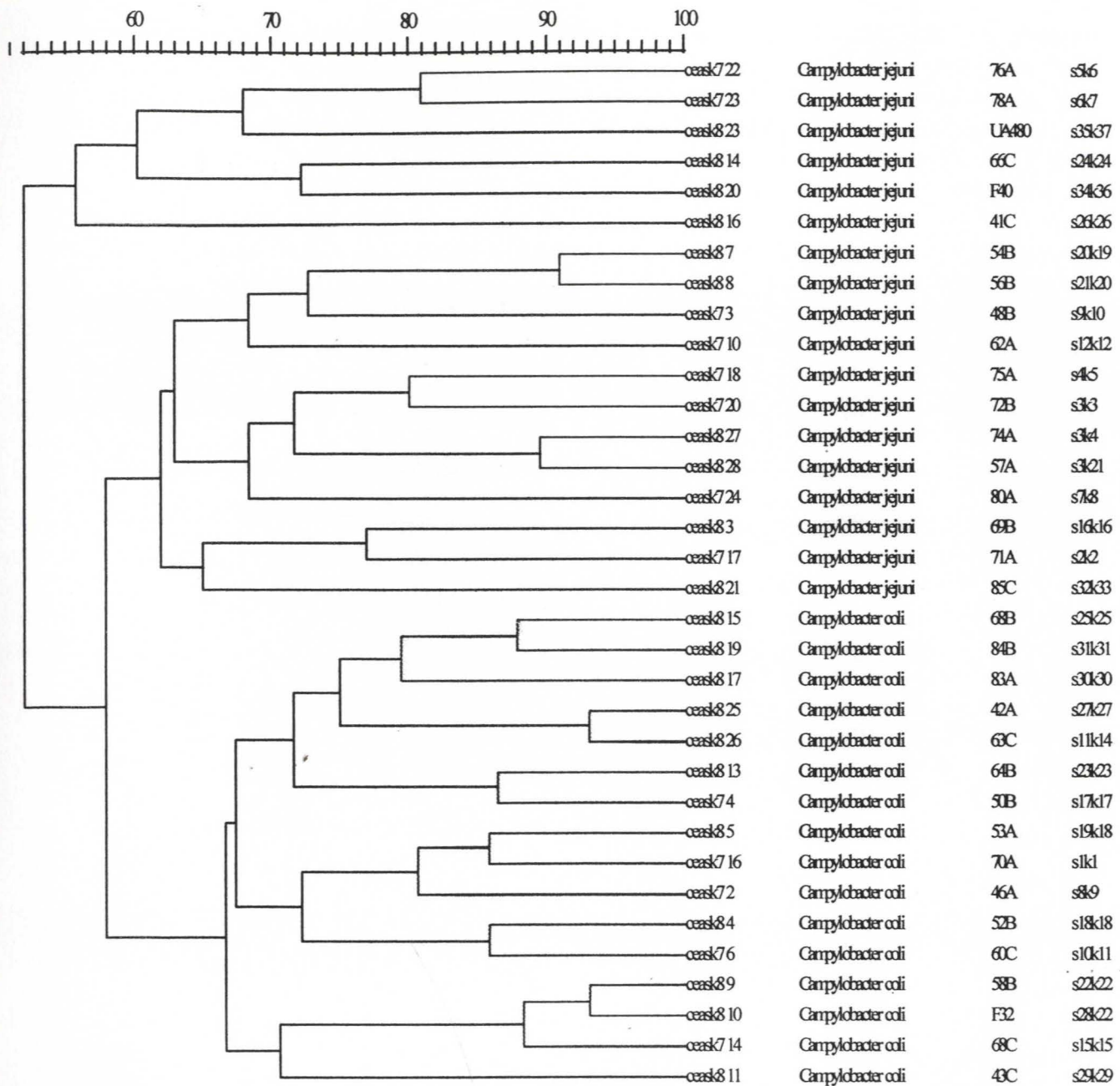
#### ➤ **Génotypes combinés de *C. jejuni***

La combinaison des profils *SmaI* et des profils *KpnI* a permis la définition de 18 génotypes (figure 12) parmi les isolats de *C. jejuni* étudiés.

Comme pour les *C. coli*, les isolats ayant un profil identique en *SmaI* montrent, généralement, un profil identique en *KpnI*. Cependant, à la différence de *C. coli*, des profils identiques en *SmaI* par exemple n'ont pas toujours donné des génotypes proches : S3K3 et S3K4, S3K21.

Quelques génotypes présentent des similitudes importantes : les génotypes S21K20 et S20K19 rassemblent 9.5% des isolats de *C. jejuni*. Les génotypes S3K4 et S3K21 représentent 11% des isolats de *C. jejuni*. Les génotypes S5K6 et S6K7 réunissent 9.5% des isolats de *C. jejuni*. Enfin, les génotypes S4K5 et S3K3 représentent 15.9 % des isolats de *C. jejuni*. Dix génotypes ne présentent pas de similitude notable avec les autres groupes.





**Figure 12 : Comparaison des 34 génotypes obtenus par combinaison des profils obtenus par macrorestriction de l'ADN génomique avec l'enzyme *SmaI*, d'une part, et l'enzyme *KpnI*, d'autre part. Les similitudes entre les profils ont été estimées par le coefficient de Dice, avec une tolérance sur la position des bandes de 1 %. Les profils ont été regroupés selon la méthode « Unweighted Pair Group linkage Analysis Method » (UPGMA). Les génotypes composés d'un profil obtenu par une seule technique ne sont pas inclus dans ce dendrogramme. Le profil S14K13 est absent du dendrogramme (il existe donc 35 génotypes).**

#### 3.2.2.4. Répartition des types combinés dans les élevages et les marchés

Il existe donc une importante diversité dans les isolats collectés ; en effet, seuls six élevages (18%) présentent des isolats dont le génotype est identique. Tous les autres élevages présentent des isolats dont le génotype est différent et dont l'espèce peut aussi être différente (Tableaux II et III). Les génotypes S9K10 et les groupes de similarités S5K6/S6K7 et S4K5/S3K3 représentent 50% des isolats de *C. jejuni* dans les élevages. Les groupes de similarités S18K18/S10K11, S23K23/S17K17 et S19K18/S1K1/S8K9 représentent 65% des isolats de *C. coli* dans les élevages.

La diversité est tout aussi importante au niveau des marchés où seuls 25% des tueries présentent des isolats de génotype identique (Tableaux II et III). Au sein des isolats de *C. jejuni* issus des marchés, il n'y a pas de génotype prépondérant; seul le groupe de similarité S27K27/S11K14 regroupe 73% des isolats de *C. coli* issus des marchés.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Contamination au couvoir :

Les résultats des analyses des poussins de un jour ne mettent pas en évidence de contamination importante par *Salmonella* au couvoir. Cependant, il serait anticipé de conclure à une absence de contamination à cette étape. En effet, l'analyse n'a porté que sur les animaux provenant d'une quarantaine d'éclosions. En outre, la recherche de salmonelles s'avère plus pertinente lorsque celle-ci porte sur l'analyse des fonds de boîtes servant au transport des poussins du couvoir à l'élevage (Corrier *et al.*, 1995). Il aurait donc été intéressant d'analyser les fonds de boîtes mais les éleveurs utilisent les cartons pour le démarrage des poussins dans leur exploitation. Cette étape est néanmoins considérée comme un point à risque de la contamination par *Salmonella* de la viande de volaille (Christensen *et al.*, 1997 ; Hoover *et al.*, 1997, Rose *et al.*, 1999).

### 4.2. Contamination à l'élevage :

Les analyses de fientes montrent une proportion identique d'élevages contaminés par *Salmonella* par rapport aux élevages des pays développés (White *et al.*, 1997 ; Angen *et al.*, 1996). La contamination des élevages par *Campylobacter* est similaire voire supérieure à celle estimée dans les pays développés (Gregory, 1997 ; Atanassova 1999, Refregier et Denis, 2000). Les enquêtes conduites en élevage ont permis de distinguer les exploitations en fonction de leurs pratiques hygiéniques. Ce type d'enquête est souvent utilisé en épidémiologie pour décrire avec précision un phénomène de santé dans une population et son évolution dans le temps (Toma *et al.*, 1998) ; elle répond donc à notre objectif qui est de décrire les pratiques des éleveurs. L'analyse est fondée sur la méthode statistique de l'analyse factorielle des correspondances couplée à la classification ascendante hiérarchique ; celle-ci fait appel à des représentations géométriques d'un tableau croisé de données (individus, variables) qui transforment en distances euclidiennes des proximités statistiques entre éléments. Elle permet de constater des regroupements, des oppositions et des tendances impossibles à discerner directement sur un grand tableau de données (Escofier et Pagès, 1990) ; elle s'applique donc à la distinction de pratiques d'élevage.

Les pratiques hygiéniques dans les élevages ont un impact significatif sur la contamination des volailles (fientes) par *Salmonella* et *Campylobacter*. Nos résultats ne sont pas surprenants et sont corroborés par de nombreux travaux (Humphrey *et al.*, 1988 ; Humbert et Salvat, 1997 ; Van de

Giessen *et al.*, 1998 ; White *et al.*, 1997) qui considèrent l'élevage comme la source essentielle de la contamination de la viande de volaille par ces bactéries. Nos résultats montrent une distinction entre les élevages respectant des mesures sanitaires strictes et ceux dont les mesures hygiéniques sont insuffisantes. Ces derniers se distinguent notamment par une conservation des animaux malades voire des cadavres au sein du poulailler qui peuvent ainsi assurer une pérennisation de la contamination (Drouin et Cardinale, 1999). Ces éleveurs ne pratiquent pas non plus de lutte contre les rongeurs qui sont considérés comme des vecteurs fréquents de *Salmonella* et de *Campylobacter* (Henzler et Opitz, 1992 ; Gregory *et al.*, 1997) : ces rats et ces mulots élisent domicile à proximité des poulaillers car leur entrée est facilitée vu le type de bâtiment développé (style Californie) et car le type de mangeoire utilisée (longitudinale) facilite le gaspillage de l'aliment sur la litière. Ces éleveurs mettent une épaisseur insuffisante de litière pour permettre, en fin de bande, un Ph élevé dont l'effet est létal pour *Salmonella* (Higgins *et al.*, 1981). La litière est aussi souvent humide, comme dans la catégorie 3, créant ainsi un milieu favorable à la bactérie (Carr *et al.*, 1995). Ces éleveurs n'ont pas de personnel spécifique pour leur poulailler et reçoivent des visites fréquentes d'autres éleveurs : ces personnes peuvent donc intervenir en tant que vecteur indirect de la contamination (Jacobs-Reitsma ; 1997). La négligence de ces vecteurs environnementaux facilite la transmission horizontale de *Salmonella* et de *Campylobacter*.

Enfin, peu d'aviculteurs sénégalais réalisent des opérations de décontamination efficaces, ce qui permet aux bactéries, notamment *Salmonella*, de se maintenir dans le poulailler (Higgins *et al.*, 1981 ; Drouin, 1988, Cardinale *et al.*, 2001).

Les erreurs qui sont commises dans la gestion hygiénique des élevages avicoles expliquent les forts taux de prévalence de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages avicoles.

### **4.3. Contamination à l'abattage :**

Les taux de contamination des carcasses de poulets de chair par la flore aérobie mésophile totale, les coliformes thermotolérants et les staphylocoques coagulase positifs sont très élevés par rapport aux normes qui sont appliquées dans les pays développés (Jouve, 1996) ou les résultats de travaux menés dans les abattoirs de volailles européens (Lahellec et Meurier, 1973 ; Izat *et al.*, 1988, Brewer *et al.*, 1995). Il n'est pas étonnant de trouver de tels résultats car ces flores bactériennes constituent des indicateurs d'hygiène ; or, tous les abattages se déroulent dans des tueries artisanales à l'élevage ou dans les marchés qui ne réunissent pas les conditions hygiéniques appliquées dans les abattoirs européens.

La proportion de carcasses contaminées par *Salmonella* est comparable à celles estimées dans de nombreux pays développés (Van Schothorst et Notermans, 1980 ; White *et al.*, 1997) ; ce problème de santé publique est lié à l'industrialisation de la filière avicole (Humbert et Salvat, 1997) et favorisé par les conditions de température et d'hygrométrie du climat sénégalais (Drouin et Cardinale, 1999). Cependant, les sérotypes identifiés diffèrent de ceux retrouvés dans les pays développés où prédominent *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* (White *et al.* ; 1997 ; Hafez, 1999 ; Salvat, 1997). *Salmonella* Glostrup et Brancaster sont considérés comme des sérotypes rares dans les pays industriels (Old *et al.*, 1999) mais ils ont été mis en évidence dans d'autres pays en développement (De Souza *et al.*, 1992). La prévalence de *Campylobacter* sur les carcasses de poulet de chair est comparable voire supérieure à celles obtenues dans les pays industriels (Uyttendaele, 1999 ; Oosterom *et al.*, 1983 ; Jacobs-Reitsma, 1997 ; Atanassova et Ring, 1999 ; Ono et Yamamoto, 1999, White *et al.*, 1997).

Les enquêtes conduites dans les tueries d'élevage et de marché ont permis de distinguer différentes catégories de pratiques hygiéniques lors de l'abattage par la même méthode statistique que celle employée dans les exploitations avicoles. Ces pratiques ont une influence significative sur la contamination des carcasses de volailles par les flores indicatrices d'hygiène et par les salmonelles. Les conditions d'ambiance de l'abattage (humide ou sec) représentent un facteur déterminant dans la contamination (Lahellec et Meurier, 1973) : en effet, les microorganismes ont besoin d'eau pour se développer ; cette eau est prise dans la carcasse et, pour les germes de surface, dans le milieu (Rozier *et al.*, 1985). L'utilisation d'eau, en particulier dans des conditions d'hygiène médiocres, contribue à créer un milieu favorable à la multiplication des bactéries (Bourgeois *et al.*, 1988).

Les pratiques hygiéniques lors de l'abattage ont un impact significatif sur la contamination des carcasses. L'analyse statistique montre que les tueries n'appliquant pas des mesures d'hygiène strictes (catégorie 3 et 1) obtiennent des carcasses plus contaminées par les flores indicatrices d'hygiène et les salmonelles que celles issues des tueries où sont respectées les règles hygiéniques. La saignée dans les tueries des catégories 1 et 3 s'effectue à l'aide de couteau rarement nettoyé ou désinfecté qui peut permettre l'introduction de microorganismes dans le système circulatoire et dans les muscles (Carraminana *et al.*, 1993 ; Mead, 1975. ; Mead *et al.* 1994). Les tueurs n'apportent aucun soin particulier à l'éviscération et la rupture fréquente du tube digestif s'avère une source de contamination de la carcasse. (Lahellec et Colin, 1979). Ce risque est augmenté du fait de l'absence de jeûne alimentaire avant la saignée (Izat *et al.*, 1989 ; Hargis *et al.*, 1995). Les contacts nombreux des carcasses avec des surfaces souillées (tables, sacs, couteaux, torchons...) et les manipulations humaines peuvent aussi être à l'origine de contaminations croisées lors des opérations d'entreposage (Salvat *et al.*, 1993 ; Yang et Shih, 2000). Enfin, l'abattage s'effectuant souvent à l'extérieur ou dans un local inadéquat, les opérations de décontamination (nettoyage et désinfection) sont mal réalisées et facilitent les contaminations d'un abattage à un autre (White *et al.*, 1997).

Les différences de contamination des carcasses issues des tueries des catégories 1 et 3 sont liées au type d'abattage (humide ou sec) ; les étapes « humides » comme l'échouage sont le siège de contamination croisée car l'eau n'est pas changée fréquemment (Laisney et Colin, 1993) ; de nombreux tueurs utilisent régulièrement une eau trop chaude qui déstructure la peau et permet la colonisation ultérieure de la carcasse par *Salmonella* (Lahellec et Meurier, 1973).

L'origine des germes pathogènes comme *Salmonella* ou *Campylobacter* semble se situer en amont de la filière mais l'abattage intervient, notamment lorsque les conditions hygiéniques sont médiocres, en amplifiant les phénomènes de contamination croisée.

#### **4.4. Diversité et Répartition des *Campylobacter* :**

##### **4.4.1. Identification de l'espèce par PCR :**

L'identification de l'espèce par PCR est utilisée depuis quelques années (Koenraad *et al.*, 1995) mais la méthode développée par Denis *et al.* s'est avérée fiable à 100% pour l'identification de *Campylobacter coli* et de *C. jejuni* qui sont les deux espèces les plus représentées dans la filière avicole. Celle-ci a permis de confirmer les tests biochimiques et l'espèce de tous les isolats soumis au test génétique. La répartition entre *C. jejuni* et *C. coli* est différente de celle reconnue en Europe où *C. jejuni* représente 82% des isolats de *Campylobacter* sur les poulets standards (Avrain *et al.*, 2001) ; ce qui laisse supposer l'existence de sources de contamination différentes.

#### 4.4.2. Caractérisation par Macrorestriction :

L'électrophorèse en champs pulsés apparaît actuellement comme la méthode la plus discriminante et la plus adaptée aux études épidémiologiques sur *Campylobacter* (Nielsen *et al.*, 2000 ; Slater et Owen, 1998 ; Gibson *et al.*, 1995). Ce système de typage, utilisé dans cette étude de caractérisation d'isolats de *Campylobacter*, étudie le polymorphisme de restriction du génome total .

La combinaison de deux enzymes est nécessaire pour avoir une meilleure discrimination et pour minimiser des interprétations trop rapides sur les affinités liant certains isolats (Gibson *et al.*, 1997 ; On *et al.*, 1998). En effet, plusieurs isolats avec un profil identique par macrorestriction avec l'enzyme *SmaI* ont montré des différences significatives par *KpnI*. Les deux techniques de macrorestriction ont ainsi permis de mettre en évidence des profils spécifiques aux deux espèces et l'analyse par le logiciel Molecular Analyst a permis de mettre en évidence trois clusters, un regroupant tous les profils mis en évidence par les isolats de *C. coli* et les deux autres ceux observés pour les *C. jejuni*.

Les ADN génomiques de certains isolats n'ont pu être digérés par l'une ou par l'autre enzyme utilisée pour la macrorestriction et les isolats n'ont donc pas pu être typés par cette technique. Cependant, ces isolats sont minoritaires ; ils sont réfractaires à la digestion par une des enzymes parce qu'ils possèdent des systèmes de restriction-modification dus à la présence de méthylases (Nelson et McClelland, 1997). Les deux enzymes *SmaI* et *KpnI*, dont les sites de restriction sont, respectivement, CCC↓GGG et GGTAC↓C, sont, en effet, toutes deux sensibles à la méthylation, au niveau de la première et de la seconde cytosine pour *SmaI* et au niveau de l'adénine et de la première cytosine pour *KpnI*.

Des similarités ont été observées entre des génotypes mis en évidence par les isolats de *C. coli*, d'une part, et par les isolats de *C. jejuni*, d'autre part (figure 12). Les isolats présentant des génotypes similaires à plus de 80 % possèdent probablement une origine commune. Des lignées clonales peuvent, ainsi, être définies au sein des deux espèces de *Campylobacter*.

Les relations clonales traduisent une même origine du prélèvement comme pour les bactéries de génotypes S1K1 et S19K18 (*C. coli*) ou S5K6 et S6K7 (*C. jejuni*) dont les isolats proviennent d'un même élevage ; ce qui confirme les hypothèses de certains auteurs de la présence de souches dominantes au sein des élevages avicoles (Berndtson *et al.*, 1996 ; Pearson *et al.*, 1993 ; Ayling *et al.*, 1996). Les variations dans le génotype peuvent s'expliquer par la plasticité du génome de *Campylobacter* (Wassenaar *et al.*, 1998).

Cependant, de nombreux élevages et de nombreux marchés hébergent des isolats dont les génotypes diffèrent fortement (génotypes S17K17 et S22K22 dans l'élevage C. Sarr ; génotypes S27K27 et S29K29 pour le marché Colobane 43) voire des isolats appartenant à des espèces différentes (Elevage L. Diouf 4 et 5 ; Elevage J. Petit, Marché Castor 41 ; Marché Sandinieri 44). Dans les élevages, ces observations sont en accord avec les travaux de Jacobs-Reitsma (1997), Thomas *et al.* (1997) ou Chuma *et al.* (1997) qui constatent que plusieurs souches de *Campylobacter* peuvent coexister même si une souche est dominante.

Dans les marchés, la variabilité des génotypes des isolats peut s'expliquer par l'allotement de volailles qui viennent de plusieurs élevages et qui sont rassemblées dans un même local avant d'être abattues par le même tueur.

L'ensemble de ces résultats permet donc de mettre en évidence une diversité relative au sein des *Campylobacter* isolés dans la filière avicole. Celle-ci est certainement la conséquence de sources multiples de *Campylobacter* dans l'environnement des élevages avicoles.

## CONCLUSION :

Le déficit en protéines animales dont souffre le continent africain s'accroît progressivement et le recours aux espèces à cycle court est devenu inéluctable pour tenter de résoudre ce problème. Au Sénégal, la majorité de la population est de religion musulmane, le pays s'est donc logiquement tourné vers la production de volailles. Celle-ci s'est considérablement développée depuis plus d'une dizaine d'années et la modernisation de cette filière s'est accompagnée du développement de germes pathogènes pour l'homme, notamment *Salmonella* et *Campylobacter*. Or, la viande de volaille est un produit destiné au marché national et ne bénéficie donc pas de l'attention portée aux produits exportés qui doivent se plier aux normes sanitaires internationales. Cette étude nous a permis d'évaluer la qualité microbiologique de la viande de poulet de chair proposée aux consommateurs ; la contamination par la flore mésophile totale, par les coliformes thermotolérants et par les staphylocoques présumés pathogènes est importante et signifie une hygiène défectueuse notamment lors de la préparation de la carcasse. En outre, la prévalence des bactéries pathogènes (*Salmonella* et *Campylobacter*) est équivalente voire supérieure à celle estimée sur les volailles dans les pays industrialisés.

L'origine de cette contamination est très variée mais conformément à ce qu'il est constaté en Europe, il semble que l'origine des *Salmonella* et des *Campylobacter* présents sur les carcasses se situe en amont de la filière, particulièrement au niveau des élevages. Il existe à cette étape de nombreuses sources potentielles de contamination et les pratiques hygiéniques défectueuses des aviculteurs ne représentent pas une barrière suffisamment efficace.

L'étape de l'abattage intervient en amplifiant le phénomène des contaminations croisées : la multiplicité des tueries ne permet pas d'intervenir efficacement sur la maîtrise hygiénique et seules quelques tueries d'élevage qui respectent des règles d'hygiène rigoureuses offrent un produit dont les contaminations bactériennes sont limitées. Outre l'importance du respect de l'hygiène, le type d'abattage (humide ou sec) influence significativement la contamination des carcasses de volailles et il est préférable d'avoir recours à un abattage à sec pour limiter les contaminations.

La viande de poulet de chair peut donc constituer un risque potentiel pour la santé publique mais il serait intéressant de mesurer l'impact véritable de la consommation de ce produit sur la santé du consommateur en analysant systématiquement les causes de diarrhées humaines et en comparant les souches bactériennes retrouvées chez l'homme à celles identifiées chez les volailles.

En parallèle, il serait judicieux de rechercher les germes pathogènes directement dans les plats à base de poulet vendus dans les restaurants sénégalais afin de savoir si la préparation suffit à les éliminer.

La qualité des aliments est un sujet de préoccupation constant dans les pays industriels mais, dans les pays en développement, elle est souvent considérée comme superflue. Contrairement à cette idée reçue, les consommateurs de ces pays cherchent non seulement à manger plus mais aussi à manger mieux et il est fondamental de se pencher, dès à présent, sur ce problème afin de leur apporter des solutions.

## Bibliographie

- Altekruse S.F., Swerdlow D.L. et Stern N.J.. 1998. Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni*. *Vet. Clinics North Am.* 14. 31-40
- Angen O., Skov M.N., Chriel M., Agger J.F. et Bisgaard M. 1996. A retrospective study on salmonella infection in Danish broiler flocks. *Prev. Vet. Med.* 26 : 223 – 237
- Atanassova V. and Ring C.. 1999. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 51. 187-190
- Avrain L., Humbert F., L'Hospitalier R., Sanders P. et Kempf I. 2001 Etude de l'antibiorésistance des *Campylobacter* de la filière avicole. Quatrièmes Journées de la Recherche Avicole. Nantes. 27 –29 mars. 105-109
- Ayling, R.D., Woodward, S., Evans, S., et Newell, D.G., 1996. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry *Campylobacters* for epidemiological investigations. *Res. Vet. Sci.*, 60 : 168-172.
- Benjamin, M. M., et Datta, A. R., 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 1669-72.
- Berndston, E., Emanuelson, U., Engvall, A., et Danielsson-Tham, M.L., 1996a. A 1-year epidemiological study of *Campylobacters* in 18 Swedish chickens farms. *Prev. Vet. Med.*, 26 : 167-185.
- Berndston, E., Danielsson-Tham, M.L., et Engvall, A., 1996b. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.*, 32 : 35-47.
- Bisgarrd M. et Hansen H.C. 1994. Limitations of a national Salmonella monitoring programme dependent upon examination of cloacal swabs which should enable detection of infection levels of one per cent or greater. In : R.W.A.W. Mulder and Franchini Ed. Prevention and control of potentially pathogenic micro-organisms in poultry and poultry meat procesing. Proceedings of 13. Consequences of the zoonosis order : monitoring, methodology and data registration. Spelderholt centre for poultry research and information services, Beekbergen, the Netherlands : 39 – 48
- Brewer R.L., James W.O., Prucha J.C., Johnston R.W., Alvarez C.A., Kelly W. et Bergeron E.A. 1995 Poultry processing line speeds as related to bacteriologic profile of broiler carcasses. *J. Food Sci.* 60 (5) : 1022 – 1024
- Brown D.J., Olsen J.E. and Bisgaard M. 1992. Salmonella enterica : infection, cross infection and persistence within the environment of a broiler parent stock unit in Denmark. *Zentralb. Bakteriolog.* 277 : 129 – 138

Boucher S.N., Slater E.R., Chamberlain A.H., Adams M.R. 1994. Production and viability of coccidial forms of *Campylobacter jejuni*. *J. Applied Bact.* 77 : 303 – 307

Cardinale E., Dieng C., Pene G., Wade I., Diallo A., Tall F., Kane P., Konte M. 2001. Les Pratiques Hygiéniques des Aviculteurs Sénégalais : Impact sur la Productivité. Journées de la Recherche Avicole. Nantes. 27 –29 mars : 333-336

Carraminana J.J., Agustin A.I., Yanguela J., Blanco D., Rota C. et Herrera A. 1993. Présence des Salmonella sur les carcasses de poulets de chair : influence des différents points d'abattage. In : Qualité des produits avicoles : I Qualité de la viande de volaille. Comptes rendus du 11<sup>ème</sup> symposium européen sur la qualité de la viande de volaille et du 5<sup>ème</sup> symposium européen sur la qualité de l'œuf de consommation et des ovoproduits. Tours. France. 4-8 octobre. 517-523

Carr L.E., Mallinson E.T., Tate C.R., Miller R.G., Russek-Cohen E., Stewart L.E., Opara O.O. et Joseph S.W. 1995. Prevalence of *Salmonella* in broiler Flocks : effect of litter water activity, house construction and watering devices. *Avian Dis.* 39 : 39 –44.

Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K., et Yugi, H., 1997. Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. *J. Vet. Med. Sci.*, 59 : 1011-1015.

Christensen, J.P., Brown D.J., Madsen M., Olsen J.E., Bisgaard M. , 1997. Hatchery-borne salmonella enterica serovar Tennessee infections in broilers. *Avian Pathol.* 26, 155-168.

Corrier, D.E., D.J. Nisbet, C.M. Scanlan, A.G. Hollister, D.J. Caldwell, L.A. Thomas, B.M. Hargis, T. Tomkins and J.R. DeLoach, 1995. Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria on Salmonella colonization of broiler chicks. *Avian Dis.* 36 : 897–902

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., et Colin, P., 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29 : 406 - 410.

De Souza LC, Iaria ST, Paim GV. 1992. Salmonellas and fecal coliforms in drinking water for animals. *Rev Saude Publica* ; 26(5):321-327

Drouin P. 1988. La maîtrise de l'état sanitaire dans les bâtiments d'élevage avicole : la désinfection. *Bull. Inf. Stat. Exp. Avi. Ploufragan.* 28 : 43–60

Drouin P. et Cardinale E.. 1999. Biosécurité et décontamination en productions de poulets de chair en climat chaud. In : Production de poulets de chair en climat chaud. ITAVI : 94 - 107

Escofier B. et Pagès J. 1990. Analyses factorielles simples et multiples : objectifs, méthodes et interprétation. Dunod. Paris. France. 267p.

Gibbs P.A., Patterson J.T. et Harvey J. 1978. Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* in a poultry processing plant. *J Applied Bact.* 44 : 57-74



Gibson, J., Fitzgerald, C., et Owen, R.J., 1995. Comparison of PFGE, ribotyping and phage-typing in the epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* serotype HS2 infections. *Epidemiol. Inf.*, **115** :215-225.

Gibson, J., Lorenz, E., et Owen, R.J., 1997. Lineages within *Campylobacter jejuni* defined by numerical analysis of pulsed-field gel electrophoretic DNA profiles. *J. Med. Microbiol.*, **46** :157-163.

Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N.J., et Corn, J.L., 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers : source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis.*, **41** : 890-898.

Gronstol H., Osborne A.D. et Pethiyagoda S. 1974. Exeprimental Salmonella infection in calves. The effect of stress factors on carrier state. *J. Hyg. Camb.* **72** :155

Hafez H.M. 1999. Poultry meat and food safety: pre- and post-harvest approaches to reduce foodborne pathogens. *World Poultr. Sci.* **55** : 269-280

Hargis B.M., Caldwell D.J., BRewer R.L., Corrier D.E. et Deloach J.R.1995. Evaluation of the chicken crop as a source of Salmonella contamination for broiler carcasses. *Poult. Sci.* **74** : 1548 - 1552

Harvey R.W.S. 1973. *Salmonella* contaminated feed in relation to infection in animals and man. In : the microbiological safety of food. Academic press. 9-12

Henzler D.J. et Opitz H.M. 1992. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* Enteritidis infection on chicken-layer farms. *Avian Dis.* **36** : 625--631

Higgins R., Malo R., René-Roberge E. et Gauthier R. 1981. Studies on the dissemination of *Salmonella* in nine broiler chicken flocks. *Avian Dis.* **26** (1): 26--33

Hoover N.J., Kenney P.B., Amick J.D., Hypes W.A. 1997. Preharvest sources of *Salmonella* colonization in Turkey production. *Poult. Sci.* **76**, 1232-1238.

Humbert F. et Salvat G. 1997. Risques de transmission des salmonelles en aviculture : détection et précevnction en-Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **16**(1), 83-90.

Humphrey T.J., Mead G.C. and Rowe B., 1988. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. *Epidemiol. Inf.*, **100**, 175-184.

Izat A.L., Colberg M., Driggers C.D. et Thomas R.A. 1989. Effects on sampling method and feed withdrawal period on recovery of microorganismes from poultry carcasses. *J. Food Prot.* **52** (7) : 480 - 483

Jacobs-Reitsma, W.F., 1997. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet. Quater.*, **19** : 113-7.

Jouve J.L. 1996. Volailles et ovoproduits In : La qualité microbiologique des aliments : Maîtrise et critères. CNERNA-CNRS. Polytechnica. Paris. France. 353–355

Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M., et Potter, M., 1993. Epidemiologic investigation of risk factors for *Campylobacter* colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiol. Inf.*, **111** : 245-255.

Koenraad, P.M.F.J., Ayling, R., Hazeleger, W.C., Rombouts, H. et Newell, D.G., 1995. The speciation and subtyping of campylobacter isolates from sewage plants and waste water from a connected poultry abattoir using molecular techniques. *Epidemiol. Inf.*, **115** : 485-494.

Lahellec C. 1988. Viandes de volailles. In : Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. Microbiologie alimentaire Tome I. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. France : 227-235

Lahellec C. et Colin P. 1979. Bacterial flora of poultry. Changes due to variations in ecological conditions during processing and storage. *Archiv. Fur Lebensmittelhygiene*, **3** : 95–98

Lahellec C., Colin P. et Bennejean G. 1986. Influence of resident Salmonella on contamination of broiler flocks. *Poult. Sci.* **65** : 2034–2039

Lahellec C. et Meurier C. 1973. Influence de l'échouage sur la pollution superficielle des carcasses de volailles. *Bull. Inf. Station Avic. Ploufragan*. **13** : 60–63

Laisney, M.J., et Colin, P., 1993. Evaluation du niveau de contamination des carcasses de volailles par *Campylobacter* spp. Huitième colloque de la Société Française de Microbiologie 28-29 Avril 1993, Paris.

Lior, H., 1984. New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". *J. Clin Microbiol.*, **20** : 636-640.

Mead G.C. 1975. Hygiene aspects of the chilling process. Paper N°35 In : The quality of poultry meat; Proceedings of the second European symposium on poultry meat quality; Oosterbeek, The Netherlands, Spelderholt Institute of poultry research ; Beekbergen.

Mead G.C., Hudson W.R. et Hinton M.H. Use of a marker organism in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures. 1994. *Brit. Poult. Sci.* **35** : 345 – 354

Nelson, M., et McClelland, M., 1997. Site-specific methylation : effect on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucleic Acid Research*, **19** : 2045-2071.

Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogen C.H. et On S.L.W. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry and cattle. *J. Clin. Microbiol.* **38** (10) : 3800 – 3810

Notermans S., Terbijhe R.J. et Van Schothorst M. 1980. Removing fecal contamination of broilers by spray-cleaning during evisceration. *Brit. Poult. Sci.* 21 : 115-121

Old DC, Chisholm SA, Crichton PB. 1999. Molecular fingerprinting of Salmonella serotype Glostrup. *Lett Appl Microbiol* ; 29(3):156-159

On, S.L.W., Nielsen, E.M., Engberg, J., et Madsen, M., 1998. Validity of *SmaI*-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiol. Inf.*, 120 : 231-237.

Ono, K. et Yamamoto, K., 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int. J. Food Microbiol.*; 47 : 211-219.

Oosterom, J., Notermans, S., Karman, H., et Engels, G.B., 1983. Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. *J. Food Protec.*; 46 : 339-344.

Parkill, J., et Barrell, B., 1999. The Sanger Centre: Microbial Genomes, <http://www.sanger.ac.uk/projects/Microbes/>.

Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., et Colwell, R.R., 1993. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 : 987-996.

Penner, J.L., et Hennessy, J.N., 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* on the basis of heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 12 : 732-737.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. et Carter G.R. 1994. *Enterobacteriaceae* in : Clinical veterinary microbiology. Wolfe Eds. London. England. 209-236

Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., et Ermel, G., 1998. Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *J. Appl. Microbiol.*, 85 : 829-833.

Refregier-Petton J., Rose N., Denis M., Salvat G. 2000. Risks factors for *Campylobacter* spp. Contamination in french broiler chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev. Vet. Med.*. Soumis à publication.

Rozier J., Carlier V. et Bolnot F. 1985. Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. ENVA. Paris. France. 230p.

Salvat G. 1997. Prévention des problèmes de santé publique liés aux produits issus de la filière avicole. *Bull. Acad. Vét. France.* 70 : 43-68.

Salvat G., Allo J.C. et Colin P. 1995. Evolution of turkey carcasses contamination during slaughtering : a survey on 12 french abattoirs In : Qualité des produits avicoles : I Qualité de la

viande de volaille. Comptes rendus du 11<sup>ème</sup> symposium européen sur la qualité de la viande de volaille. Tours. France. 4-8 octobre. 517-523

Slater, E., et Owen, R.J., 1998. Subtyping of *Campylobacter jejuni* Penner heat-stable (HS) serotype 11 isolates from human infections. *J. Med. Microbiol.*, **47** : 353-357.

Shiozawa K., Kato E. et Shimizu A. 1980 Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from chickens. *J. Food Protec.* **43** : 683 - 685

Simmons G. et Byrnes R.V. 1972. The origin of *Salmonella* in chickens and chicken carcasses. *Aust. Vet. J.* **48** : 186 - 189.

Skirrow, M.B., 1990. Foodborne Illness ; *Campylobacter*. *The Lancet*, **336** : 921-923.

Struelens, M.J. et Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Inf.*, **2** : 2-11.

Thomas, L.M., Long, K.A., Good, R.T., Panaccio, M., et Widders, P.R., 1997. Genotypic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates in a commercial broiler flock. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63** : 1874-1877.

Thomas C.J. et Mc Meekin T.A. 1980. Contamination of broiler Carcasse skin during commercial processing procedures : an electron microscopy study. *Appl. Environ. Microbiol.* **40** : 133 - 144

Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénét J.J., Ellis P., Moutou F. et Louza A. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 1996. AEEMA. Paris. France. 551p.

Uyttendaele, M., Detroy, P., Debevere, J. 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *J. Food Protec.* **62** : 735 - 740.

Van de Giessen, A., Tilburg, J.J., Ritsmeester, W.S., et Van der Plas, J., 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol. Inf.*, **121** : 57-66.

Van Schothorst M. et Notermans S. 1980. Food-borne diseases associated with poultry. In : Meat quality and game birds. Ed Mead and Freeman. *Brit. Poult. Sci.* Ltd Edinburg Scotland : 79 - 90

Véron, M., et Fauchère, J.L., 1990. *Campylobacter*. Bactériologie Médicale 2<sup>nd</sup> édition, Chapitre 32.

Wassenaar, T.M., Geilhausen, B., et Newell, D.G., 1998. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** : 1816-1821.

Wang, Y., et Taylor, D.E., 1990. Natural transformation of *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.*, 172 : 949-955.

White P.L., Baker A.R. et James W.O. 1997. Strategies to control Salmonella and Campylobacter in raw poultry products. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16(2), 525-541.

Yan, W., Chang, W., et Taylor D.E., 1991. Pulse-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiological application. *J. Inf. Dis.*, 163 : 1068-1072.

Yang D. et Shih C. 2000. Isolation and Identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from Chicken samples in Taipei. *J. Food Protec.* 63 : 304-308.

Rapport-Gratuit.Com

## RESUME :

Pour répondre au déficit en protéines animales dont souffre l'Afrique et aux besoins croissants d'une démographie urbaine en constante augmentation, les productions avicoles se sont rapidement développées autour des grands centres urbains. Au Sénégal, la production de poulet de chair s'est installée autour de la capitale et approvisionne les marchés de la ville. Cependant, les crises alimentaires en Europe ont ébranlé la confiance du consommateur sénégalais et l'affaire de la dioxine n'a fait qu'amplifier la suspicion sur la viande de volaille. Cette étude a donc pour objectif d'évaluer la qualité microbiologique de ce produit afin d'estimer les dangers pour la santé publique liés à sa consommation. Une enquête longitudinale de la filière a donc été entreprise pour mettre en évidence les maillons qui peuvent être à l'origine de la contamination du produit. Les résultats des analyses des carcasses de volaille indiquent une forte contamination par les flores indicatrices d'hygiène, par *Salmonella* (22%) et surtout par *Campylobacter* (88%). Deux sérotypes, S. Brancaster et S. Glostrup, représentent plus de 50% des isolats de *Salmonella*. *C. jejuni* (59%) et *C. coli* (41%) ont été les seules espèces de *Campylobacter* isolées. L'élevage constitue la source primaire de contamination des volailles par *Salmonella* et *Campylobacter*. L'abattage intervient en amplifiant le phénomène des contaminations croisées. La maîtrise des mesures hygiéniques permet de limiter la contamination notamment par *Salmonella* au niveau des élevages ; ceux respectant les règles d'hygiène sont moins contaminés que ceux où ces mesures sont déficientes (21% contre 50%). La maîtrise de l'hygiène est aussi essentielle au niveau de l'abattage et permet d'offrir aux consommateurs des carcasses moins contaminées. Dans des conditions d'hygiène médiocres, l'abattage à sec est à privilégier par rapport à l'abattage humide. La caractérisation génotypique des *Campylobacter* par macrorestriction montre une forte diversité des isolats, particulièrement *C. jejuni*, qui traduit une diversité importante de sources de contamination ; elle confirme aussi les phénomènes de contamination croisée au niveau des marchés.

La viande de poulet de chair peut donc constituer un danger pour la santé publique mais l'amélioration des pratiques hygiéniques à tous les maillons de la filière, grâce à une sensibilisation des acteurs, reste un facteur prépondérant pour limiter les risques de contamination de la viande de volaille.

## SOMMAIRE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Environnement d'un poulailler de la catégorie 3	p 9
<b>Figure 2</b> : Environnement d'un poulailler de la catégorie 2	p 9
<b>Figure 3</b> : Abattage Humide (Catégorie 3) dans un élevage de Keur Massar	p 10
<b>Figure 4</b> : Plumaison à sec (Catégorie 1) dans un marché de Dakar	p 10
<b>Figure 5</b> : Analyses Microbiologiques indicatrices d'hygiène	p 12
<b>Tableau I</b> : Sérotypes de Salmonelles isolés dans les prélèvements de peau et de muscle de carcasse de volaille	p 13
<b>Figure 6</b> : Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination des carcasses par la flore aérobie mésophile totale	p 14
<b>Figure 7</b> : Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination des carcasses par les coliformes thermotolérants	p 15
<b>Figure 8</b> : Effet des Pratiques d'abattage sur la contamination des carcasses par les staphylocoques coagulase positifs	p 16
<b>Figure 9</b> : Identification d'isolats de <i>Campylobacter</i> par PCR	p 17
<b>Tableau II</b> : Résultats de la caractérisation des isolats de <i>C. coli</i> par macrorestriction	p 19
<b>Tableau III</b> : Résultats de la caractérisation des isolats de <i>C. jejuni</i> par macrorestriction	p 20
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique des 33 profils obtenus par macrorestriction de l'ADN génomique des isolats de <i>Campylobacter</i> spp. par l'enzyme <i>SmaI</i>	p 21
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique des 35 profils obtenus par macrorestriction de l'ADN génomique des isolats de <i>Campylobacter</i> spp. par l'enzyme <i>KpnI</i>	p 22
<b>Tableau IV</b> :Composition des groupes de similarité définis pour la macrorestriction avec l'enzyme <i>SmaI</i> , pourcentage d'isolats et différences observées	p 23
<b>Tableau V</b> : Composition des groupes de similarité définis (avec au moins 80 % de similarité entre les profils) pour la macrorestriction avec l'enzyme <i>KpnI</i> , pourcentage d'isolats et différences observées.	p 23
<b>Figure 12</b> : Comparaison des 34 génotypes obtenus par combinaison des profils obtenus par macrorestriction de l'ADN génomique avec l'enzyme <i>SmaI</i> , d'une part, et l'enzyme <i>KpnI</i> , d'autre part	p 25

# ANNEXES



## ANNEXE 1 : FICHE D'ENQUÊTE / Contrôle Elevage

### CONDUITE D'ELEVAGE

Nom Eleveur : ..... Zone : ..... Date : / / 99  
Production : Chair Poulette Effectif de la bande :

#### - Animaux :

- Poussins Contrôlés au laboratoire : oui non
- Pratique de la bande unique : oui non
- Pratique de la bande multiple : oui non de l'élevage mixte : oui non
- Programme de prophylaxie médicale (appliqué sous la responsabilité d'un vétérinaire) oui non
- Devenir des animaux malades : Elevage Abattage Autre : .....
- Devenir des cadavres : Elevage Evacuation Incinération Consommation Autre .....

#### - Lutte contre les vecteurs contaminants :

- Présence de rongeurs : Oui non
- Présence d'animaux domestiques : oui non lesquels :
- Changement de tenue du personnel : oui non de chaussures : oui non
- Visite fréquente d'autres éleveurs : oui non

#### - Litière :

- Présence de litière épaisse : oui non
- Litière humide par endroits : oui non
- Fréquence d'ajout ou de renouvellement :

#### - Eau de boisson :

- Eau utilisée : SDE Eau de puits Autre :
- Vérification de la potabilité : oui non
- Traitement de l'eau : oui non produit utilisé : dose : fréquence :
- Abreuvoirs utilisés : type : Surélevés : Oui Non  
matière : métallique plastique  
souillés propres Fréquence du nettoyage :  
Quantité :

#### - Aliment :

- Aliment utilisé : Industriel Artisanal
- Matériel utilisé : mangeoires trémies Autre :  
souillés propres Fréquence du nettoyage :  
Quantité :  
Durée d'utilisation des cartons au démarrage :

#### - Fumier :

- Devenir du fumier : Elevage Evacuation Fosse Autre :  
(hors poulailler)
- Contrat avec le maraîchage : oui non

- **Personnel** : Affectation unique à un poulailler : Oui Non  
Etat des vêtements et de chaussures : Sale Propre

### NETTOYAGE DESINFECTION

- **Nettoyage du bâtiment et des abords** : Oui Non
- Surfaces Nettoyées : Sol Plafond Murs
- Méthode de nettoyage : Brosage Autre : ..... Eau Utilisée :  
Détergent : Oui Non Lequel :
- Abords : Propres Sales
  
- **Nettoyage du Matériel** : Oui Non Méthode : Brosage Rinçage Autre : .....
  
- **Première Désinfection** :  
Désinfection Bâtiment : Oui Non Produits Utilisés : ..... Application :  
Méthode : .....
- Dates : Quantité : Durée : .....
- Désinfection Sol : Oui Non Produits utilisés : ..... Application :  
Méthode : .....
- Dates : Quantité : Durée : .....
- Désinfection Matériel : Oui Non Produits Utilisés : ..... Application :  
Méthode : ..... Dates : Quantité : Durée :
- .....
  
- **Vide Sanitaire** : Oui Non Durée : ..... Dates :
  
- **Deuxième Désinfection** : Oui Non Produits Utilisés : ..... Surfaces : .....  
Dates : Quantité : durée :

## ANNEXE 2 : FICHE D'ENQUETE / ABATTAGE

**Numéro de lot :**

**Nombre et Numéro des carcasses achetées :**

Centre d'abattage : ELEVAGE MARCHE AUTRE

Nom du propriétaire du centre :

Date de l'abattage : / /

Personne responsable :

- **Ramassage** : Mise à jeun : alimentaire hydrique Durée

- **Abattage** : Principe de marche en avant respecté dans les opérations d'abattage : Oui Non

Salle d'abattage nettoyable : Oui Non

Personnel affecté à opération précise : Oui Non

Tenue de travail : Oui Non Etat : Sale Propre

- **Saignée** : Horizontale Verticale

Tenue Lâchée

Durée de saignée :

- **Plumaison** : Echaudage : Oui Non Température :

Fréquence de renouvellement de l'eau :

Manuelle Mécanique

Etat de la machine : Propre Sale

Essicotage : Oui Non

Méthode : Couteau Tampon Gex

Main Autre :

Lavage après plumaison : Oui Non

- **Eviscération** : Couteau régulièrement nettoyé : Oui Non

Viscères percées : Oui Non

Gésier ouvert sur les site : Oui Non

Elimination régulière des viscères : Oui Non

Contact des carcasses avec les viscères : Oui Non

- **Finition** : Lavage : Oui Non Eau utilisée :

Frottage : Oui Non

Méthode : Couteau Tampon Gex

Torchon Autre

Type de Bridage : Tête enlevée : Oui Non

Pattes enlevées : Oui Non

Pattes repliées à l'intérieur : Oui Non



Annexe 3 :  
Dénombrement des microorganismes  
Méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C

ensemencement en inclusion

Suspension-mère



-Réalisation des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  en tube de 9 mL de Tryptone-sel  
(Biokar Diagnostics, France)  
tout en déposant 1ml des dilutions choisies dans chacune des boîtes de Pétri.

-Changer de pipette de 2 ml ou de 1 ml à chaque dilution.

-Couler  $\approx$  15 mL de milieu PCA (BioMérieux, France) maintenue en surfusion au bain-marie  
dans chacune des boîtes de Pétri, puis homogénéiser.

-Laisser solidifier. Couler éventuellement une 2<sup>ème</sup> couche de gélose blanche ( $\approx$  5 mL)



Incuber les PCA à 30°C pendant 72 H +/- 3 H (boîtes retournées).



Comptage des colonies



Expression des résultats

**Annexe 4 :**  
**Dénombrement des coliformes**  
**Méthode par comptage des colonies obtenues à 44°C**

Ensemencement en inclusion

Suspension-mère



-réalisation des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  tout en déposant 1ml des dilutions dans chacune des boîtes de pétri.

-Changer de pipette de 2 ml ou de 1 ml à chaque dilution.

-Couler  $\approx 15$  ml de milieu VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar: BIO-RED, France) maintenue en surfusion au bain-marie à  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dans chacune des boîtes de pétri, puis mélanger.

-Laisser solidifier puis couler une seconde couche de VRBL ( $\approx 5$  mL)

Le temps qui s'écoule entre le moment où l'on a distribué l'inoculum dans une boîte et celui où le milieu est coulé ne doit pas excéder 15 min.



Incuber les VRBL à  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 24 H (boîtes retournées)  $\pm 2$ H.

Note : il est important de mettre rapidement en incubation les boîtes après solidification



Comptage des colonies



Expression des résultats

**Annexe 5 :**  
**Dénombrement des Staphylocoques coagulase positifs**  
**Technique avec confirmation des colonies**

-Déposer 0,1 ml des dilutions choisies dans chacune des boîtes de Baird Parker (Sanofi Diagnostics Pasteur, France) préalablement séchées ou 50 µL  
-Changer de pipette à chaque dilution  
-Étaler l'inoculum puis laisser sécher

-Incuber les boîtes 24 h +/- 2 h à 37°C (étuve MEMMERT) puis à nouveau 24 h après avoir marqué les colonies caractéristiques

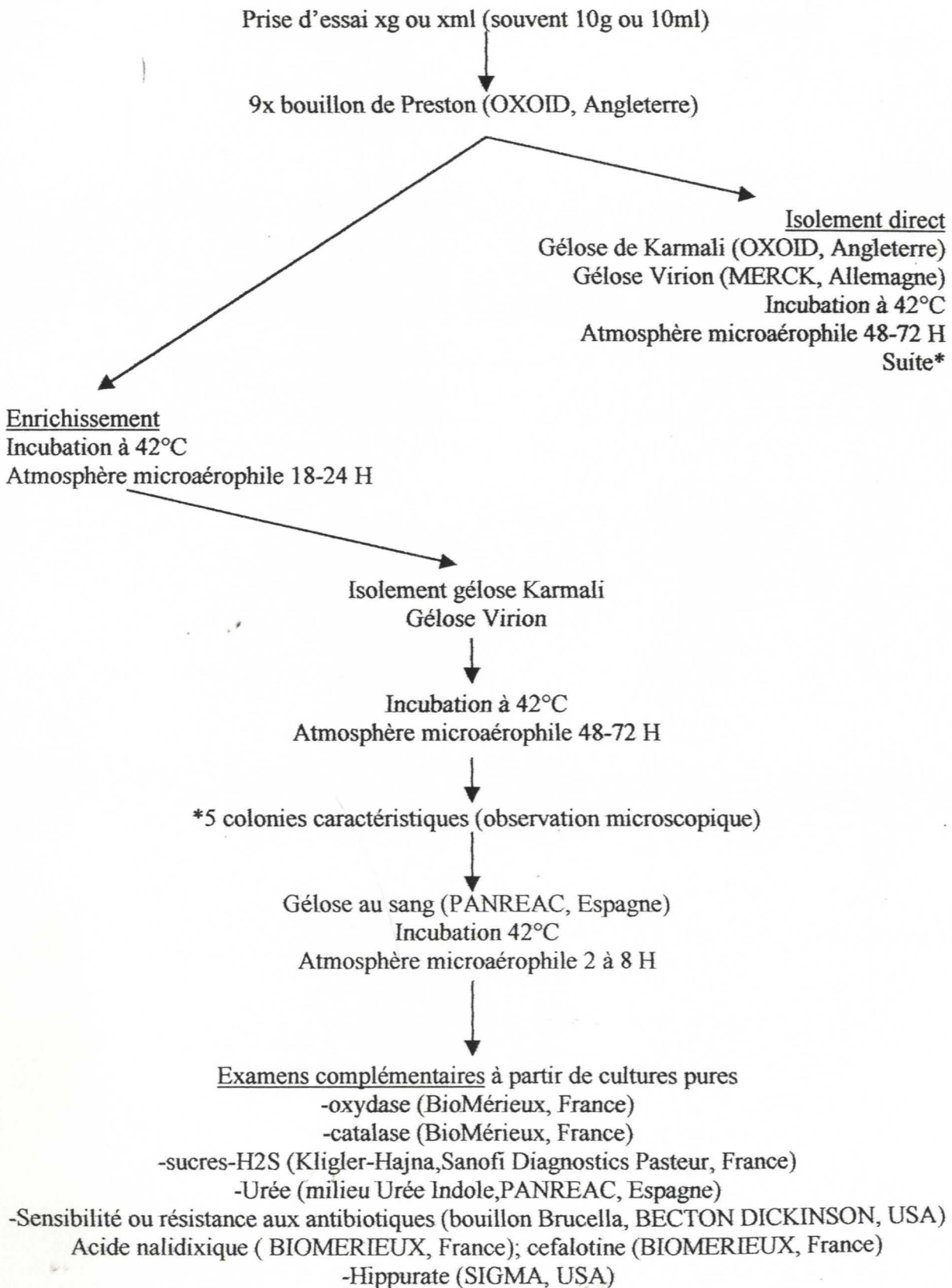
-Colonies caractéristiques = noires ou grises, brillantes et convexes et entourées d'un halo d'éclaircissement.  
-Compter les colonies caractéristiques sur les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies.  
-Compter éventuellement les colonies suspectes.

-Culture sur bouillon BHI (Brain Heart Infusion, PANREAC, Espagne) des colonies sélectionnées (3 colonies caractéristiques et/ou 3 colonies non typiques quand il n'y a pas de colonies caractéristiques)  
Incubation à 37°C pendant 20-24 h

-Recherche de la coagulase libre :  
0,1 ml de chaque culture de BHI, ajouter 0,3 ml de plasma de lapin (BioMérieux, France)  
Incuber 4 à 6 h à 37°C puis 24 h les tubes négatifs à la première lecture

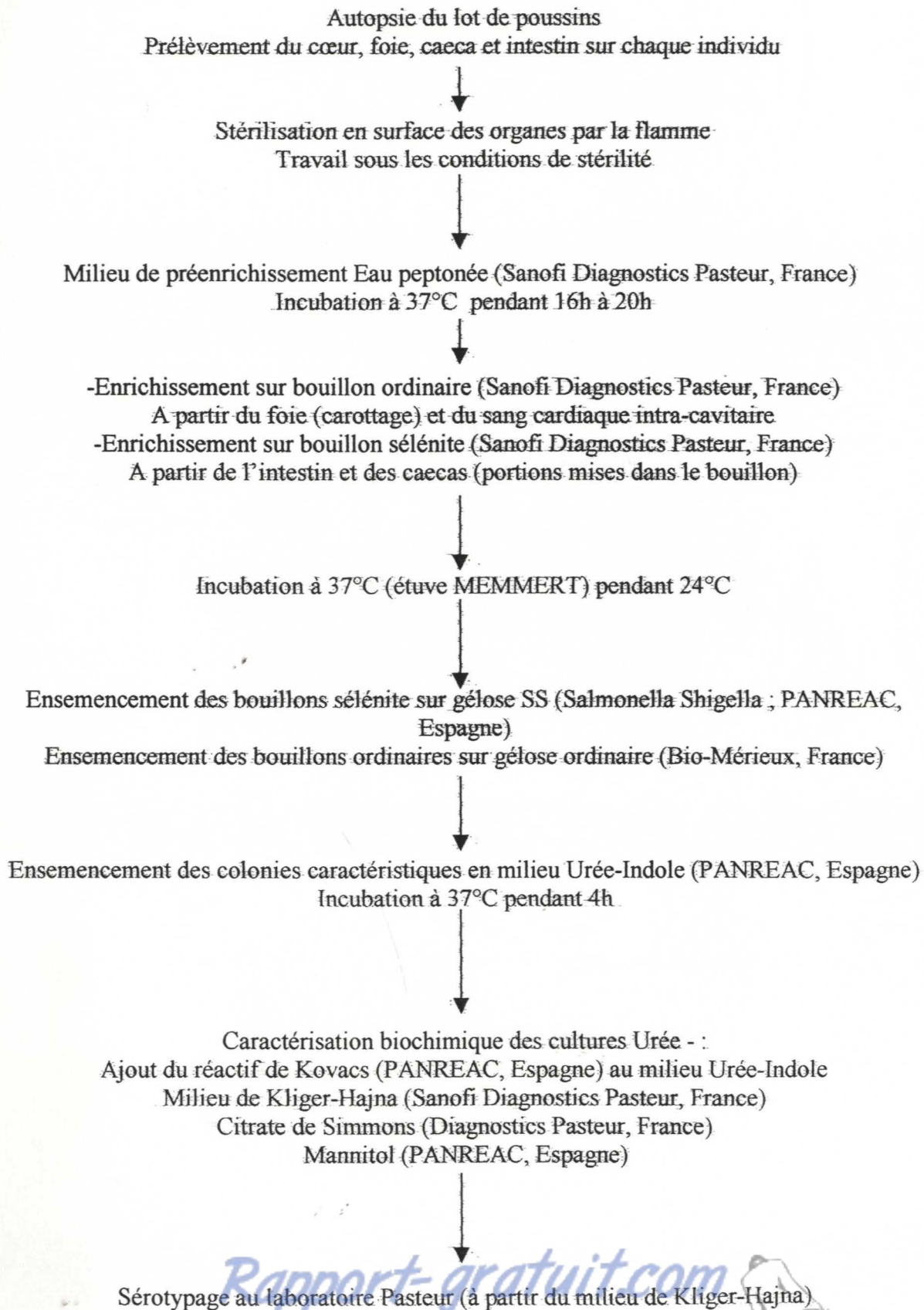
Résultat : + si plus des  $\frac{3}{4}$  du volume est coagulé.

**Annexe 6 : Recherche de *Campylobacter* thermotolérants**





## Annexe 7 : Contrôle salmonelles des poussins d'un jour



Annexe 8 : Recherche des « salmonella »

