



**MASTER  
BGAE-SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT  
SPECIALITE ECOLOGIE FONCTIONNELLE ET DEVELOPPEMENT DURABLE  
PARCOURS EPSÉD  
ELEVAGE DES PAYS DU SUD, ENVIRONNEMENT, DEVELOPPEMENT**

**RAPPORT DE STAGE DE SECONDE ANNEE**

Evaluation de la séroprévalence de *Salmonella* spp. dans les plats préparés à base de porc dans les gargotes d'Antananarivo et détermination des facteurs de risque associés

**Présenté par**

**Monsieur Cédric ABAT**

**Réalisé sous la direction de :**

Dr Eric Cardinale (eric.cardinale@cirad.fr)  
Dr Muriel Maeder (murielnirina@gmail.com).

**Organisme et pays :**

Centre d'Infectiologie Charles Mérieux d'Antananarivo; Madagascar.  
CIRAD; Réunion.

**Période du stage :**

Du 15 Mars 2012 au 15 Août 2012



Date de soutenance : le 07 Septembre 2012

Année universitaire 2011-2012

## Remerciements :

Si repartir à Madagascar a toujours été un rêve depuis mon départ de cette île il y a de cela plus de huit ans, y revenir pour réaliser un stage de 5 mois dans le domaine de l'hygiène alimentaire s'est avéré être l'une des plus extraordinaires aventures qu'il m'ait été donné de vivre, tant sur le plan personnel que professionnel.

C'est pourquoi je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Eric Cardinale pour m'avoir permis de réaliser ce rêve. Je tiens aussi bien évidemment à le remercier pour sa confiance sans cesse renouvelée dans mes capacités, sa patience, sa vision optimiste de mon travail et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier le Dr Muriel Maeder pour la patience dont elle a fait preuve tout au long de mon stage, pour ses conseils tant professionnels que personnels, son analyse critique et juste de mon travail ainsi que pour son optimisme et sa joie de vivre. Bien sûr, je remercie le professeur Luc Hervé Samison, directeur du CICM, et le docteur Bénédicte Contamin d'avoir accepté de m'accueillir pour réaliser ce stage.

Mes pensées vont ensuite naturellement vers l'ensemble de l'équipe du CICM, qu'il s'agisse de mes collègues de travail en laboratoire (Dr Mbola Rakotoniaina, la bonne humeur et le positivisme incarnées) et sur le terrain (Mr Andry Toky Rakotoarivo et Mr Tahinamandranto Rasamoelina (du inséparable de l'HJRA) ainsi que Melle Noro Seheny Ratsimbazafy et Melle Fenitrasoa Randrianarizao (à qui je souhaite bon courage pour la suite de leurs études)) sans lesquels rien n'aurait été possible, mais aussi le personnel administratif (Melle Luciana Fandresena Rakotoarisoa, Mme Alida Rajoelimahefa, Mme Onja Randriamanantena et Mr Olivier Ramarovelonandrasana) avec lequel j'ai partagé de nombreux moments riches en émotions. Enfin, je remercie également tous les autres acteurs travaillant pour le centre pour leur accueil et leur soutien quotidien, plus particulièrement Philibert pour les nombreux *week-ends* où je l'ai fait venir pour m'ouvrir le laboratoire, Francine pour « sa vision éclairée » mon travail et Elysée pour les nombreuses virées en voiture dans la capitale que nous avons faites ensemble pour le travail.

Je tiens aussi à remercier le docteur Anjarasoah Maharavo Rasoanomenjanahary pour toutes les informations fournies sur les gargotes de la capitale ainsi que Michel pour nos nombreuses conversations professionnelles téléphoniques ainsi que sa bonne humeur!

Dans un deuxième temps, je tiens bien évidemment à remercier le Dr Didier Montet pour l'ensemble de nos échanges par mail tout au long de mon stage ainsi que l'ensemble de l'équipe pédagogique et de l'administration du CIRAD de Baillarguet, sans oublier le Pr Catherine Moulia, pour les formations de qualité fournies au cours de cette deuxième année de Master et l'ensemble des conseils tant professionnels que personnels qu'ils m'ont fourni tout au long de cette année d'étude.

Dans un troisième temps, je tiens à remercier l'ensemble de ma famille pour son soutien et son optimisme sans failles tout au long de mon stage, ainsi que mes amis (anciens ou nouveaux, de France ou d'ailleurs) qui ont toujours répondu présent, y compris dans les moments difficiles. Ici, je tiens plus particulièrement à mentionner Alexis Trimoulinard pour m'avoir proposé son aide lors des pratiques de laboratoire à distance à la Réunion.

Enfin, je tiens à remercier tous les propriétaires de gargotes pour le temps qu'ils ont consacré à répondre à nos questions (appelées pour l'occasion questions de *waza*) et pour la nourriture de qualité que j'ai eu le plaisir de découvrir et redécouvrir chaque jour!

## Résumé et mots clefs :

Les toxi-infections alimentaires sont un problème majeur pour les Etats du monde entier. Parmi les causes citées se trouvent les *Salmonella* isolées dans la nourriture vendue dans les restaurants de rue. Madagascar, plus grande île de l'océan indien, possède peu de données exploitables en la matière. Or, ce pays possède une importante population porcine dont une partie de la viande est servie dans les plats des gargotes. C'est pourquoi le gouvernement malgache souhaiterait améliorer sa maîtrise de la qualité microbiologique desdits produits. C'est dans cette logique qu'a été conçue cette étude regroupant la direction des services vétérinaires de Madagascar, le CIRAD, la faculté de médecine et le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux d'Antananarivo. Les objectifs étaient de déterminer la prévalence de *Salmonella* spp. directement présente dans les plats cuisinés à base de porc vendus par les restaurants de rue de la capitale ainsi que de caractériser les facteurs de risques à l'origine des contaminations des plats par ces bactéries. Pour la réaliser, 60 gargotes sélectionnées aléatoirement dans 13 quartiers d'Antananarivo ont été visitées sur une période de 3 mois. Les propriétaires des établissements étaient questionnés sur leurs pratiques de préparation et 3 plats à base de porc étaient achetés à chacun d'eux. Chaque échantillon récolté était ensuite traité suivant un protocole comprenant un pré-enrichissement non-sélectif suivi d'un pré-enrichissement en bouillons sélectifs. Puis, les colonies suspectées d'être des *Salmonella* étaient récupérées à partir de géloses sélectives, confirmées ou infirmées par tests biochimiques puis par la méthode RapID ONE, isolées et sérotypées. En cas de contamination confirmée par *Salmonella* d'un plat échantillonné, le restaurant dont il était issu était défini comme contaminé, constituant ainsi la variable à expliquer. Dès lors, une analyse statistique en plusieurs étapes était réalisée afin de déterminer quelles pratiques de préparation des établissements enquêtés devaient être considérées comme des facteurs de risque. La confirmation des bactéries suspectes par la méthode RapID ONE a permis d'identifier 9 plats contaminés par des salmonelles. Les sérotypages réalisés ont mis en évidence 3 sérotypes, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Newport et *Salmonella* Seftenberg. L'analyse globale des pratiques des gargotiers enquêtés a montré que ces derniers présentaient des lacunes concernant les bonnes pratiques d'hygiène à appliquer dans leur secteur d'activité. Enfin, l'analyse des facteurs de risque réalisée a révélé que, dans le contexte de l'étude, l'utilisation des nappes (OR = 8,83, IC 95% : [1,24-62,2]) et la température de service des plats (OR = 5,41, IC 95% : [1,25-35,22]) étaient fortement associées à l'augmentation du risque de contamination des plats par *Salmonella*. A l'inverse, la situation géographique du quartier de l'établissement enquêté (OR = 0,15, IC 95% : [0,022-0,98]), le type de construction (OR = 0,03, IC 95% : [0,0025-0,29]), le port d'habits spécifiques par les propriétaires (OR = 0,15, IC 95% : [0,018-0,99]) et de couvre-chef intégral par le personnel (OR = 0,05, IC 95% : [0,004-0,57]) semblent associés à une diminution des risques de contamination des plats par les salmonelles. En conclusion de l'étude, une discussion sur les améliorations possibles est finalement proposée au gouvernement malgache.

## Mots clefs :

Restaurants de rue; Plats prêts à consommer à base de porc; *Salmonella*; Facteurs de risque; Madagascar.

## **Abstract and key words :**

Foodborne illnesses are a major problem for governments around the world. Among the reasons cited can be found *Salmonella* isolated from food sold in street restaurants. Madagascar, the largest island of the Indian Ocean, has little usable data on the subject. However, the country owns a large pig population and a part of the pork meat is sold in the street restaurants. That's why the Malagasy government would like to improve his control of the microbiological quality of these products. It's in this sense that this study has been designed with the veterinary services department of Madagascar, CIRAD, Faculty of Medicine and the "Centre Charles Mérieux Infectiologie" in Antananarivo. The objectives of the study were to determine the prevalence of *Salmonella* spp. presents in pork dishes and to characterize the risk factors causing *Salmonella* contamination of the dishes. 60 street restaurants were randomly selected and visited in 13 districts of Antananarivo for 3 months. A questionnaire was submitted to the managers and three ready-to-eat pork dishes were taken from every restaurant. Each sample collected was then treated with a protocol including a non selective pre-enrichment followed by a pre-enrichment in selective broths. Then, colonies suspected of being *Salmonella* were selected on selective media, confirmed or refuted by biochemical and the RapID ONE method tests, isolated and serotyped. If a dish was confirmed to be contaminated by *Salmonella*, the restaurant was defined as contaminated, thus constituting the outcome variable. Therefore, a multiple-stage statistical analysis was carried out in order to determine which preparation practices from studied establishments should be considered as risk factors for the contamination of collected dishes with *Salmonella*. The confirmation of suspicious bacteria by the RapID ONE method identified 9 dishes contaminated with *Salmonella*. The serotyping revealed three serotypes, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Newport and *Salmonella* Seftenberg. The overall analysis of the practices of the surveyed managers showed that they had lacks on good hygiene practices to be applied in their industry. Finally, analysis of risk factors revealed that, in the context of the study, the use of table-cloth (OR = 8.83, IC 95%: [1.24-62.2]) and inadequate cooking temperature for the dishes (OR = 5.41, IC 95%: [1.25-35.22]) were strongly associated with an increasing risk of food contamination by *Salmonella*. Conversely, the district where the establishment come from (OR = 0.15, IC 95%: [0.022-0.98]), the type of construction (OR = 0.03, IC 95%: [0.0025-0.29]), wearing specific clothes by the owners (OR = 0.15, IC 95%: [0.018-0.99]) and wearing a cap which covers all the head of the staff (OR = 0.05, IC 95%: [0.004-0.57]) seem to decrease the risk of contamination. In conclusion of the study, a discussion of possible improvements is finally proposed to the Malagasy Government.

## **Key words :**

Street restaurants;; Pork dishes; *Salmonella*; Risk factors; Madagascar.

## **Abréviations :**

ACSQDA : Agence de Contrôle de la Sécurité Sanitaire et de la Qualité des Denrées Alimentaires.

BMHCUA : Bureau Municipal d'Hygiène de la Commune Urbaine d'Antananarivo.

CICM : Centre d'Infectiologie Charles Mérieux

CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

CS : Citrate de Simmons

DSV : Direction des Services Vétérinaires

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) : Analyse des dangers et maîtrise des points critiques

HE : "Hektoen enteric agar "

LYS : "Lysine iron agar"

MKTTn : Bouillon Muller Kauffman au tétrathionate-novobiocine

MMN : "Mannitol mobility nitrate"

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ONPG : Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside

OR : Odds ratio

PCA : "Plate count agar"

RVS : "Rappaport-Vassiliadis Soja"

TIAC : Toxi-infection alimentaire commune

XLD : "Xylose lysine desoxycholate agar"

## Table des matières :

<b>REMERCIEMENTS :</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUME ET MOTS CLEFS :</b> .....	<b>3</b>
<b>MOTS CLEFS :</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT AND KEY WORDS :</b> .....	<b>4</b>
<b>KEY WORDS :</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATIONS :</b> .....	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES :</b> .....	<b>6</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS :</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION :</b> .....	<b>9</b>
<b>MATERIELS ET METHODES :</b> .....	<b>13</b>
<b>A. MATERIELS :</b> .....	<b>13</b>
<b>B. METHODES :</b> .....	<b>13</b>
<b>I. Préparation de l'étude</b> .....	<b>13</b>
<b>a. Sélection des sites et des établissements à échantillonner :</b> .....	<b>13</b>
<b>b. Nombre de prélèvements :</b> .....	<b>14</b>
<b>c. Questionnaires :</b> .....	<b>14</b>
<b>d. Conservation et identification des échantillons prélevés :</b> .....	<b>14</b>
<b>II. Classification des établissements étudiés</b> .....	<b>14</b>
<b>a. Plats vendus et prix :</b> .....	<b>14</b>
<b>b. Type d'infrastructure et de gérance:</b> .....	<b>14</b>
<b>III. Milieux, réactifs et diluants utilisés lors de l'étude</b> .....	<b>15</b>
<b>IV. Recherche des salmonelles selon la norme NF EN ISO 6579 (2002)</b> .....	<b>15</b>
<b>a. Réalisation des manipulations :</b> .....	<b>15</b>
<b>b. Pré-enrichissement en milieu non-sélectif :</b> .....	<b>16</b>
<b>c. Pré-enrichissement en milieu sélectif liquide RVS et MKTTn :</b> .....	<b>16</b>
<b>d. Isolement :</b> .....	<b>16</b>
<b>e. Lecture des boîtes :</b> .....	<b>16</b>
<b>f. Identification biochimique :</b> .....	<b>17</b>
<input type="checkbox"/> <i>Kligler-Hajna</i> .....	<b>17</b>
<input type="checkbox"/> <i>Test Ortho-nitrophényl-β-galactoside</i> .....	<b>17</b>
<input type="checkbox"/> <i>Test urée indole</i> .....	<b>18</b>
<input type="checkbox"/> <i>Test de la lysine</i> .....	<b>18</b>
<input type="checkbox"/> <i>Test du citrate de Simmons</i> .....	<b>18</b>
<input type="checkbox"/> <i>Mannitol mobilité</i> .....	<b>18</b>
<input type="checkbox"/> <i>Résultats attendus présentés par la majorité des salmonelles</i> .....	<b>19</b>
<b>g. Confirmation des colonies "suspectes" par la méthode RapID ONE :</b> .....	<b>19</b>
<b>h. Sérotypage :</b> .....	<b>19</b>
<b>V. Réalisation des bases de données</b> .....	<b>20</b>
<b>VI. Définition des variables et traitements statistiques</b> .....	<b>20</b>
<input type="checkbox"/> <i>La variable expliquée</i> .....	<b>20</b>
<input type="checkbox"/> <i>Choix des variables explicatives conservées pour le traitement statistique</i> .....	<b>20</b>
<input type="checkbox"/> <i>Traitement statistique</i> .....	<b>20</b>
<b>RESULTATS :</b> .....	<b>22</b>

<b>DISCUSSION :</b> .....	<b>25</b>
<b>A. ANALYSE DU PROTOCOLE</b> .....	<b>25</b>
<b>I. Sélection des quartiers et des établissements échantillonnés</b> .....	25
<b>II. Questionnaires</b> .....	25
<b>III. Nombre de prélèvements</b> .....	25
<b>IV. Recherche des salmonelles</b> .....	25
<b>B. RESULTATS D'ENQUETE, DE CONTAMINATION ET FACTEURS DE RISQUE POUR SALMONELLA</b> .....	<b>26</b>
<b>I. Souches confirmées isolées à partir des échantillons collectés</b> .....	26
<b>II. Analyse des résultats d'enquête et mise en relation avec les résultats du modèle logistique</b>	26
<b>a. Position géographique du site de prélèvement</b> .....	27
<b>b. Type de construction et hygiène de l'établissement</b> .....	27
<b>c. Hygiène du personnel et des gérants</b> .....	27
<b>d. Matériel de préparation et de service des plats</b> .....	28
<b>e. Conditions d'achat, de transport et de livraison de la viande de porc utilisée</b> .....	29
<b>f. Préparation et conservation des plats vendus</b> .....	29
<b>III. Nombre de contaminations observées</b> .....	30
<b>a. Hypothèse principale</b> .....	30
<i>Pratiques des gargotiers</i> .....	30
<b>b. Hypothèses secondaires</b> .....	30
<i>Protocole</i> .....	30
<i>Pratiques des élevages, des abattoirs et des boucheries</i> .....	30
<i>Influence de facteurs externes</i> .....	31
<b>IV. Conclusions et perspectives</b> .....	31
<i>Prévalence de Salmonella dans la chaîne de production du porc malgache</i> .....	31
<i>Conclusion sur les résultats obtenus et propositions au gouvernement malgache</i> .....	31
<b>ANNEXES :</b> .....	<b>33</b>
ANNEXE N°1 : ARRETE INTERMINISTERIEL N°22977/2008 PORTANT REGLEMENTATION DE LA VENTE DES DENREES ALIMENTAIRES PRETES A CONSOMMER .....	33
ANNEXE N°2 : LISTE ET EMPLACEMENT DES QUARTIERS ECHANTILLONNES DURANT L'ETUDE .....	35
ANNEXE N°3 : QUESTIONNAIRE REALISE AUPRES DES PROPRIETAIRES DES RESTAURANTS DE RUE ENQUETES .....	35
ANNEXE N°4 : LISTE DES MILIEUX ET REACTIFS PREPARES EN LABORATOIRE POUR L'ETUDE .....	38
ANNEXE N°5 : PLAN DES DIFFERENTS LOCAUX DU LABORATOIRE DU CICM .....	41
ANNEXE N°6 : PROTOCOLE D'UTILISATION DE LA METHODE RAPID ONE ET FEUILLE DE SUIVI DES RESULTATS.....	42
ANNEXE N°7 : LISTE ET DEFINITION DES VARIABLES EXPLICATIVES NON RETENUES POUR LE MODELE STATISTIQUE .....	46
<b>BIBLIOGRAPHIE :</b> .....	<b>50</b>

## **Table des illustrations :**

<i>Tableau 1 : liste des équipements et consommables nécessaires à l'étude .....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 2 : liste des diluants, milieux de culture et tests biochimiques nécessaires à l'étude .....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 3 : Récapitulatif des caractères présentés par la majorité des salmonelles selon Freney, Renaud, Leclercq et Riegel (2007) et Forsythe et Hayes (1999).....</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 4 : Résultats obtenus après confirmation par la méthode RapID ONE et sérotypage .....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 5 : Liste et définition des variables explicatives retenues (après regroupement de classe) pour le modèle statistique, après test du chi-deux de liaison entre les variables explicatives et la variable expliquée (<math>p &lt; 0,25</math>) et de corrélation entre les variables explicatives (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 6 : Liste des variables explicatives du modèle final d'étude des facteurs de risque réalisée .....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 1 : A gauche, photographie d'une gargote fixe et, à droite, d'une gargote mobile.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 2 : Photographies de boucheries de rue à Antananarivo. ....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 3 : Les différentes étapes initialement réalisées pour la recherche des salmonelles lors de l'étude... </i>	<i>16</i>
<i>Figure 4 : à droite, tube à essai contenant 10 mL de RVS ensemencé avec 0,1 mL de broyat et, à gauche, tube contenant 10mL de MKTTn ensemencé avec 1 mL du même broyat.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 5 : Colonies caractéristiques de salmonelle sur HE (à gauche, colonies vertes à centre noir) et XLD (à droite, colonies rouges à centre noir). ....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 6 : Comparaison d'un tube non-ensemencé (à gauche), d'un tube avec réaction positive pour le glucose et le lactose (au centre) et d'un autre avec forte production de H<sub>2</sub>S et réaction négative pour le lactose (à droite).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 7 : Résultats d'un test ONPG avec, à droite, une réaction négative, et, à gauche, une réaction positive.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 8 : Résultats d'un test urée avec, à droite, une réaction négative, et, à gauche, une réaction positive. ....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 9 : Résultats d'un test de recherche de la lysine décarboxylase avec, à gauche, un tube avant ensemencement, au centre une réaction positive et à droite, une réaction négative.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 10 : Résultats d'un test de citrate de Simmons avec, à gauche, une réaction positive et à droite, une réaction négative. ....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 11 : Résultats d'un test de mannitol mobilité avec, à gauche et à droite, deux réactions négatives et au centre, une réaction positive pour le mannitol. ....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 12 : Résultats d'une confirmation par la méthode RapID ONE. ....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 13 : Résultats obtenus lors d'un sérotypage avec, à gauche, la présence de petits points blancs caractérisant une agglutination des bactéries testées et donc une réaction positive au sérum utilisé et, à droite, une absence d'agglutination (source: Alexis Trimoulinard).....</i>	<i>20</i>



## Introduction :

Les toxi-infections alimentaires sont définies par l'Organisation Mondiale de la Santé comme "des maladies d'origine alimentaire [...], généralement infectieuses ou toxiques [...], causées par des agents qui pénètrent dans le corps lors de l'ingestion d'aliments [contaminés]" (OMS, 2007). Elles surviennent des suites de l'introduction dans un aliment d'un ou plusieurs agents ou substances étrangères de nature diverse (micro-organismes, composés chimiques, matériaux...) (FAO/OMS, 2001). C'est pourquoi elles représentent un important problème de santé publique pour les Etats du monde entier. Lorsqu'elles sont causées par des agents pathogènes, elles peuvent se présenter à la fois sous forme d'infection isolée ou de TIAC (toxi-infection alimentaire commune). Ainsi, et à titre d'exemple, l'OMS a estimée qu'en 2005, 1,8 millions de personnes sont mortes dans le monde des suites d'une maladie diarrhéiques et que la plus grande partie de ces décès est imputable à la consommation de nourriture ou d'eau contaminée (OMS, 2007). Dès lors, elles peuvent plus ou moins entraver la croissance économique des pays affectés (De Jong et Ekdahl, 2006).

Parmi les agents pathogènes les plus souvent rencontrés lors de ces types de contamination se retrouvent des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, plus particulièrement celles du genre *Salmonella* avec plus de 2000 sérotypes (Shilangale, Di Giannatale, Chimwumombe et Kaaya, 2012; Gerner-Smidt et Whichard, 2009; Brenner, Villar, Angulo, Tauxe et Swaminathan, 2000; Quinn, Carter, Markey et Carter, 1994). Il s'agit de bactéries se présentant sous la forme de bâtonnet de petite taille (1 à 2 µm) et dont la réaction à la coloration de Gram (coloration finale rose-rouge et non violette) les classe en bactéries à Gram négatif (Harley et al., 2010). Elles sont facultativement anaérobies et ne sporulent pas. En outre, elles se caractérisent par leur capacité à fermenter le glucose en acides et en gaz et par leur incapacité à utiliser le lactose et le saccharose pour leur besoin. Concernant leurs exigences de température, leur croissance est optimale aux environs de 38°C, tandis qu'elles peuvent être détruites par une élévation de température à la cuisson à 60°C pendant une durée comprise entre 15 et 20 min. Enfin, leur développement est arrêté si cette dernière passe en dessous de 8°C (Dougan, John, Palmer, Mastroeni, 2011; Forsythe et Hayes, 1999 ; Adams et Moss, 1995).

En cas de consommation d'aliments contaminés par *Salmonella enterica* et *S. bongori* (et leurs sérotypes), seules espèces capables d'infecter l'être humain, le consommateur s'expose à une maladie, la salmonellose. Il s'agit d'un terme regroupant à la fois les fièvres entériques (causées entre autre par *Salmonella* sérotypes Typhi et Paratyphi) et les gastro-entérites alimentaires. Cette maladie peut être déclenchée par des sérotypes spécifiques à l'homme mais aussi par ceux infectant normalement d'autres animaux, ces infections sont alors considérées comme des zoonoses (Acha et Szyfres, 2005). Les symptômes associés (hyperthermie, diarrhée, myalgie, douleurs abdominales, maux de tête...) dépendent d'un ensemble de facteurs et de leurs interactions (sérotipe infectant, dose infectante, compétence immunologique vis-à-vis du sérotipe...) et peuvent quelquefois entraîner la mort (Dougan, John, Palmer, Mastroeni, 2011). Ainsi, Majowicz et al. (2010) ont estimé que, chaque année, 93,8 millions de cas de gastroentérites sont dus aux différentes espèces de salmonelle (hors sérotypes à l'origine de la typhoïde) à travers le monde et qu'elles sont à l'origine de 155 000 décès par an.

L'augmentation mondiale de la demande en nourriture, sous la pression démographique galopante et l'exode rurale, a conduit à l'émergence dans de nombreuses capitales (par exemple à Jakarta (Vollaard et al., 2004)) et grandes villes (par exemple Casamance (Dione et al., 2009)) de restaurants de rue. Ces établissements, définis comme des structures "[vendant] sur la voie publique des aliments préparés sur la voie publique et prêts à consommer, ou préparés à la maison et consommés dans la rue sans autre préparation"(FAO/OMS, 2005a), se retrouvent en grand nombre dans de nombreux pays africains (Donkor, Kayang, Quaye et Akyeh, 2009; Chauillac, Bricas, Ategbon, Amoussa et Zohoun 1998; OMS, 1996), cela s'expliquant notamment par la taille de sa

population et son dynamisme démographique (deuxième continent le plus peuplé au monde depuis l'année 2000, selon CEDEAO-CSAO/OCDE, 2007).

Madagascar, plus grande île de l'océan indien dont la population totale est estimée en 2012 par l'Index Mundi à près de 22 000 000 d'habitants, ne déroge pas à la règle. Les gargotes (localement appelés *hotely*) se retrouvent en effet en grand nombre dans la capitale Antananarivo. Elles s'y observent sous différentes formes, allant de la gargote mobile dans un bus aménagé à la structure fixe en bois ou en brique en passant par les restaurants de rue itinérants (figure 1). Lorsque cela est le cas, les vendeurs se retrouvent généralement aux abords de lieux très fréquentés tels que les gares routières, les écoles, les universités, les zones industrielles et les marchés (FAO/OMS, 2005a).



Figure 1 : A gauche, photographie d'une gargote fixe et, à droite, d'une gargote mobile.

Une fois installées dans un quartier, ces structures jouent, comme ailleurs dans le monde, un rôle socio-économique important. En effet, elles attirent chaque jour de très nombreux consommateurs de toutes catégories sociales et de tout âge qui viennent y consommer de nombreux plats (traditionnels ou non traditionnels) à base de fruit, de viande, de poisson, de légume et de céréale, vendus seuls ou mélangés, à consommer sur place ou à emporter. Ainsi, ce type de restaurant représente une source d'alimentation rapide, nutritionnellement correcte, bon marché et facile d'accès (Pikuda et Ielaboye, 2009; Barro et *al.*, 2007; Ekanem, 1998). Or, bien que les prix des plats vendus en gargotes dans la capitale malgache n'excèdent que très rarement 2 000 ariary (soit 0,70 centimes d'euros), il est important de souligner que le salaire minimum d'embauche appliqué sur l'île est de 100 000 ariary pour la majorité des travailleurs (les travailleurs les moins qualifiés du secteur privé, selon l'express de Madagascar n°5190 du 03 Avril 2012) et qu'une grande partie des gens s'y restaurant ont un salaire inférieur à cette valeur (Raharisoa, 2012). Cette source d'aliments représente donc l'un des principaux secteurs de dépense pour les consommateurs réguliers de la capitale.

Par ailleurs, de nombreuses familles dépendent de cette activité. En effet, les revenus tirés de celle-ci contribuent à leur sécurité financière. Dans le cas de la capitale malgache, et selon le Bureau Municipal d'Hygiène de la Commune Urbaine d'Antananarivo (BMHCUA, données non publiées), il existerait 350 gargotes fixes (seuls établissements recensés et déclarés), soit au moins autant de familles ou de personnes seules qui en vivent. En outre, ces dernières représentent une source de création d'emplois non négligeable pour les populations locales (employés en salle ou en cuisine...), ainsi qu'une réelle opportunité pour de nombreuses personnes à faibles revenus désirant créer leur propre entreprise (Rheinländer et *al.*, 2008; FAO/OMS, 2005a).

Enfin, ces restaurants participent activement à l'économie du pays. En effet, des touristes en quête de plats traditionnels préparés selon les us et coutumes locales s'y retrouvent, ce qui contribue à promouvoir le tourisme culinaire (OMS, 1996). En outre, et dans le cas de Madagascar, les droits journaliers que les gargotes "fixes" et déclarées payent à la Commune pour occuper la voie publique représentent une somme non négligeable pour l'Etat malgache (entre 300 et 500 ariary par restaurant de rue pour les 350 établissements concernés) (BMHCUA, données non publiées).

Cependant, et comme le soulignent plusieurs auteurs, les plats qui sont vendus dans ce type de restaurant peuvent présenter un risque sanitaire important pour le consommateur. Il est en effet fréquent que les conditions minimales de préparation (lavage des mains et des ustensiles de préparation avec de l'eau propre et renouvelée, cuisson à température élevée pendant une certaine durée...), de conservation (aliments stockés au froid, à l'abri des insectes, des rongeurs et des déchets...) et de service des aliments ne soient pas ou peu appliquées dans ce type de restaurants. Par ailleurs, toutes les gargotes ne sont généralement pas répertoriées par les Etats, ce qui pose un réel problème aux services des pays concernés affectés au suivi de leurs activités. Enfin, les conditions d'abattage et de stockage de la viande pratiquées par les abattoirs et les boucheries les fournissant en produits carnés laissent souvent à désirer. Il n'est en effet pas anecdotique de constater que la viande se retrouve, après un long transport en taxi ou à dos d'homme, exposée pendant plusieurs heures au soleil, près de la route et des poubelles, sans aucune protection contre la poussière, les insectes et autres animaux, et qu'elle soit manipulée par tous les potentiels acheteurs (figure 2). Or, en temps normal, les salmonelles se retrouvent dans des réservoirs naturels (sols, eau...) ainsi que dans les intestins des animaux. Dès lors, la contamination, croisée ou non, de la viande par ces agents pathogènes lors des différentes pratiques de préparation des viandes "de la fourche à la fourchette" est possible (Choudhury, Mahanta, Sarmah Goswami, Dutta Mazumder, 2011; Abdalla, Sihanm, Alian et Amel, 2008; Gadaga, Samende, Musuna, Chibanda, 2008; Barro et al., 2007 ; Stevens et al., 2006 ; Von Holy et Makhoane, 2006; Oliveira, Carvalho, Fernandes, Tavechio et Domingues Jr, 2005; Mpuchane et al., 2005). Ainsi, Morpeth, Ramadhani et Crump (2009) ont observé que les salmonelles non Typhi sont à l'origine de la majeure partie des contaminations sanguines observées en Afrique subsaharienne et que la nourriture en est l'un des principaux véhicules. A Madagascar, l'OMS a répertoriée que les maladies diarrhéiques, quelle qu'en soit la cause, étaient la 5<sup>ème</sup> source de mortalité des enfants de moins de 5 ans durant l'année 2010 (OMS, 2010).



**Figure 2 : Photographies de boucheries de rue à Antananarivo.**

Face à la menace que représentent ces contaminations, certains pays ou groupes de pays se sont dotés d'outils visant à réduire au maximum les impacts négatifs sur leurs populations et leurs économies de telles maladies. C'est notamment l'objectif du "paquet hygiène", ensemble de textes législatifs adoptés par l'Union Européenne (CGAD, 2006). Un organisme international, le Codex Alimentarius, a même été fondé afin d'élaborer les normes alimentaires internationales visant à la protection de la santé des consommateurs (FAO/OMS, 2001). Cependant, tous les pays ne sont actuellement pas sur le même pied d'égalité, certains peinant encore à mettre en place des mesures efficaces de régulation de la qualité sanitaire de leur production alimentaire et à respecter les normes internationales du Codex. C'est notamment le cas de Madagascar. En effet, comme le mentionne l'express de Madagascar n°4980 du 28 Juillet 2011, l'absence de réglementation concernant sa production de viande (abattoirs ne répondant pas aux normes internationales, par exemple) lui a valu, par le passé et jusqu'à très récemment pour la viande de zébu, l'annulation de l'exportation de tout type de viande produite vers les marchés européens pendant plusieurs années (Razafindramiadana, 2011; Minten, Randrianarisoa, Randrianarison, 2003). Or, le pays possède un

cheptel considérable et diversifié d'animaux d'élevage parmi lequel se retrouve une importante population de porcs en forte expansion (1,3 millions de têtes) sur les Hautes Terres et dans les régions du Sud notamment (80% de la production totale, selon Minten, Randrianarisoa et Randrianarison (2003)), malgré la présence déclarée depuis 1998 des pestes porcines africaines et classique dans le pays (Ministère de l'économie, du commerce et de l'industrie, 2009; Rousset et *al.*, 2001). Après abattage, cette production se retrouve vendue sous diverses formes (plats cuisinés, morceaux de découpe non-cuits, produits transformés...) dont une partie est écoulée dans les plats servis par les restaurants de rue de la capitale.

Conscient, d'une part, des risques encourus par les consommateurs réguliers de produits porcins provenant de gargotes et, d'autre part, des évolutions de réglementation internationale à venir sur les salmonelles dans les aliments à base de porc, le gouvernement malgache souhaiterait améliorer sa maîtrise de la qualité microbiologique desdits produits. En effet, bien que des inspections d'hygiène et des programmes de sensibilisation des gérants basés sur les "cinq clefs pour une alimentation saine" définies par l'OMS (OMS, 2006) soient menées conjointement par l'Agence de Contrôle de la Sécurité Sanitaire et de la Qualité des Denrées Alimentaires (ACSQDA) et du BMHCUA (BMHCUA, données non disponibles) et que des textes officiels encadrant l'activité de ces restaurants existent (par exemple l'arrêté interministériel n°22977/2008 présenté annexe 1) (Razakarivony, 2010 ; FAO/OMS, 2005b), aucun état des lieux de la qualité sanitaire des aliments à base de porc vendus dans la capitale n'a été mené. C'est dans cette logique qu'a été conçue cette étude regroupant la direction des services vétérinaires de Madagascar, le CIRAD, la faculté de médecine et le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) d'Antananarivo.

Au cours de celle-ci, plusieurs restaurants de rue ont été visités et échantillonnés afin de tenter de déterminer la prévalence de *Salmonella* spp. directement dans les plats cuisinés à base de porc. Par ailleurs, l'étude vise à caractériser les facteurs de risques majeurs à l'origine de la présence de cette bactérie dans ces plats prêts à être consommés et ainsi promouvoir des mesures aptes à limiter le risque pour les consommateurs.

## Matériels et méthodes :

### A. Matériels :

L'analyse de *Salmonella* dans les plats prêts à être consommés dans les restaurants de rue a nécessité les équipements, consommables, diluants, milieux de culture et réactifs listés dans les tableaux ci-après (tableaux 1 et 2) :

**Tableau 1 : liste des équipements et consommables nécessaires à l'étude**

✓ Équipements :	✓ Consommables :
- Glacières	- Boîtes de Pétri
- Balance de précision	- Barreau magnétique
- Hotte P2 à flux laminaire	- Pipette Pasteur
- Plaque chauffante magnétique	- Pissettes
- Sacs de congélation	- Gants en latex
- Feutres indélébiles	- Bêchers d'un litre
- Thermomètre	- Cure dents
- Autoclave	- Pipettes graduées
- Etuves	- Propipette
- Micro-onde	- Micropipettes 200 et 1000µL
- Mixeur	
	- Tubes à essai
	- Flacons à vis gradués
	- Alcool à 70°
	- Papier absorbant
	- Cryotubes

**Tableau 2 : liste des diluants, milieux de culture et tests biochimiques nécessaires à l'étude**

✓ Solvants :	✓ Milieux de culture solides et liquides :	✓ Tests biochimiques :
- Eau peptonnée tamponnée	- Bouillon RVS	- Milieu "Lysine iron agar"
- Eau physiologique	- Bouillon MKTTn	- Milieu "Mannitol mobility"
	- Milieu nutritif PCA	- Milieu Citrate de Simmons
	- Gélose sélective XLD	- Gélose Kligler-Hajna
	- Gélose sélective HE	- Réactif Urée-indole
		- Réactif ONPG
		- Galeries, liquide d'inoculation et réactifs RAPIDONE

### B. Méthodes :

#### I. Préparation de l'étude

##### **a. Sélection des sites et des établissements à échantillonner :**

L'étude a été menée du 15 Mars 2012 au 15 Août 2012 et a porté sur 60 restaurants de rue de la capitale malgache, Antananarivo. Afin de la réaliser, il a fallu dans un premier temps sélectionner les quartiers de la capitale à échantillonner. Une carte de la capitale a donc été achetée afin d'identifier les 13 quartiers à visiter (annexe 2). Ces derniers ont été choisis dans la mesure où des gargotes y étaient installées. Le point zéro de l'étude a quant à lui été placé au lac Anosy (Lac Anosy, annexe 2). En effet, ce quartier représente un site de première importance pour les activités économiques et administratives de la capitale.

La sélection des établissements à échantillonner et questionner sur le terrain a été soumise à un choix aléatoire, en utilisant la technique de la pièce. Le côté « pile » de la pièce représentait les établissements situés sur la droite et le côté « face » ceux situés sur la gauche. Bien entendu, l'échantillonnage des établissements sélectionnés était soumis à l'accord de leurs propriétaires et chacun d'entre eux était visité une seule fois durant toute l'étude.

### **b. Nombre de prélèvements :**

Initialement, l'étude devait porter sur 140 établissements de la capitale (32 boucheries et 108 gargotes). Par ailleurs, trois échantillons (plats à base de porc ou morceaux de viande selon la nature de l'établissement) devaient être collectés pour chacun d'eux.

Cependant, les objectifs initiaux ont dû être revus à la baisse du fait d'un ensemble d'imprévus (manque de matériel et d'enquêteurs...). C'est pourquoi il a finalement été décidé que l'étude se concentrerait uniquement sur les gargotes. Ainsi, 60 gargotes et 5 boucheries ont été visitées, et 178 échantillons de gargotes et 13 de boucheries ont finalement été collectés, ces derniers n'ayant servi qu'à tester et valider le protocole suivi et n'ayant pas été considérés lors de l'analyse finale.

Le nombre d'échantillons prélevés et de gargotes enquêtées par quartier a été calculé en fonction du nombre d'établissements qui y étaient installés. Cependant, pour les quartiers les plus denses en restaurants de rue, un nombre maximum de gargotes à ne pas dépasser était défini, ceci afin que l'échantillonnage reste le plus représentatif de la situation de la capitale.

*Remarque:* Si une gargote ne proposait pas trois plats différents à base de porc, les enquêteurs allaient échantillonner une gargote contiguë présentant des liens de parenté et les mêmes pratiques de préparation que celle questionnée. Les plats ainsi achetés étaient considérés comme étant issus d'une seule et même gargote.

### **c. Questionnaires :**

L'étude réalisée dépendait aussi bien des prélèvements que des questionnaires réalisés lors des échantillonnages, la qualité de ces derniers était indispensable afin de fournir le maximum d'informations sur les pratiques des commerçants de viande de porc locaux. C'est pourquoi ces derniers ont été testés dans 4 établissements et corrigés lors de la première semaine d'échantillonnage. Par ailleurs, et dans le même but, une formation préliminaire des enquêteurs a été réalisée. Pour récolter l'ensemble des informations d'intérêts, deux questionnaires avaient initialement été élaborés, l'un pour les boucheries et l'autre pour les gargotes. Au final, seul celui portant sur les gargotes a été conservé pour le reste de l'étude. Ce dernier comportait 58 questions dont la majorité (78%) était des questions fermées proposant les réponses les plus vraisemblables dans le contexte malgache (annexe 3). En outre, il présentait des informations renseignant sur les établissements et leurs propriétaires afin de les identifier avec précision.

### **d. Conservation et identification des échantillons prélevés :**

Une fois les questionnaires réalisés, les plats à base de porc étaient achetés, mis dans des sacs de congélation à usage unique et ramenés au laboratoire en moins de deux heures dans des glacières. Pour reconnaître les différents plats, un code avait été élaboré: l'étude se déroulant à Madagascar, le début du code commençait par MG. Puis, le nom du quartier de prélèvements était renseigné par trois lettres spécifiques à chacun d'entre eux. Une lettre définissant le type d'établissement échantillonné y était ajoutée. Enfin, le numéro du prélèvement était noté en commençant par 0001... suivi de deux chiffres désignant le mois.

## **II. Classification des établissements étudiés**

### **a. Plats vendus et prix :**

Madagascar présente une gastronomie très diversifiée. Une partie de cette richesse se retrouve représentée par les nombreux plats traditionnels à base de porc vendus dans les restaurants de rue de la capitale. Il s'y retrouve en effet par exemple le "ravitoto sy henakisoa" (ragoût de porc et feuilles de manioc pilées), le "henakisoa sy voanjobory" (porc et pois Bambara) ou le "henakisoa sy tsaramaso" (littéralement "porc aux haricots"). Afin de prendre en compte cette diversité, le nom des plats échantillonnés était noté dans le questionnaire de chacun des établissements (annexe 3).

### **b. Type d'infrastructure et de gérance:**

Différentes catégories de gargotes se retrouvent dans la capitale malgache. C'est pourquoi une classification des structures a été réalisée dans le questionnaire en se basant, dans un premier temps, sur le type d'infrastructure échantillonné. Ainsi, les établissements se présentant sous la forme de bus aménagés étaient classés comme des gargotes mobiles. Concernant les structures en bois et en brique, elles étaient différenciées les unes des autres. Enfin, les vendeurs ambulants (c'est-à-dire dont la structure de vente était simple et démontable) étaient classés dans la catégorie gargotes en plein air.

Dans un deuxième temps, les établissements étaient classés selon leur mode de gérance. Ainsi, il pouvait s'agir d'entreprises indépendantes ou familiales, ou bien de structures appartenant à une société.

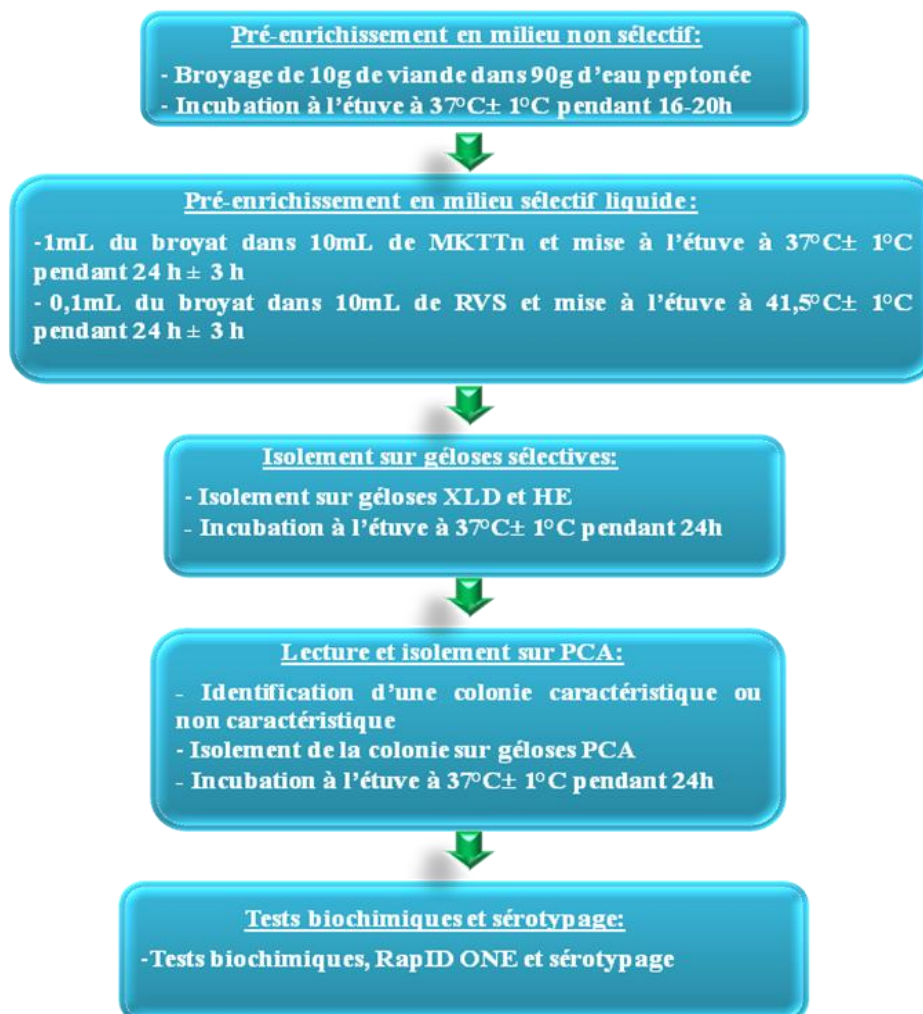
### **III. Milieux, réactifs et diluants utilisés lors de l'étude**

Les milieux, réactifs et diluants utilisés lors de l'étude ont été produits suivant leurs modes de préparation respectifs (annexe 4). Les quantités de poudre étaient pesées sur une balance de précision. Concernant le chauffage des différentes préparations, il était réalisé selon la cuisson préconisée soit à l'autoclave, soit avec une plaque chauffante.

### **IV. Recherche des salmonelles selon la norme NF EN ISO 6579 (2002)**

#### **a. Réalisation des manipulations :**

L'ensemble des étapes (figure 3) étaient réalisées par une même équipe de laboratoire. En outre, et dans un souci de stérilité, l'ensemble de ces pratiques ont été réalisées sous une hotte P2 à flux laminaire vertical (laboratoire n°13 annexe 5), avec du matériel stérile ou stérilisé au laboratoire (pipettes graduées, pipettes Pasteur, öses, boîtes de Pétri, alcool à 70°...).



**Figure 3 : Les différentes étapes initialement réalisées pour la recherche des salmonelles lors de l'étude.**

**b. Pré-enrichissement en milieu non-sélectif :**

Pour chaque échantillon acheté, une prise d'essai de 10g était découpée et introduite dans 90g d'eau peptonée. Puis, l'ensemble était mixé avec un mixeur à tête mobile. Enfin, le broyat était introduit dans un nouveau sac de congélation identifié avec le numéro de l'échantillon d'origine et était mis à l'étuve pendant 16 à 20 h à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**c. Pré-enrichissement en milieu sélectif liquide RVS et MKTTn :**

Pour chacun des broyats, 100  $\mu\text{L}$  et 1 mL étaient prélevés pour les introduire respectivement dans 10mL de bouillon RVS et MKTTn. Puis, les tubes étaient annotés de leur numéro d'échantillon et incubés à l'étuve séparément à  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pour le milieu RVS et à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pour le milieu MKTTn pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  (figure 4)



**Figure 4 : à droite, tube à essai contenant 10 mL de RVS ensemencé avec 0,1 mL de broyat et, à gauche, tube contenant 10mL de MKTTn ensemencé avec 1 mL du même broyat.**

**d. Isolement :**

A partir des bouillons RVS et MKTTn, l'ensemencement des boîtes de Pétri des milieux XLD et HE a été réalisé avec une öse stérile. Par ce procédé, le broyat d'un échantillon était étalé sur une boîte de chacun des deux milieux (figure 3). Puis, les boîtes étaient annotées de leur numéro d'échantillon, la date du jour de manipulation, leur bouillon de provenance et leur milieu d'isolement (par exemple MGTSI/B/0001/04/RVS/HE pour un broyat pré-enrichi dans un bouillon RVS et étalé sur un milieu HE). Enfin, elles étaient incubées à l'étuve pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**e. Lecture des boîtes :**

Les milieux XLD et HE présentent, entre autre, trois sucres (lactose, saccharose et xylose pour XLD, lactose, saccharose et salicine pour HE) (Delarras, 2007; Joffin et Leyral, 2006) dont les dégradations font changer la couleur des géloses grâce à un indicateur de pH (rouge de phénol pour le premier, bleu de bromothymol et fuchsine acide pour le second).

Les colonies rouges et les colonies vertes avec ou sans centre noir étaient respectivement recherchées et collectées sur les géloses XLD et HE (figure 5). En effet, de telles colonies étaient suspectées d'appartenir à des salmonelles car incapables d'utiliser les sucres en présence et souvent capables de produire du  $\text{H}_2\text{S}$  (Joffin et Leyral, 2006). Une fois identifiées, de telles colonies étaient numérotées par un code d'identification propre à chacune. Puis, elles étaient isolées sur gélose nutritive PCA et mises à incuber à l'étuve à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . A la fin de l'étude, 220 colonies avaient été isolées.





**Figure 5 : Colonies caractéristiques de salmonelle sur HE (à gauche, colonies vertes à centre noir) et XLD (à droite, colonies rouges à centre noir).**

*Remarques:* - Les boîtes d'isolements sélectifs de colonie CC (colonie caractéristique) ou CNC (colonie non caractéristique) étaient conservées pour pouvoir reprendre des colonies en cas de mauvais choix lors du premier repiquage.

- Les milieux nutritifs PCA ont été rapidement remplacés par des milieux XLD pour l'isolement des bactéries conservées pour s'assurer de leur pureté.

- Les boîtes de Pétri d'isolement étaient toutes conservées à +4°C jusqu'à la fin de l'étude.

#### **f. Identification biochimique :**

*NB:* - tous les tests biochimiques cités ci-dessous étaient incubés à l'étuve à 37°C ± 1°C pendant 24 h ± 3 h.

- après un mois de pratique du protocole, seuls les tests Kligler-Hajna, urée-indole, ONPG et CS étaient réalisés sur les colonies suspectées. Pour les deux dernières semaines de manipulation, en l'absence d'ONPG et d'urée-indole, seuls les deux autres tests ont été réalisés.

- *Kligler-Hajna*

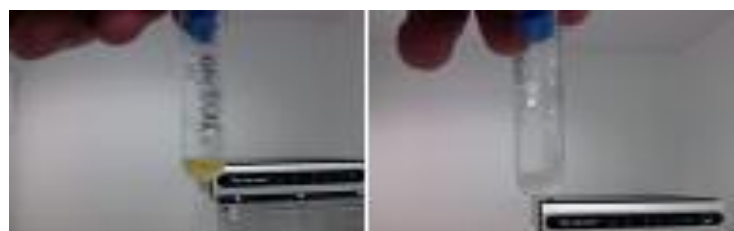
Les colonies CC ou CNC retenues lors de la précédente étape étaient repiquées sur milieu Kligler-Hajna avec une öse. En pratique, ce milieu était coulé penché afin d'avoir une large pente et un culot suffisant (2-3cm d'épaisseur). Ainsi, il permettait de mettre en évidence l'utilisation du glucose et du lactose par les bactéries ainsi que leurs capacités à produire du gaz et du H<sub>2</sub>S. En effet, le jaunissement du culot, après passage à l'étuve, indiquait que la bactérie pouvait utiliser le glucose, tout comme celui de la pente pour le lactose. Un décollement de la gélose indiquait quant à lui une production de gaz par la bactérie. Enfin, une coloration noire de la gélose signifiait que celle-ci pouvait produire du H<sub>2</sub>S (figure 6) (Joffin et Leyral, 2006; Quinn, Carter, Markey et Carter, 1994).



**Figure 6 : Comparaison d'un tube non-ensemencé (à gauche), d'un tube avec réaction positive pour le glucose et le lactose (au centre) et d'un autre avec forte production de H<sub>2</sub>S et réaction négative pour le lactose (à droite).**

- *Test Ortho-nitrophényl-β-galactoside*

Ce test permettait de savoir si la bactérie testée possédait l'enzyme β-galactosidase. Pour cela, le tube contenant le test liquide était ensemencé avec une colonie isolée récupérée sur une öse. Après passage à l'étuve, une coloration jaune du milieu indiquait que l'ONPG en suspension était dégradée et que la bactérie avait cette enzyme. A l'inverse, une absence de coloration indiquait qu'elle ne la possédait pas (Joffin et Leyral, 2006) (figure 7).



**Figure 7 : Résultats d'un test ONPG avec, à droite, une réaction négative, et, à gauche, une réaction positive.**

- *Test urée indole*

Ce test permettait de déterminer si la bactérie testée pouvait hydrolyser l'urée et produire de l'indole par dégradation du tryptophane. Le tube contenant l'urée était ensemencé, avec une öse, avec la bactérie isolée. Après passage à l'étuve, une coloration rouge-fushia du milieu indiquait l'hydrolyse de l'urée en suspension et une alcalinisation du milieu. A l'inverse, une réaction négative était observée lorsque le tube restait de couleur jaune. Pour la recherche de l'indole, l'apparition d'un anneau rouge après ajout de 2 gouttes de réactif de Kovacs révélait sa présence (Joffin et Leyral, 2006) (figure 8).



**Figure 8 : Résultats d'un test urée avec, à droite, une réaction négative, et, à gauche, une réaction positive.**

- *Test de la lysine*

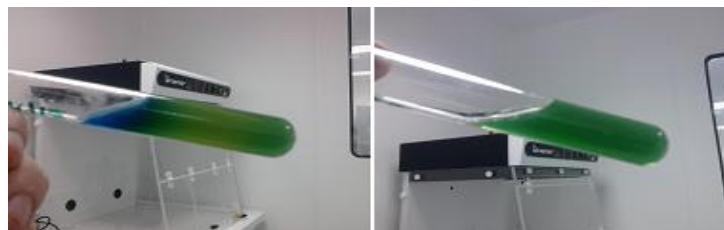
Ce test permettait de déterminer si la bactérie testée pouvait produire de la cadavérine par action de la lysine décarboxylase. La colonie à étudier était ensemencée sur la pente de la gélose LYS à l'aide d'une öse. Ici, une réaction positive se traduisait par un trouble et une coloration violette du milieu. A l'inverse, une réaction négative se traduisait par une coloration partiellement jaune de ce dernier (Joffin et Leyral, 2006) (figure 9).



**Figure 9 : Résultats d'un test de recherche de la lysine décarboxylase avec, à gauche, un tube avant ensemencement, au centre une réaction positive et à droite, une réaction négative.**

- *Test du citrate de Simmons*

La colonie à étudier était ensemencée sur la pente de la gélose CS avec une öse. Ce test permettait de savoir si les bactéries pouvaient utiliser le citrate comme seule source de carbone. Une réaction positive était observée par un virage au bleu du gel. A l'inverse, une réaction négative se traduisait par une coloration inchangée du milieu (Joffin et Leyral, 2006) (figure 10).



**Figure 10 : Résultats d'un test de citrate de Simmons avec, à gauche, une réaction positive et à droite, une réaction négative.**

- *Mannitol mobilité*

Ce test permettait de déterminer si la bactérie testée était mobile et si elle pouvait utiliser le mannitol comme seule source de carbone. La colonie était ensemencée dans un tube contenant le milieu MMN avec une pipette Pasteur. Une réaction positive de mobilité se traduisait par un trouble

du milieu. Par ailleurs, une coloration jaune de ce dernier traduisait l'utilisation du mannitol par la bactérie (Joffin et Leyral, 2006) (figure 11).



Figure 11 : Résultats d'un test de mannitol mobilité avec, à gauche et à droite, deux réactions négatives et au centre, une réaction positive pour le mannitol.

- *Résultats attendus présentés par la majorité des salmonelles*

L'ensemble des résultats attendus pour les salmonelles pour les différents tests biochimiques réalisés étaient les suivants (tableau 3). Toutefois, si une colonie retenue sur milieu d'isolement ne produisait pas de H<sub>2</sub>S ou de gaz mais présentait les autres caractéristiques recherchées lors du test Kligler-Hajna, elle était conservée et subissait les autres tests.

Tableau 3 : Récapitulatif des caractères présentés par la majorité des salmonelles selon Freney, Renaud, Leclercq et Riegel (2007) et Forsythe et Hayes (1999)

Glucose	Kligler-Hajna		Gaz	ONPG	Urée / indole		LYS	CS	Mobilité
	Lactose	H <sub>2</sub> S			-	-			
+ ou illisible	-	+	+	-	-	-	+	+/-	+

**g. Confirmation des colonies "suspectes" par la méthode RapID ONE :**

En cas de suspicion concernant une colonie testée biochimiquement, celle-ci était confirmée ou infirmée par la méthode RapID ONE en suivant le protocole indiqué fourni avec le *kit* (annexe 6). En effet, les plaquettes d'étude présentent un ensemble de tests biochimiques basés sur l'utilisation, par les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, de substrats spécifiques dont la dégradation est mise en évidence par plusieurs indicateurs colorés (figure 12).

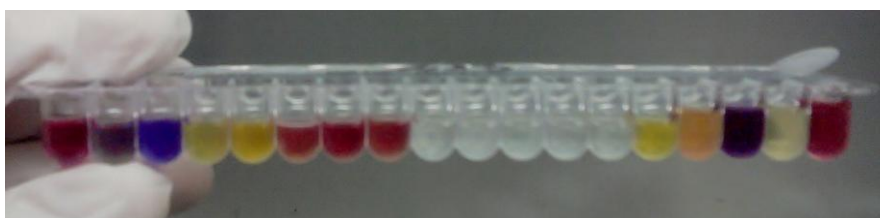


Figure 12 : Résultats d'une confirmation par la méthode RapID ONE.

**h. Sérotypage :**

Une fois les souches de salmonelle sélectionnées après confirmation biochimique et RapID ONE, celles-ci étaient collectées dans des cryotubes contenant de l'eau peptonée et du glycérol (à hauteur de 25%) et maintenues au froid à -20°C jusqu'à leur envoi au CIRAD de la Réunion. Elles y étaient par la suite sérotypées suivant le schéma de Kauffmann-White-Le Minor. Pour se faire, le sérotypage était dans un premier temps réalisé à partir de sérums agglutinants polyvalents anti-O (antigène somatique) et anti-H (antigène flagellaire). Puis, en cas d'agglutination constatée avec l'un des sérums polyvalents utilisé (figure 13), les sérums monovalents correspondants étaient utilisés pour affiner l'identification (Freney, Renaud, Leclercq et Riegel, 2007; Brenner, Villar, Angulo, Tauxe et Swaminathan, 2000).

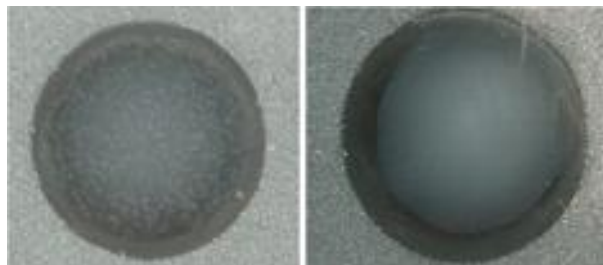


Figure 13 : Résultats obtenus lors d'un sérotypage avec, à gauche, la présence de petits points blancs caractérisant une agglutination des bactéries testées et donc une réaction positive au sérum utilisé et, à droite, une absence d'agglutination (source: Alexis Trimoulinard).

## V. Réalisation des bases de données

Les réponses récoltées lors des questionnaires étaient regroupées par une seule personne dans une base de données. Afin de retranscrire avec exactitude ces informations, un codage simple avait été élaboré:

- pour les questions à choix unique (hors question de type "oui-non"), une ou plusieurs lettres indiquaient la réponse donnée par la personne interrogée.
- pour les questions à choix multiple (ou de type "oui – non"), un code chiffré était préféré. Ainsi, en donnant une valeur à chaque réponse possible, la somme finale permettait de retrouver les différentes réponses données par un commerçant. Bien entendu, un tel codage devait présenter des chiffres dont les différentes combinaisons de somme ne donnaient jamais la même valeur finale.

## VI. Définition des variables et traitements statistiques

- *La variable expliquée*

A la suite des analyses de laboratoire, un restaurant de rue était déclaré contaminé par des salmonelles si au moins l'un des 3 échantillons de ce restaurant se révélait être positif à *Salmonella*. Dans la base de données, cette information était retranscrite par une variable dichotomique expliquée: gargote contaminée (1) vs non contaminée (0).

- *Choix des variables explicatives conservées pour le traitement statistique*

Une fois la base de données achevée, une première sélection des variables d'intérêt a été réalisée. Seules les variables pouvant expliquer les contaminations observées étaient conservées pour être traitées statistiquement. A titre d'exemple, si une variable n'offrait pas d'information pouvant expliquer le statut sanitaire des restaurants de rue (par exemple le nombre de clients par semaine), elle n'était pas conservée. Par ailleurs, les classes de certaines variables ont regroupées lors de réagrégations pour permettre leur étude du fait du faible nombre d'établissements échantillonnés (tableaux 5 et 6).

- *Traitement statistique*

L'analyse statistique visant à déterminer les relations entre les variables explicatives et la variable expliquée a été réalisée en deux étapes et selon le même mode opératoire que celui suivi par Cardinale, Perrier Gros-Claude, Tall, Guèye et Salvat (2005). Dans un premier temps, une analyse univariée a été réalisée afin de déterminer quelles variables explicatives étaient les plus liées à la variable expliquée. Initialement, des tests du  $\chi^2$  simples ( $p < 0,25$ ) devaient être réalisés. Cependant, la faiblesse des effectifs théoriques calculés lors des différents tests a conduit à préférer le test du  $\chi^2$  avec correction de Yates (lorsqu'au moins un effectif théorique calculé était strictement inférieur à 5 mais supérieur ou égale à 3) ou le test exact de Fisher (lorsqu'au moins un effectif théorique calculé était strictement inférieur à 3) (Ancelle, 2011; Valleron, 2007; Bouyer, 1996).

Une fois ces tests réalisés, les variables explicatives restantes étaient testées entre elles. Il s'agissait ici de choisir les variables qui expliquaient le mieux les résultats et d'éviter ainsi tout phénomène de multicollinéarité affectant les modèles ayant trop de variables et leurs résultats (Martin, 1997). Pour se faire, la technique a consisté à tester les relations existantes entre les variables explicatives prises

deux à deux par l'intermédiaire d'un test d'indépendance du  $\chi^2$ . Ici aussi, lorsque l'un des effectifs théoriques calculés était trop faible, un test du  $\chi^2$  avec correction de Yates ou un test exact de Fisher était réalisé. Dès lors, lorsqu'une forte relation de dépendance était mise en évidence entre deux variables testées (p-value obtenue  $<0,05$ ), celle qui présentait la plus forte relation avec la variable expliquée (celle dont la p-value était la plus faible lors des tests du  $\chi^2$  réalisés entre la variable expliquée et les variables explicatives) était conservée et intégrée dans un modèle de régression logistique multiple.

La seconde étape consistait à réaliser un modèle de régression logistique reprenant les variables explicatives conservées et la variable expliquée (tableau 6). La contribution de chacune des variables explicatives intégrées au modèle était dans un premier temps testé par le biais d'un test du chi-deux par méthode ascendante (c'est-à-dire par ajout successif des variables explicatives conservées au modèle et comparaison des modèles obtenus avec le modèle de départ), puis descendante (c'est-à-dire l'inverse). Parallèlement, la sélection automatique du modèle le plus simple par rapport au modèle de départ était effectuée. N'était alors conservé que celui dont l'indice AIC était le plus faible et pour lequel les effets des facteurs intégrés étaient significatifs ( $p < 0,10$ ) (Akaike, 1974). Par la suite, l'ajustement du modèle final (et donc sa vraisemblance) était vérifié par des tests du chi-deux et de déviance (comparaison du modèle saturé (modèle dont les prévisions sont parfaites) au modèle final conservé, p-value obtenue  $<0,05$ ) puis par le test d'Hosmer et Lemeshow (Hosmer et Lemeshow, 2000). A noter que les interactions entre facteurs n'ont pas été testées à cause de la trop faible taille de notre échantillon.

## Résultats :

Le tableau 4 reprend les résultats des confirmations par la méthode RapID ONE et des sérotypages de la plupart des souches de salmonelle isolées.

**Tableau 4 : Résultats obtenus après confirmation par la méthode RapID ONE et sérotypage**

Entérobactéries isolées	Nombre d'échantillons contaminés	Pourcentage d'échantillons contaminés par rapport au nombre d'échantillon total (% arrondis)	Nombre de restaurants contaminés	Pourcentage de restaurants contaminés (% arrondis)
<i>Proteus mirabilis</i>	16	9	13	21,7
<i>Salmonella</i> spp. <sup>(a)</sup> <i>Salmonella</i> Typhimurium (4) <i>Salmonella</i> Seftenberg (3) <i>Salmonella</i> Newport (2) Autres sérotypes en attente de sérotypage (4)	9	5	6	10
<i>Shigella</i> spp.	3	1,7	3	5
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1,1	2	3,4
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,6	1	1,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1,1	2	3,4
<i>Yersinia kristensenii</i>	1	0,6	1	1,7

<sup>a</sup> : nombre de souche de *Salmonella* isolée appartenant à chaque sérotype ou n'ayant pas encore été sérotypée.

Le tableau n°5 reprend les réponses données pour les 11 variables explicatives (après ré-agrégations) finalement retenues pour le modèle de régression logistique.

**Tableau 5 : Liste et définition des variables explicatives retenues (après regroupement de classe) pour le modèle statistique, après test du chi-deux de liaison entre les variables explicatives et la variable expliquée (p<0,25) et de corrélation entre les variables explicatives (p<0,05).**

Variables	Classes	Pourcentages des restaurants concernés par les différentes classes
Quartier d'origine de l'établissement enquêté	Nord (Ambohimanarina, Besarety, Andravoangy, Analakely, Ankatso)	55
	Sud (Anosibe, Fasankarana, Mahamasina, 67ha, Isotry/Ampefiloha, Anosy, Ambodivona)	45
Type de construction	Plein air	10
	Mobile	5
	Bois	28,3
	Brique	56,7

<i>Variables</i>	<i>Classes</i>	<i>Pourcentages des restaurants concernés par les différentes classes</i>
Habits spécifiques pour le(s) propriétaire(s)	Non	56,7
	Oui	43,3
Habits et uniformes lavés	Non	56,7
	Oui	43,3
Couvre-chef intégral pour le personnel	Non	58,3
	Oui	41,7
Usage de nappes	Non	76,7
	Oui	23,3
Température relevée des plats à base de porc	< 30°C	20
	Entre 30°C et 52,5°C compris	55
	> 52,5°C	25
Conservation des invendus d'un jour sur l'autre	Non	86,7
	Oui	13,3
Protection contre le soleil	Non	26,7
	Oui	73,3
Nettoyage des abords de l'établissement	Non	35
	Oui	65
Etat général de l'établissement	Mauvais	18,3
	Moyen	48,3
	Bon	33,3

Les résultats du modèle finalement retenu sont présentés ci-après (tableau 6). Les intervalles de confiance à 95% des OR calculés à partir de la méthode de Woolf (Woolf, 1955) dont la formule est **Intervalle de confiance OR =  $\exp^{\ln(OR) \pm 1,96 * SE(\ln OR)}$** , avec SE = erreur standard donnée par le modèle de l'OR considéré.

**Tableau 6 : Liste des variables explicatives du modèle final d'étude des facteurs de risque réalisée**

<i>Variables finales et p-value obtenue au test de liaison avec la variable expliquée</i>	<i>Pourcentage de restaurants positifs à Salmonella<sup>a</sup></i>	<i>Modèle de régression logistique</i>	
		Odds ratio (arrondi)	IC à 95%
<i>Quartier d'origine de l'établissement enquêté (p-value= 0,03146)</i>			
- Nord	18,2	1	-
- Sud	0	0,15	0,022-0,98
<i>Type de construction (p-value= 0,08047)</i>			
- Plein air et mobile	33,4	1	-
- Bois et brique	5,8	0,03	0,0025-0,29
<i>Habits spécifiques pour le(s) propriétaire(s) (p-value= 0,2206)</i>			
- Non	14,7	1	-
- Oui	3,8	0,15	0,018-0,99
<i>Couvre-chef intégral pour le personnel (p-value= 0,03596)</i>			
- Non	17,1	1	-
- Oui	0	0,05	0,004-0,57
<i>Usage de nappes (p-value= 0,133)</i>			
- Non	6,5	1	-
- Oui	21,4	8,83	1,24-62,2
<i>Température relevée des plats à base de porc (p-value= 0,2092)</i>			
- < 52,5°C compris	12	5,41	1,25-35,22
- > 52,5°C	0	1	-

<sup>a</sup> : par rapport au nombre total de restaurants dans la classe.



## Discussion :

### A. Analyse du protocole

#### **I. Sélection des quartiers et des établissements échantillonnés**

Les quartiers à échantillonner ont été choisis sur la base de la répartition des gargotes à Antananarivo. Dans un souci de représentativité, le nombre d'échantillons prélevés par quartier a été défini en fonction de la densité estimée de gargotes.

Les établissements ont été aléatoirement choisis en utilisant la technique de la pièce (page 13), minimisant les biais de sélection. En revanche, le fait que l'échantillonnage et le questionnement des établissements sélectionnés ait été soumis à l'accord de leurs propriétaires aurait pu amener à un biais de sélection des restaurants de rue. Toutefois, grâce à l'efficacité des enquêteurs (clarté des explications et des objectifs de l'étude), trois propriétaires seulement ont refusé d'y participer.

#### **II. Questionnaires**

Les enquêtes ont été réalisées à l'aide de questionnaires, méthode pouvant entraîner des biais d'étude lors de la restitution des données collectées dans la base de données finale. L'usage de questions fermées objectives (77% du questionnaire), la bonne formation des enquêteurs avant les missions de terrain ainsi que le recours aux mêmes personnes pour l'enquête (4) et la saisie des données (1), a permis de limiter ces biais.

Un biais n'a toutefois pas pu être évité, celui lié au refus de répondre ou de falsifier la réponse, dépendant intégralement de la bonne foi des propriétaires des établissements. En effet, il est possible que face aux enquêteurs, certains propriétaires aient été apeurés ou méfiants et qu'ils aient volontairement voulu cacher certains aspects de leurs activités (par exemple l'origine de la viande vendue dans l'établissement). Or, l'absence de réponse a été très peu observée pour les variables finalement retenues pour l'analyse de facteurs de risque. Dès lors, un tel biais n'a logiquement eu que très peu de répercussion sur les résultats et conclusions de l'étude réalisée.

#### **III. Nombre de prélèvements**

Bien que l'étude ait initialement été pensée pour l'échantillonnage de 32 boucheries et 108 gargotes sur une période de 5 mois, seule la partie relative aux gargotes a partiellement été réalisée. Dans une prochaine étude, une meilleure anticipation du matériel et de l'équipement nécessaire ainsi que l'augmentation du nombre d'échantillonneurs permettront potentiellement d'atteindre les objectifs initiaux fixés.

#### **IV. Recherche des salmonelles**

Selon Delarras (2007) et en accord avec la norme NF EN ISO 6579 (2002), le protocole de recherche de salmonelles en microbiologie des aliments se compose d'un pré-enrichissement non sélectif en eau peptonée, d'un enrichissement sélectif en bouillons RVS et MKTTn suivi d'un isolement sur deux milieux solides sélectifs avec gélose XLD obligatoire. Ces étapes ont été scrupuleusement suivies tout au long de cette étude.

Les deux premières semaines de pratique ont été intégralement réservées à la mise en place des techniques de laboratoire afin de valider le protocole et d'éviter d'éventuels biais. Dans le même objectif, les expérimentateurs manipulant et interprétant les résultats de laboratoire ont toujours été les mêmes.

L'usage précoce de géloses XLD pour l'isolement (au lieu des PCA initialement utilisés) et le recours systématique à la méthode RapID ONE pour confirmer ou infirmer les colonies suspectes

sélectionnées après tests biochimiques ont permis de s'assurer que les souches isolées étaient pures et de sélectionner plus précisément les bactéries à sérotyper, certaines souches bactériennes autres que *Salmonella spp.* pouvant effectivement présenter un profil biochimique proche de ces dernières (Freney, Renaud, Leclercq et Riegel, 2007; Denis, Ploy, Martin, Bingen et Quentin, 2007).

Les caractéristiques biochimiques recherchées (tableau 3) ne sont pas partagées par toutes les *Salmonella*. Certaines d'entre-elles ont donc pu être rejetées au cours de l'étude, ce qui a possiblement affecté les résultats obtenus (tableaux 4 et 6). Cependant, comme le soulignent Bonnefoy, Guillet, Leyral et Verne-Bourdais (2002), de telles bactéries sont minoritaires. A titre d'exemple, les auteurs mentionnent que 98,5% des souches isolées sont ONPG -, contre 1,5% ONPG +.

## **B. Résultats d'enquête, de contamination et facteurs de risque pour *Salmonella***

### **I. Souches confirmées isolées à partir des échantillons collectés**

Sur les 178 échantillons testés pendant l'étude, 27 ont été identifiés comme contaminés par des bactéries suspectes (soit 15,2%). Cela représente 18 établissements sur 60 (30%).

Les résultats de confirmation par la méthode RapID ONE des souches suspectes (tableau 4) montrent effectivement que toutes les bactéries retrouvées appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Par ailleurs, ces derniers révèlent une prédominance de contamination des plats (hors *Salmonella*) par *Proteus mirabilis* (responsable de la contamination de 9% des échantillons totaux), suivie par *Shigella sp.* (1,7%), *Citrobacter freundii* (1,1%), *Enterobacter cloacae* (1,1%), *Citrobacter amalonaticus* et *Yersinia kristensenii* (0,6% chacune).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que toutes ces bactéries se retrouvent dans l'environnement et chez l'être humain, à l'état commensal dans le tube digestif ou de saprophyte de la peau et des muqueuses. Or, toutes ces bactéries ne sont pas sans danger pour l'homme en bonne santé. En effet, celles appartenant au genre *Shigella sp.* sont spécifiques à l'homme. Leur identification s'explique donc par une contamination humaine des plats. Or, elles sont caractérisées par un pouvoir invasif important de l'épithélium colique et rectal pouvant évoluer en dysenterie dont les épidémies frappent régulièrement les pays les moins avancés, notamment en Afrique (Kernéis et al., 2009; Guerin et al., 2003; Kotloff, 1999). Concernant celles appartenant à l'espèce *Proteus mirabilis*, il s'agit de germes ubiquistes qui se retrouvent partout et notamment dans l'environnement. Généralement apathogènes, ils peuvent quelquefois être isolés lors d'infections telles que les infections urinaires, mais aussi dans des cas de méningites chez l'enfant et les personnes âgées ou de bactériémie (Chen et al., 2012; Phan et Lehman, 2012; Joly et Reynaud, 2009; Kassim, Haque, Aziz et Cheung, 2003).

Parmi les 178 plats échantillonnés, 9 se sont avérés être contaminés par des salmonelles, soit 6 établissements (tableau 4). Or, ces bactéries sont parfois isolées à partir de plats vendus à base de porc (Yan et al., 2010; Ogasawara et al., 2008). Elles se retrouvent également naturellement dans le porc et dans l'environnement (Acha et Szyfres, 2005). Le fait d'en retrouver dans les échantillons collectés suggèrent donc que celles qui ont été isolées aient soit survécu lors de la cuisson des plats, soit été réintroduites dans les plats cuits par contamination croisée.

Les souches isolées sérotypées (9 sur 13) appartiennent à *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Seftenberg et *Salmonella* Newport (tableau 4). Plusieurs auteurs ont isolé ces sérotypes à partir de porcs (Van Boxstael et al., 2012 ; Thai, Hirai, Lan et Yamaguchi, 2012 ; Oliveira, Carvalho, Fernandes, Tavechio et Domingues Jr, 2005 ; Bonardi et al., 2003b). Leur isolement à partir de certaines productions échantillonnées n'est donc pas anecdotique.

### **II. Analyse des résultats d'enquête et mise en relation avec les résultats du modèle logistique**

La majorité des données résumées dans le tableau 5 et en annexe 7 donnent un aperçu des pratiques et des connaissances des propriétaires de gargotes d'Antananarivo en termes de bonnes pratiques d'hygiène à respecter dans le cadre de leur activité. Cependant, il est important de souligner que l'étude ne permet d'avoir qu'un aperçu des pratiques des gargotiers de la capitale malgache en raison du faible échantillon (60 établissements) et du fait que toutes les questions relatives aux bonnes pratiques d'hygiène n'ont pas été abordées (annexe 3). Par ailleurs, le faible nombre de plats collectés peut avoir des répercussions sur les résultats du modèle logistique réalisé (tableau 6), notamment par l'impossibilité de prendre en compte les interactions entre les variables.

#### **a. Position géographique du site de prélèvement**

Le quartier de l'établissement enquêté semble lié avec la contamination par *Salmonella* des plats échantillonnés. Ainsi, celle-ci diminue lorsque l'établissement est situé dans les quartiers Sud de la capitale (OR = 0,15, IC 95% : [0,022-0,98]) (tableau 6).

Cette observation peut s'expliquer par la différence de provenance de produits frais utilisés pour la préparation des plats. En effet, il est possible que les produits de base achetés par les commerçants des quartiers situés au nord soient de moins bonne qualité microbiologique que ceux des quartiers situés au sud. Or, plusieurs études ont montré que la viande de porc et les légumes peuvent être contaminés par *Salmonella* (Lok Wong, MacDiarmid et Cook, 2009; Bonardi S. et al., 2003a; Melloul, Hassani et Rafouk, 2001). Il est également possible que les conditions sanitaires globales soient meilleures dans les quartiers du sud. Pour en savoir davantage à ce sujet, plus d'échantillons devront être prélevés et testés.

#### **b. Type de construction et hygiène de l'établissement**

Les données récoltées sur le type de construction montrent que le matériel de fabrication de prédilection des établissements enquêtés est la brique (56,7%) puis le bois (28,3%). Les restaurants de rue en plein air ou mobiles représentent quant à eux respectivement 10 et 5% des structures enquêtées. Le nettoyage de l'établissement, au moins une fois par jour (81,7% des cas) et avec un produit désinfectant (61,7%) parfois additionné d'eau (31,7%), semble être une habitude pour les gargotes visitées (100%). Or, le type de construction définit en partie l'efficacité et la durabilité du nettoyage appliqué. Les résultats de l'analyse de facteur de risque semblent aller dans ce sens. En effet, le risque de contamination par *Salmonella* des plats échantillonnés diminue lorsque les gargotes sont construites en brique ou en bois (OR = 0,03, IC 95% : [0,0025-0,29]) (tableau 6). C'est pourquoi l'OMS (1996) conseille que la construction des restaurants de rue soit réalisée avec des matériaux étanches et durs.

L'usage de divers moyens de protection contre le soleil ou la boue et le nettoyage des abords de la gargote semblent être des pratiques habituelles pour la majorité des gargotiers (respectivement 73,3%, 65% et 65%). Il en va de même pour la lutte ou la protection contre les insectes envahisseurs (65% et 56,7% des établissements enquêtés concernés). Les produits chimiques sont d'ailleurs très largement utilisés (48,3%), malgré les risques associés pour la santé du consommateur (Bhanti et Taneja, 2007; Amoah, Drechsel, Abaidoo et Ntow, 2006; Mahugija Marco et Kishimba, 2005). Or, il s'agit là d'installations et de pratiques conseillées par l'OMS (2006) pour lutter contre la contamination des plats par différents agents infectieux. Les gargotiers enquêtés semblent donc bien avoir compris l'intérêt de cela pour leur production et leur commerce.

#### **c. Hygiène du personnel et des gérants**

Sur les 60 établissements enquêtés, 43,3% des gérants affirment porter des habits spécifiques pour leur activité de restauration et en faire porter à leur personnel (41,7%). En outre, 43,3% des gargotiers indiquent les laver et, dans 41,7%, au moins deux fois par semaine. Il semblerait donc que le fait de porter des habits propres à la préparation et au service des plats ne soit pas une pratique généralisée à l'ensemble des établissements visités et que, lorsque cela est le cas, leur lavage ne soit pas systématique. Cela se retrouve dans le port d'un couvre-chef intégral par les employés qui n'a été observé que dans 41,7% des cas.

La fréquence de lavage des mains montre que près de la moitié du personnel des établissements enquêtés le font de façon régulière ou à chaque nouvelle commande, même si une légère variation dans ces fréquences est observable entre le personnel de cuisine et de salle (respectivement 51,7% contre 48,3%). Concernant le produit utilisé pour cette pratique, l'utilisation d'un produit désinfectant (98,3%) et d'une eau de qualité (eau de ville à 96,9%) est quasi-systématique.

De précédentes études ont montré que les mains et les vêtements sont parfois impliqués dans les phénomènes de contamination croisée des plats par diverses bactéries (Dharod et *al.*, 2009; Van Asselt, De Jong, De Jonge et Nauta, 2008; Barro et *al.*, 2007). L'intérêt du port de vêtements spécifiques semble également confirmé par les résultats du modèle logistique réalisé. Ainsi, la variable "habits spécifiques pour le(s) propriétaire(s)" est définie comme un facteur de protection associée à une diminution du risque de contamination des plats échantillonnés par les salmonelles (OR = 0,15, IC 95% : [0,018-0,99]) (tableau 6), malgré que leur lavage ne soit pas systématique.

Selon Forsythe et Hayes (1999), l'usage d'un couvre-chef intégral permettrait d'éviter de transmettre certains agents pathogènes présents sur le personnel aux plats en cas de démangeaison du cuir chevelu ou de perte de cheveux. Or, cette pratique paraît également être fortement associée à la diminution du risque de contamination des plats récoltés par *Salmonella* (OR = 0,05, IC 95% : [0,004-0,57]) (tableau 6). Ce résultat semble donc confirmer l'importance de ces derniers dans la prévention des contaminations des productions échantillonnées. Cependant, il est important que ce constat soit considéré avec précaution. En effet, n'ayant aucune information sur les fréquences de lavage ou de changement des couvre-chefs opérées par les établissements, il est important de rappeler que leur usage doit se faire selon les mêmes conditions d'hygiène que tout autre vêtement afin d'éviter toute contamination croisée.

#### **d. Matériel de préparation et de service des plats**

La quasi-totalité des propriétaires enquêtés ont affirmé que les ustensiles de cuisine étaient lavés avant chaque nouvelle utilisation (96,7%) et que tous le faisaient également pour le matériel de service des plats (100%). Par ailleurs, presque tous les gérants réalisant cette pratique ont indiqué que les nettoyages étaient réalisés avec de l'eau et du savon (98,4% pour le matériel de cuisine et 100% pour celui de service). Il semblerait donc que cet aspect des bonnes pratiques d'hygiène ait globalement été correctement assimilé par les gargotiers de la capitale. Cela leur permettrait par conséquent d'éviter tout phénomène de contamination croisée des plats par le biais des ustensiles, comme cela l'a été mentionné dans des publications pour diverses bactéries (Haileselassie, Taddele et Adhana, 2012; Van Asselt, De Jong, De Jonge et Nauta, 2008; Lubber, Brynstad, Topsch, Scherer et Bartelt 2006).

L'usage de nappes pour les tables ne semble pas être une pratique courante dans les restaurants d'Antananarivo. Ainsi, 14 des 60 établissements enquêtés (23,3%) utilisent ce type de matériel. Lorsque cela est le cas, seuls 43% des établissements concernés les renouvellent chaque jour et autant lorsqu'elles sont sales.

Or, l'utilisation de nappes semble augmenter le risque de contamination des échantillons collectés par des salmonelles (OR = 8,83, IC 95% : [1,24-62,2]) (tableau 6). Bien que n'ayant jamais été mentionnée dans des articles comme pratique à risque pour la contamination à *Salmonella*, il est possible que ces dernières interviennent, en l'absence de vraie cuisine dans la plupart des établissements (56,7% des restaurants n'en possèdent pas), lors de contaminations croisées des plats comme cela l'a été démontré pour les plans de travail (Lubber, Brynstad, Topsch, Scherer et Bartelt 2006; Gorman, Bloomfield et Adley, 2002). Ces résultats suggèrent par conséquent que ce point soit d'avantage pris en considération lors de l'énoncé des bonnes pratiques d'hygiène auprès des commerçants de la capitale. Cependant, cette donnée est également à analyser avec précaution. Il est en effet important de souligner que celle-ci englobe d'autres pratiques, lesquelles n'ont pas toutes été développées lors de l'étude. Ainsi, aucune donnée récoltée ne peut actuellement permettre de préciser si la nature des nappes est impliquée dans la contamination des plats (tissu, plastique...). Par ailleurs, aucune information n'a été récupérée sur les modes de nettoyage de ces dernières. C'est

pourquoi il serait nécessaire d'approfondir d'avantage le sujet avant de conclure définitivement sur le rôle des nappes dans les contaminations observées.

#### **e. Conditions d'achat, de transport et de livraison de la viande de porc utilisée**

La viande de porc vendue dans les établissements enquêtés venait principalement de boucherie (dans 65% des cas). Par ailleurs, presque tous les établissements visités ont indiqué avoir une boucherie de préférence (93,3% des établissements ayant répondu "une" au nombre de boucherie partenaire et 98,3% oui à la question relative à la préférence d'une boucherie particulière), la raison la plus mentionnée étant la qualité de la viande vendue (75%). Il semblerait donc que la majorité des gargotiers visités privilégient la viande de qualité vendue dans des boucheries avec lesquelles ils ont l'habitude de travailler.

Les questions sur le mode de transport de la viande révèle que la quasi-totalité des gérants ne prennent pas le soin de la transporter au froid (95% des réponses données) et que l'horaire de livraison de cette dernière est soit le matin soit le reste de la journée (respectivement pour 43,3% et 38,3%), correspondant aux températures ambiantes les plus élevées. Le temps de transport annoncé est toutefois relativement court (83,3% des propriétaires estimant ce temps à moins d'une heure).

Le fait que la viande ne soit pas transportée à basse température pose un gros problème pour les plats vendus. En effet, les salmonelles, comme diverses autres bactéries, sont parfois isolées à partir de la viande de porc crue (Gousia., Economou, Sakkas, Leveidiotou et Papadopoulou, 2011; Vindigni *et al.*, 2007; Zaidi *et al.*, 2006). Il est donc possible qu'en l'absence de froid ces dernières s'y développent massivement. Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres aliments (Oliveira *et al.*, 2010; Lublin et Sela, 2008; Ukuku et Sapers, 2007).

#### **f. Préparation et conservation des plats vendus**

Pour la préparation des plats, les informations récoltées montrent que la moitié (50%) des gérants questionnés ne surveille pas la température de cuisson des plats qu'ils servent à leurs clients. Par ailleurs, la très grande majorité des propriétaires ont indiqué préparer leurs production le matin même (61,3%) et la laisser, une fois prête, à température ambiante avant de la servir aux clients (56,7%). Cela se retrouve dans les températures relevées des plats, lesquelles se trouvaient en grande majorité (55%) dans l'intervalle calculé entre 30 et 52,5°C. Concernant la cuisson de la viande de porc vendue, 73,3% des propriétaires des établissements visités la cuisent plus d'une heure et à ébullition (dans 100% des cas). En outre, 95% affirment laver les légumes avant de les cuisiner avec la viande.

La cuisson du porc semble bien maîtrisée par les gérants visités. Dans la pratique, la viande est cuite à gros bouillons jusqu'à ce que toute l'eau se soit évaporée, ce qui correspond au mode de cuisson traditionnel à Madagascar. Une expérience réalisée lors de l'étude a montré que la température de la viande à cœur ainsi cuite pendant moins d'une heure avec 5cm d'eau s'élevait à plus de 80°C. Par conséquent, les salmonelles potentiellement présentes sur et dans le produit brut sont théoriquement éliminées (Acha et Szyfres, 2005).

A l'inverse, le fait de ne pas surveiller la cuisson des plats préparés et de les laisser à température ambiante une fois cuits représentent des comportements à risque en termes d'hygiène alimentaire (Barro *et al.*, 2007; OMS, 2006). En effet, l'atteinte et le maintien, pendant un certain temps, de températures de cuisson et de conservation élevées des plats (plus de 70°C pour la cuisson et 60°C pour la conservation) permettent de supprimer toute contamination initiale en bactéries et d'éviter toute re-contamination des produits préparés et vendus (Barro *et al.*, 2007; OMS, 2006; Forsythe et Hayes, 1999). Cela a été confirmé par l'analyse de facteur de risque qui a montré que la classe de température de service des plats la plus à risque en termes de contamination par *Salmonella* était celle pour laquelle la température était < 52,5°C (OR = 5,41, IC 95% : [1,25-35,22]) (tableau 6). Ce résultat suggère par conséquent que les températures de cuisson des productions n'étaient pas suffisantes pour qu'elles n'en contiennent plus. Le fait de laisser les plats refroidir avant leur service peut également être remis en cause, la re-contamination bactérienne d'aliments déjà cuits ayant souvent été observée (Isara, Isah, Lofor et Ojide, 2010; Paweena et Issaraporn, 2010; Badrie, Joseph et Chen, 2003).

Cependant, ce résultat est à interpréter avec prudence. En effet, aucune question relative au réchauffage des plats avant service n'a été posée, ni à quelle température si une telle pratique existait. Il en va de même pour les temps d'attente moyens entre préparation et service des plats qui n'ont pas été abordés lors de l'étude. C'est pourquoi il serait important de réaliser une exploration plus poussée des pratiques des gargotiers de la capitale en la matière avant toute conclusion.

L'absence de lavage des légumes a été identifiée par Cardinale, Perrier Gros-Claude, Tall, Guèye et Salvat (2005) comme un facteur de risque majeur pour la contamination des plats à base de poulet préparés en gargote au Sénégal par des salmonelles. Par conséquent, le fait que la grande majorité des propriétaires enquêtés assure le faire permet logiquement d'éviter ce phénomène dans le contexte des gargotes d'Antananarivo.

Une fois les plats préparés, la majeure partie des gérants questionnés ont annoncé ne pas conserver les invendus du jour (86,7%). Lorsque cela était le cas, une partie d'entre eux les laissait à température ambiante (3,3%), tandis que les autres les gardaient au froid (6,7%) ou sur le feu (1,7%). Bien que les conservations à faible ou haute température soient acceptées et recommandées sous certaines conditions par l'OMS (2006) (température de conservation hors de la gamme 5°C - 60°C), la conservation à température ambiante n'est pas conseillée.

### **III. Nombre de contaminations observées**

La prévalence de *Salmonella* observée pour l'étude semble faible (5% des échantillons totaux) (tableau 4). En effet, à titre d'exemple, Yan et *al.* (2010) ont observé que 26,7% des plats à base de porc échantillonnés pour leur étude étaient contaminés par cette bactérie. Dès lors, plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le résultat observé.

#### **a. Hypothèse principale**

##### *Pratiques des gargotiers*

Le faible nombre de plats échantillonnés contaminés par *Salmonella* peut suggérer que certaines pratiques des gargotiers permettent d'éliminer au maximum ces bactéries. Le mode de cuisson traditionnel malgache de la viande est particulièrement soupçonné (page 33). En effet, ce dernier permet vraisemblablement d'atteindre une température à cœur de la viande suffisante pour détruire la plupart voire la totalité des salmonelles initialement présentes dans la viande de porc (Acha et Szyfres, 2005). Cependant, d'autres mœurs réalisées après cuisson des plats facilitent certainement les contaminations croisées de ces derniers, par exemple le fait de laisser les plats refroidir à température ambiante avant leur vente (Cardinale, Perrier Gros-Claude, Tall, Guèye et Salvat, 2005). Cela expliquerait l'isolement de *Salmonella* et d'autres *Enterobacteriaceae* pathogènes dans certains plats échantillonnés (tableau 4).

#### **b. Hypothèses secondaires**

##### *Protocole*

Il est dans un premier temps possible de remettre en question le protocole utilisé et sa mise en pratique pendant l'étude. Cependant, ce point a déjà été discuté et ne semble pas expliquer au mieux le résultat observé.

##### *Pratiques des élevages, des abattoirs et des boucheries*

Ce résultat peut laisser penser que les abattoirs et les boucheries d'Antananarivo ainsi que les élevages les fournissant respectent les pratiques d'hygiène qui permettent d'éviter au maximum la contamination des porcs et de leur viande par les salmonelles. Or, plusieurs auteurs ont observé que ces trois catégories d'acteurs jouent un rôle majeur dans la contamination par *Salmonella* d'animaux d'élevage vivants ou de la viande en étant issue (Attala et Kassem, 2011; Marin, Balasch, Vega et Laineza, 2011; Le Bouquin et *al.*, 2010; Letellier et *al.*, 2009; Prendergast et *al.*, 2008; Spiehs et Goyal, 2007; Botteldoorn et *al.*, 2003; Berends, Van Knapen, Mossel et Burt, 1998). Cependant, dans le contexte de l'étude, aucune donnée ne permet de savoir si cela est le cas. Ainsi, la

prévalence de *Salmonella* dans le porc ou dans la viande de porc de la capitale n'est pas disponible. Par ailleurs, aucun suivi des pratiques appliquées par ces différents acteurs de la chaîne de production du porc malgache n'a été réalisé, même si certaines boucheries présentent des mœurs à risque (par exemple le mélange de viande d'origines différentes sur l'étal de vente (figure 2) (Carrasco, Morales-Rueda et García-Gimeno, 2012)). C'est pourquoi il ne sera pas possible de conclure avec certitude sur ce point tant que d'autres études fournissant ces données ne seront pas réalisées.

#### *Influence de facteurs externes*

Certains facteurs externes non pris en compte dans cette étude peuvent expliquer le résultat obtenu. Fan et Liu (2008) ont par exemple constaté que le nombre d'intoxications alimentaires et de contaminations des plats échantillonnés par *Salmonella* diminuaient en hiver sous l'influence de la température ambiante. Or, la majorité des prélèvements ont été échantillonnés entre Avril et Juillet, période correspondant à l'hiver austral à Madagascar. Sachant qu'à Antananarivo, les minima relevées avoisinent 10°C en Juillet et que les maxima atteignent 26°C en Novembre (Randremanana, Migliani, Rakotomanga et Jeanne, 2001), il sera nécessaire qu'une prochaine étude soit réalisée sur une période plus longue pour en savoir davantage à ce sujet.

## **IV. Conclusions et perspectives**

### *Prévalence de Salmonella dans la chaîne de production du porc malgache*

L'étude réalisée n'a porté que sur une petite partie de la chaîne de production et de vente de produits à base de viande de porc. Pour avoir une idée globale de la séroprévalence de salmonelle dans la viande de porc vendue dans la capitale malgache et de la contamination initiale de la viande avant préparation et cuisson, il sera nécessaire que d'autres études incluant les autres maillons de la filière de production (tels que les élevages, les boucheries, les abattoirs...) soient réalisées. Ces dernières contribueront à améliorer la compréhension des mécanismes à l'origine des contaminations par les salmonelles "de la fourche à la fourchette" tout en participant à l'élaboration de plans de gestions sanitaires embrassant l'ensemble de la chaîne de production du porc malgache.

### *Conclusion sur les résultats obtenus et propositions au gouvernement malgache*

L'analyse des pratiques des gérants enquêtés montre que ces derniers ne possèdent pas toujours le bagage théorique et pratique suffisant pour leur permettre de réaliser leur fonction sans éviter la contamination de certains de leurs plats. Cela est confirmé par l'isolement de *Salmonella* dans certains plats échantillonnés (tableau 4) ainsi que par l'identification de deux facteurs de risque majeurs pour la contamination des plats par ces bactéries (tableau 6). Or, les salmonelles font partie des principaux agents infectieux bactériens incriminés lors de toxi-infections alimentaires observées dans le monde (OMS, 2007), ce que confirment de nombreuses études récentes portant sur le sujet (Di Giannatale et al., 2012; Sheth et al., 2011; Nicolay et al., 2011; Niehaus, Apalata, Coovadia, Smith et Moodley, 2011; Solhan et al., 2011; Mürmann, dos Santos, Longaray, Corrêa Both et Cardoso, 2008). La capitale malgache n'est donc pas à l'abri du danger qu'elles représentent.

L'ensemble de ces constats soulignent la nécessité pour le gouvernement malgache de mieux former et suivre les gargotes dans toute la capitale. En effet, les mesures existantes (suivi et formation des restaurateurs, textes législatifs) ne semblent guère être suffisantes pour protéger les nombreux consommateurs travaillant à Antananarivo et souhaitant se restaurer rapidement et à bas prix. L'enjeu est donc de taille et ne peut être pris à la légère. C'est pourquoi, en se basant sur ce qu'il a été proposé par la FAO et l'OMS au Botswana (FAO/OMS, 2005c), plusieurs pistes d'améliorations (liste non exhaustive) peuvent être proposées aux autorités malgaches compétentes en la matière.

Dans un premier temps, un suivi régulier de l'ensemble des restaurants de rue d'Antananarivo devrait être envisagé, avec vérification fréquente de la mise en application des recommandations données en termes d'hygiène alimentaire ainsi qu'échantillonnage et contrôle microbiologique de

leur production. Ce suivi pourrait se faire à intervalles de temps fixes auprès d'un échantillon d'établissements, comme cela l'a été fait au Ghana (Donkor, Kayang, Quaye et Akyeh, 2009). Afin de le réaliser correctement, les moyens humains et financiers à disposition dans la capitale devront certainement être augmentés, tout comme le nombre d'établissements accrédités pour le contrôle microbiologique des productions collectées. Pour optimiser les contrôles opérés, des programmes réguliers de remise à niveau du personnel formé pour cette tâche pourraient être mis en place. Par ailleurs, afin de toucher directement les propriétaires visités, un système de décoration pour les restaurants de rue les mieux gérés pourrait être mis en place, comme proposé par Sarter et Sarter (2012).

Dans un deuxième temps, l'élaboration de procédures pour l'analyse des dangers et maîtrise des points critiques (ou procédures HACCP) spécifiquement adaptées au contexte malgache et vulgarisée auprès des propriétaires d'établissement pourrait aider les autorités compétentes à mieux contrôler les contaminations et à mieux cibler les actions à mettre en œuvre pour les réduire. Enfin, la rédaction de nouveaux textes législatifs en malgache et en français accessibles à tous permettrait d'achever cet encadrement.

Bien entendu, les objectifs recherchés ne peuvent être envisagés qu'en lien avec une politique générale de salubrité sur laquelle le gouvernement malgache poursuit ses efforts. Si de telles améliorations venaient à être mises en place et testées à Antananarivo, puis généralisées au reste de l'île, Madagascar pourrait devenir un exemple à suivre en terme de bonnes pratiques d'hygiène dans les restaurants de rue à l'échelle régionale (océan indien) voire internationale.



## Annexes :

### Annexe n°1 : Arrêté interministériel n°22977/2008 portant réglementation de la vente des denrées alimentaires prêtes à consommer

MINISTERE DE L'ECONOMIE, DU COMMERCE ET DE L'INDUSTRIE

MINISTERE DE LA SANTE PUBLIQUE

#### **Arrêté interministériel n°22977/2008**

#### **Portant réglementation de la vente des denrées alimentaires prêtes à consommer**

### **CHAPITRE PREMIER : DE LA PROTECTION DES ALIMENTS**

**Article premier :** Il est strictement interdit de toucher avec la main les aliments prêts à la consommation. Par conséquent, les aliments doivent être servis avec des instruments adéquats (pinces, fourchettes, ou des cuillères propres et des gants).

**Article 2 :** Concernant les vendeurs ou manipulateurs d'aliments :

- Tout vendeur ou manipulateur doit porter des vêtements appropriés (port de blouse propre, calot),
- Ils ne doivent jamais tousser ou éternuer sur les produits et manipuler les aliments en cas de blessures ou de maladies de peau,
- Ils ne doivent jamais fumer en préparant et servant des aliments.

**Article 3 :** Les aliments prêts à la consommation doivent être déposés dans une vitrine avec protection postérieure (rideau) ou dans un autre dispositif protecteur fermé. La vente à même le sol est strictement interdite. Les aliments doivent être étalés à une hauteur de 60 cm au minimum.

**Article 4 :** Les sandwichs garnis de viande cuite, de poisson et/ou de mayonnaise doivent être conservés dans un étalage réfrigéré (4-6°C). Les produits non vendus de cette catégorie ne doivent, en aucun cas, être remis en vente le lendemain.

**Article 5 :** Les sandwichs garnis de fromage / de jambon cru ou de saucisson peuvent être vendus à température ambiante. Cependant, ils ne peuvent pas être exposés en zone non réfrigérée pendant plus de 6 heures.

**Article 6 :** Concernant les emballages des aliments :

- Il est interdit d'utiliser des papiers imprimés ou journaux ;
- Il ne faut utiliser que des emballages spéciaux destinés au conditionnement des produits alimentaires prêts à la consommation ;
- Il est strictement interdit de souffler dans les emballages ou sachets en plastiques.

**Article 7 :** Les aliments doivent être protégés contre la contamination et conservés à la température appropriée :

- Aliments chauds : température maximum 65°C.
- Aliments froids : température maximum 6°C.

**Article 8 :** Les personnes suspectes d'être atteintes ou porteuses d'une maladie infectieuse ne sont pas autorisées à vendre et à manipuler les aliments.

**Article 9 :** La vente des aliments périmés est strictement interdite.

**Article 10** : Les produits tels que : le beurre, yaourt, crème glacée, glace, fromage, charcuterie doivent être conservés à température adéquate (inférieure à 4°C). la vente ambulante des produits de charcuterie est strictement interdite.

**Article 11** : Les aliments préparés non vendus à la fin de la journée ne peuvent plus être revendus le lendemain.

**Article 12** : Les ustensiles utilisés tels que : assiettes, verres, cuillères, fourchettes, tasses, couteaux,... doivent être lavés à l'eau propre avec du savon après chaque usage. L'eau de rinçage doit être renouvelée fréquemment.

## **CHAPITRE II : DE LA MANIPULATION ET DE L'ELIMINATION DES DECHETS**

**Article 13** : Les poubelles doivent être tenues à une certaine distance des lieux où les aliments sont manipulés et doivent toujours être munies d'un couvercle. Les déchets hors de la préparation doivent être évacués immédiatement dans les poubelles.

## **CHAPITRE III : DE L'INSTALLATION ET DU POINT DE VENTE**

**Article 14** : Les points de vente doivent être construits en matériaux résistants, solides et en bon état. Ils doivent toujours être propres, y compris la salle de préparation et la salle de service.

**Article 15** : Aucun animal ne doit être présent à l'intérieur ou à proximité des points de vente.

**Article 16** : Les points de vente ne doivent servir que pour la préparation finale des aliments (réchauffage et service).

**Article 17** : Pour les points de ventes véhiculés, la cabine de pilotage doit être séparée de la partie réservée à la manipulation des aliments et doit être équipée de réservoir d'eau, d'ustensiles à usage unique.

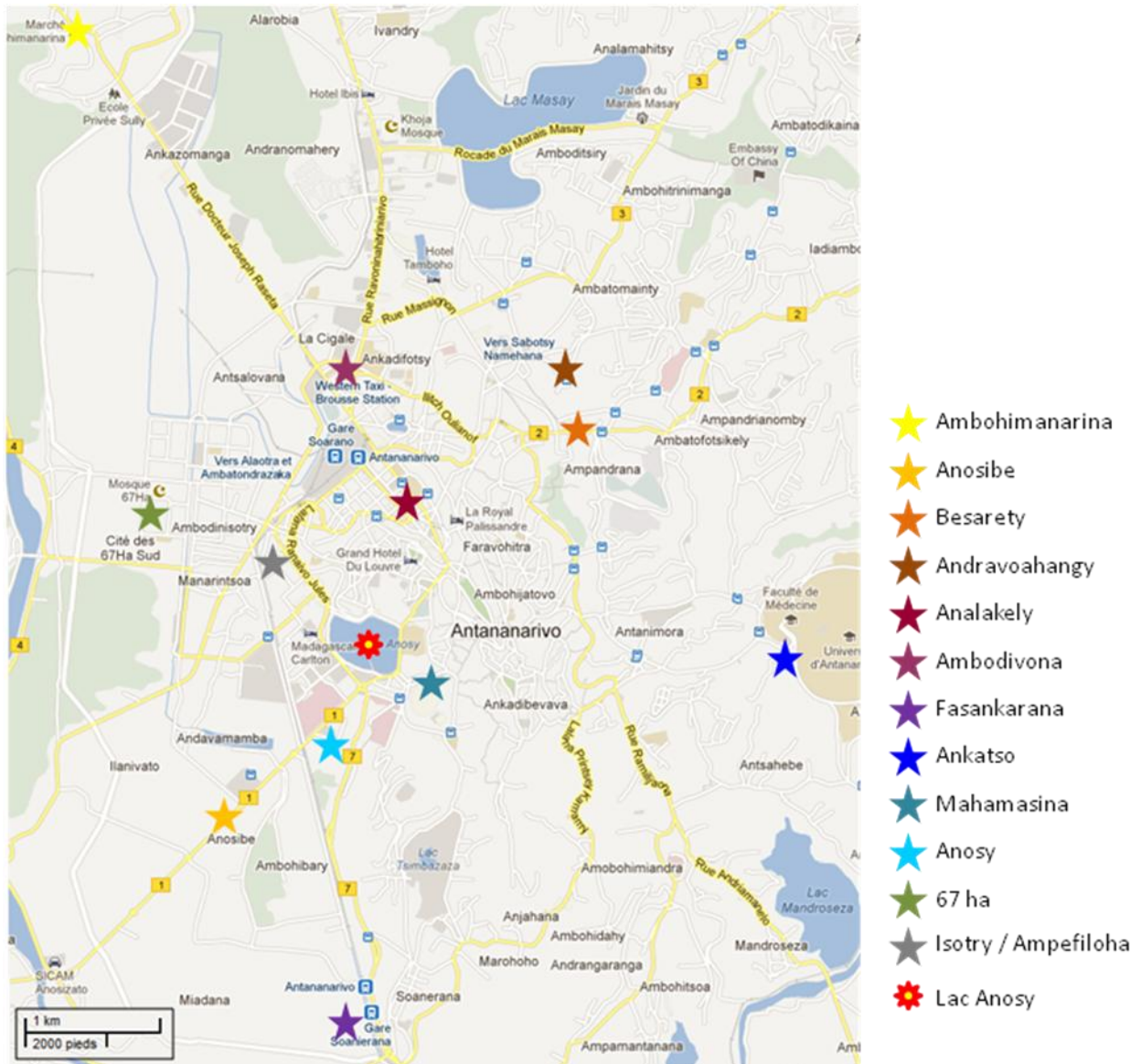
**Article 18** : Toute violation des dispositions du présent arrêté est considérée comme une fraude et est passible d'une poursuite conformément à la réglementation en vigueur.

**Article 19** : Toutes les dispositions du présent arrêté s'appliquent sur l'ensemble du territoire de la République à compter de sa date de signature.

**Article 20** : Toutes dispositions antérieures contraires à celles du présent arrêté sont et demeurent abrogées.

**Article 21** : Le présent arrêté sera enregistré, publié au Journal Officiel de la République et communiqué partout où besoin sera.

**Annexe n°2 : Liste et emplacement des quartiers échantillonnés durant l'étude**



**Annexe n°3 : Questionnaire réalisé auprès des propriétaires des restaurants de rue enquêtés**



Centre d'Infectiologie Charles Mérieux  
Madagascar

Date du prélèvement : \_\_/\_\_/2012 Heure de prélèvement : \_\_\_\_

Nom de l'enquêteur : \_\_\_\_\_

**QUESTIONNAIRE POUR LES GARGOTES**

1.1	Nom de la gargote	
1.2	Nom du propriétaire de la gargote	
1.3	Coordonnées GPS de la gargote	
1.4	Nom du quartier où se trouve la gargote	
1.5	Numéro d'identification des prélèvements	MG ___ / G / ____ / ___ / 2012 Menu : _____
1.6	Prix du plat contenant de la viande de porc ?	<input type="checkbox"/> < 1000 Ar <input type="checkbox"/> Entre 1000 Ar et 2000 Ar <input type="checkbox"/> > 2000 Ar
1.7	Numéro d'identification des prélèvements	MG ___ / G / ____ / ___ / 2012 Menu : _____
1.8	Prix du plat contenant de la viande de porc ?	<input type="checkbox"/> < 1000 Ar <input type="checkbox"/> Entre 1000 Ar et 2000 Ar

		<input type="checkbox"/> > 2000 Ar
1.9	Numéro d'identification des prélèvements	<b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012</b> <b>Menu : _____</b>
1.10	Prix du plat contenant de la viande de porc ?	<input type="checkbox"/> < 1000 Ar <input type="checkbox"/> Entre 1000 Ar et 2000 Ar <input type="checkbox"/> > 2000 Ar
1.11	Type d'infrastructure de la gargote	<input type="checkbox"/> Plein air <input type="checkbox"/> En bois <input type="checkbox"/> En brique <input type="checkbox"/> Mobile
1.12	Type de gargote	<input type="checkbox"/> Familiale <input type="checkbox"/> Indépendante <input type="checkbox"/> Société
2.1	Combien de personne travaillent dans la boucherie ? (vous y compris)	
2.2	Des habits de travail spécifiques des habits de ville sont-ils disponibles ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.3	Les serveurs possèdent-ils un uniforme de travail ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.4	Si oui, sont-ils lavés régulièrement ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.5	Si oui, sont-ils lavés au moins deux fois par semaine ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.6	A quelle fréquence le personnel de cuisine se lave-t-il les mains ?	<input type="checkbox"/> Régulièrement <input type="checkbox"/> A chaque nouvelle commande <input type="checkbox"/> Parfois <input type="checkbox"/> Seulement en début et fin de journée <input type="checkbox"/> Jamais
2.7	A quelle fréquence le personnel de salle se lave-t-il les mains ?	<input type="checkbox"/> Régulièrement <input type="checkbox"/> A chaque nouvelle commande <input type="checkbox"/> Parfois <input type="checkbox"/> Seulement en début et fin de journée <input type="checkbox"/> Jamais
2.8	Si oui, le lavage des mains se fait-il avec un produit désinfectant ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.9	D'où provient l'eau utilisée pour le lavage des mains ?	<input type="checkbox"/> Eau de ville <input type="checkbox"/> Eau de rivière <input type="checkbox"/> Eau de puits <input type="checkbox"/> Autre : _____
2.10	Le personnel porte-t-il un filet ou un chapeau couvrant intégralement les cheveux ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.11	Le matériel servant à l'élaboration des plats (casseroles, plats, couteaux, cuillères, ...) est-il nettoyé entre chaque préparation ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.12	Si oui, comment sont-ils nettoyés ?	<input type="checkbox"/> Eau et savon <input type="checkbox"/> Eau seulement <input type="checkbox"/> Tablier <input type="checkbox"/> Autre : _____
2.13	Le matériel servant à la présentation des plats aux clients (assiette, couverts, verres) est-il nettoyé entre chaque préparation ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.14	Si oui, comment sont-ils nettoyés ?	<input type="checkbox"/> Eau et savon <input type="checkbox"/> Eau seulement <input type="checkbox"/> Tablier <input type="checkbox"/> Autre : _____
2.15	Utilisez-vous des nappes ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
2.16	Si oui à quelle fréquence les changez-vous ?	<input type="checkbox"/> Chaque jour <input type="checkbox"/> Chaque 3 jours <input type="checkbox"/> Chaque semaine

		<input type="checkbox"/> Quand elles sont sales <input type="checkbox"/> Autre : _____
3.1	Origine de la viande de porc vendue ?	<input type="checkbox"/> Familiale <input type="checkbox"/> Elevage professionnel <input type="checkbox"/> Boucherie <input type="checkbox"/> Autre : _____
3.2	Avec combien de boucheries travaillez-vous ?	<input type="checkbox"/> Une <input type="checkbox"/> Deux <input type="checkbox"/> Plus de deux
3.3	Avez-vous une boucherie préférée ? Si oui laquelle ?	<input type="checkbox"/> Oui : _____ <input type="checkbox"/> Non
3.4	Si oui, pourquoi ?	<input type="checkbox"/> Prix de la viande à l'achat auprès de la boucherie <input type="checkbox"/> Qualité de la viande achetée à la boucherie <input type="checkbox"/> Sécurité de la boucherie <input type="checkbox"/> Proximité de la boucherie par rapport à la gargote <input type="checkbox"/> Confiance vis-à-vis du boucher <input type="checkbox"/> Régularité dans l'approvisionnement en viande de porc <input type="checkbox"/> Autre : _____
3.5	Transport de la viande de porc jusqu'à la gargote ?	<input type="checkbox"/> En voiture/bus avec glacière <input type="checkbox"/> A pied/brouette avec glacière <input type="checkbox"/> En voiture/bus sans glacière <input type="checkbox"/> A pied/brouette sans glacière <input type="checkbox"/> Autre : _____
3.6	Estimation du temps de transport ?	<input type="checkbox"/> Moins d'une heure <input type="checkbox"/> Plus d'une heure
3.7	Horaire de livraison de la viande ?	<input type="checkbox"/> Tôt le matin (avant 6 heures) <input type="checkbox"/> Le matin (entre 6 heures et midi) <input type="checkbox"/> En journée (après midi)
4.1	Nettoyez-vous les légumes servis avec la viande de porc dans vos plats ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
4.2	Surveillez-vous la température de cuisson de vos plats à base de porc ?	<input type="checkbox"/> Oui : _____°C <input type="checkbox"/> Non
4.3	Température du plat au moment du service	<b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012 _____°C</b> <b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012 _____°C</b> <b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012 _____°C</b>
4.4	Température à cœur de la viande	<b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012 _____°C</b> <b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012 _____°C</b> <b>MG ___ / G / ___ / ___ / 2012 _____°C</b>
4.5	Surveillez-vous le temps de cuisson de vos plats à base de porc ?	<input type="checkbox"/> Moins d'une heure <input type="checkbox"/> Plus d'une heure <input type="checkbox"/> Non
4.6	La préparation des plats à base de porc servis dans votre gargote se fait-elle à l'avance ?	<input type="checkbox"/> La veille <input type="checkbox"/> Le matin-même <input type="checkbox"/> A la commande
4.7	Si oui, où sont stockés ces plats avant qu'ils ne soient achetés par les clients ?	<input type="checkbox"/> Frigo <input type="checkbox"/> Congélateur <input type="checkbox"/> Glacière <input type="checkbox"/> Sur le comptoir de vente <input type="checkbox"/> Sur le feu <input type="checkbox"/> Autre : _____
4.8	Si les plats à base de porc ne sont pas vendus dans la journée, les conservez-vous pour le jour suivant ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
4.9	Comment sont-ils conservés ?	<input type="checkbox"/> Frigo <input type="checkbox"/> Congélateur <input type="checkbox"/> Glacière <input type="checkbox"/> Sur le comptoir de vente

		<input type="checkbox"/> Sur le feu <input type="checkbox"/> Autre : _____
5.1	La gargote est-elle nettoyée ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
5.2	Si oui, à quelle fréquence ?	<input type="checkbox"/> Plusieurs fois par jour <input type="checkbox"/> Une fois par jour <input type="checkbox"/> Autre : _____
5.3	Si oui, quels produits sont utilisés ?	<input type="checkbox"/> Désinfectant <input type="checkbox"/> Eau <input type="checkbox"/> Autre : _____
5.4	Un moyen de lutte contre les vecteurs de maladie est-il disponible ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
5.5	Si oui, lequel ?	<input type="checkbox"/> Tape-mouche <input type="checkbox"/> Chiffon <input type="checkbox"/> Fouet artisanal <input type="checkbox"/> Piège à rat <input type="checkbox"/> Produit chimique <input type="checkbox"/> Autre : _____
5.6	Quel est le nombre moyen de clients par semaine ?	<input type="checkbox"/> _____ clients/semaine
6.1	Une protection est-elle disponible pour protéger les plats du comptoir contre le soleil ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
6.2	Une protection est-elle disponible pour protéger les plats du comptoir contre les projections de boue ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
6.3	Une protection est-elle disponible pour protéger les plats du comptoir contre les insectes/animaux ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
6.4	Entretien des abords de la gargote	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
6.5	Proximité de la gargote avec la rue	<input type="checkbox"/> Très proche (< 5 mètres) <input type="checkbox"/> Proche (5-10 mètres) <input type="checkbox"/> Eloignée (> 10 mètres)
6.6	Propreté des locaux	<input type="checkbox"/> Bonne <input type="checkbox"/> Moyenne <input type="checkbox"/> Mauvaise (Moisissures)
6.7	La pièce servant à l'élaboration des plats est-elle spécifique ?	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
6.8	Mode de cuisson de la viande lors de la préparation du plat ?	-----

#### Annexe n°4 : Liste des milieux et réactifs préparés en laboratoire pour l'étude

##### **Eau peptonée :**

###### *Mode de préparation :*

Ajoutez 20g de poudre pour 1 litre d'eau distillée puis mélangez jusqu'à dissolution complète. Répartissez le liquide en flacons et stérilisez-les à 121°C pendant 15 minutes à l'autoclave.

###### *Composition : en g/L*

Peptone : 10  
Phosphate disodique anhydre : 3,56  
Phosphate monopotassique : 1,50  
Chlorure de potassium : 5

##### **« Pate count agar » :**

###### *Mode de préparation :*

Ajoutez 23,5g de poudre pour 1 litre d'eau distillée froide. Portez le tout à ébullition sous agitation jusqu'à dissolution complète. Stérilisez le milieu à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Laissez refroidir à 45-50°C, mélangez et répartissez en boîtes de Pétri stériles.

*Composition* : en g/L

Tryptone : 5  
Extrait de levure : 2,5  
Glucose : 1  
Agar : 15

**« XLD agar » :**

*Mode de préparation* :

Ajoutez 55g de poudre pour 1 litre d'eau distillée froide. Portez le tout à ébullition sous agitation jusqu'à dissolution complète. Laissez refroidir à 45-50°C, mélangez et répartissez en boîtes de Pétri stériles.

*Composition* : en g/L

Xylose : 3,5  
L-Lysine : 5  
Lactose : 7,5  
Sucrose : 7,5  
Chlorure de sodium : 5  
Extrait de levure : 3  
Désoxycholate de sodium : 2,5  
Thiosulfate de sodium : 6,8  
Citrate d'ammonium ferrique : 0,8  
Rouge de Phénol : 0,08  
Agar : 13,5

**Bouillon Muller Kauffman au tétrathionate-novobiocine :**

*Mode de préparation* :

Ajoutez 89,5g de poudre pour 1 litre d'eau distillée, mélangez et portez le tout à ébullition. Laissez refroidir en-dessous de 45°C. Avant son utilisation, ajoutez 20mL d'une solution de iodo-iodure ainsi que le contenu de quatre flacons de supplément novobiocine reconstituée. Mélangez et répartissez dans les contenants finaux.

*Composition* : en g/L

Extrait de viande : 4,3  
Digestat enzymatique de caséine : 8,6  
Chlorure de sodium : 2,6  
Carbonate de calcium : 38,7  
Thiosulfate de sodium (anhydre) : 30,5  
Bile de bœuf : 4,78  
Vert brillant : 0,0096

**Hektoen enteric agar :**

*Mode de préparation* :

Ajoutez 76g de poudre pour 1 litre d'eau distillée et laissez reposer 10 minutes. Chauffez le tout lentement jusqu'à ébullition et maintenez l'ébullition quelques secondes. Laissez refroidir à 50°C et répartissez.

*Composition* : en g/L

Peptone protéique : 12  
Extrait de levure : 3  
Lactose : 12  
Chlorure de sodium : 5  
Thiosulfate de sodium : 5

Citrate d'ammonium ferrique : 1,5  
Acide fuchsinique : 0,1  
Bleu de bromothymol : 0,065  
Agar : 14

#### **Rappaport-Vassiliadis Soja :**

##### *Mode de préparation :*

Ajoutez 26,75g de poudre pour 1 litre d'eau distillée. Chauffez le tout doucement jusqu'à complète dissolution. Stérilisez 15 minutes à 115°C à l'autoclave puis répartissez 10mL de solution dans les contenants finaux.

##### *Composition : en g/L*

Peptone de soja : 4,5  
Chlorure de sodium : 7,2  
Phosphate de potassium dihydrogéné : 1,26  
Phosphate de di-potassium hydrogéné : 0,18  
Chlorure de magnésium (anhydre) : 13,58  
Vert de malachite : 0,036

#### **« Simmons citrate agar » :**

##### *Mode de préparation :*

Ajoutez 24,3g de poudre pour 1 litre d'eau distillée. Chauffez le tout jusqu'à dissolution totale. Autoclavez à 121°C pendant 15 minutes.

##### *Composition : en g/L*

Sulfate de magnésium : 0,2  
Phosphate d'ammonium dihydrogéné : 1  
Phosphate de dipotassium : 1  
Citrate de sodium : 2  
Chlorure de sodium : 5  
Bleu de bromothymol : 0,08  
Agar : 15

#### **« Mannitol mobility nitrate » :**

##### *Mode de préparation :*

Ajoutez 22g de poudre pour 1 litre d'eau distillée. Mélangez pendant 5 minutes. Chauffez le tout jusqu'à ébullition puis autoclavez à 120°C pendant 15 minutes. Versez le liquide dans les tubes à essai préparés à cet effet.

##### *Composition : en g/L*

Hydrolysate tryptique de caséine : 10,0  
Mannitol : 7,5  
Rouge de phénol : 0,4  
Nitrate de potassium : 1,0  
Agar : 3,5

#### **« Lysine iron agar » :**

##### *Mode de préparation :*

Suspendez 34,1g de poudre pour 1 litre d'eau distillée. Chauffez le tout jusqu'à dissolution totale. Autoclavez enfin à 121°C pendant 15 minutes.

##### *Composition : en g/L*

Peptospecial : 5  
Glucose : 1  
L-Lysine hydrochloride : 10



Citrate d'ammonium ferrique : 0,5  
Extrait de levure : 3  
Thiosulfate de sodium : 0,04  
Bromure de Cresol pourpre : 0,02  
Agar : 14,5

### Gélose de Kligler-Hajna :

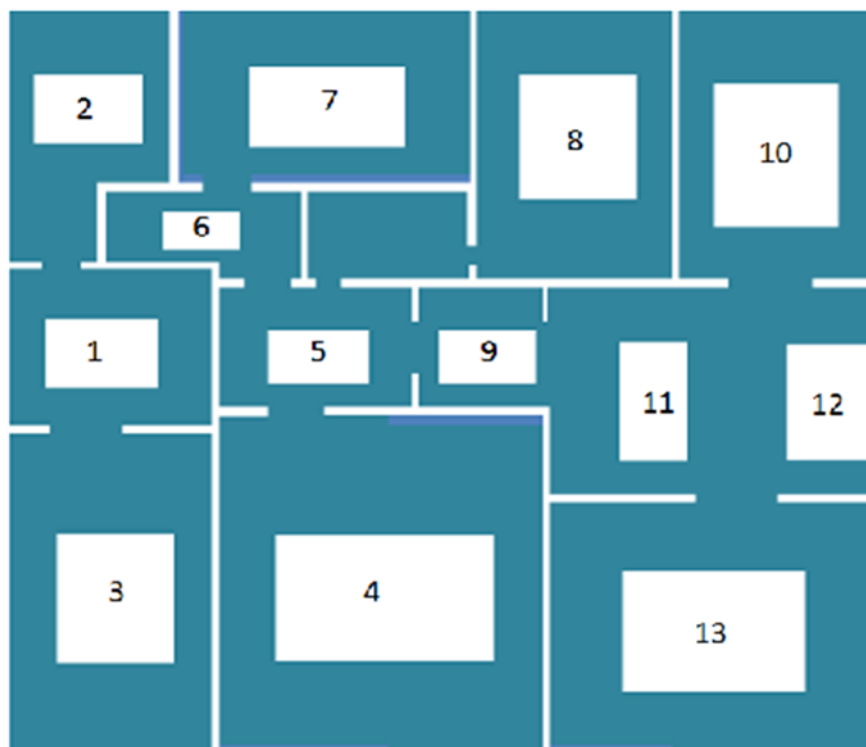
#### Mode de préparation :

Verser 58g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition lentement, en agitant jusqu'à complète dissolution. Répartir en tubes. Autoclaver 15 minutes à 121°C. Laisser refroidir les tubes en position inclinée, pour obtenir une pente, et un culot de 2 à 3 cm de haut.

#### Composition : en g/L

Extrait de bœuf : 3  
Extrait de levure : 3  
Peptocomplexe : 20  
Lactose : 10  
Glucose : 1  
Sulfate d'ammonium ferrique : 0,5  
Thiosulfate de sodium : 0,5  
Chlorure de sodium : 5  
Rouge de phénol : 0,025  
Agar : 15

### Annexe n°5 : Plan des différents locaux du laboratoire du CICM



- 1: SAS d'entrée
- 2: local de stockage
- 3: laverie
- 4: laboratoire d'amplification et de détection
- 5: couloir inter-laboratoires
- 6: salle de préparation des mix
- 7: laboratoire de préparation des mix
- 8: laboratoire de microbiologie et de parasitologie
- 9: SAS d'entrée dans les laboratoires P2+
- 10: laboratoire P2+ réservé pour les maladies respiratoires
- 11: SAS de stockage des échantillons
- 12: salle d'électrophorèse
- 13: laboratoire P2+ de travail sur les salmonelles

FRENCH

**remel**

## RapID™ ONE System

### INDICATION

Le système RapID™ ONE de Remel est une microméthode qualitative faisant appel à des substrats conventionnels et chromogènes pour l'identification des *Enterobacteriaceae* médicalement importants, ainsi que d'autres bacilles à oxydase négative et à Gram négatif, isolés à partir de prélèvements cliniques d'origine humaine. Le tableau différentiel RapID™ ONE contient la liste intégrale des organismes concernés par le système RapID™ ONE.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le système RapID™ ONE se compose (1) des plaquettes RapID™ ONE et (2) du réactif RapID™ ONE. Chaque plaquette RapID™ ONE est constituée de plusieurs cavités réactives moulées à la périphérie d'un plateau jetable en plastique. Les cavités réactives contiennent des réactifs déshydratés et le plateau autorise l'inoculation simultanée de toutes les cavités par une quantité prédéterminée d'inoculum. Une suspension de l'organisme testé dans le liquide d'inoculation RapID™ est utilisée comme inoculum pour la réhydratation et le début des réactions au test. Après incubation de la plaquette, la réactivité de chaque cavité de test est déterminée par observation d'un virage de couleur. Dans certains cas, il est nécessaire d'ajouter des réactifs dans les cavités pour provoquer ce virage de couleur. Le profil de tests positifs et négatifs qui en résulte sert de base à l'identification de l'isolat à tester par comparaison des résultats obtenus à des profils de réactivité enregistrés dans une base de données ou par utilisation d'une liste de codes générée par ordinateur.

### PRINCIPE

Les tests utilisés avec le système RapID™ ONE reposent sur la détection par différents indicateurs de la dégradation microbienne de substrats spécifiques. Les réactions employées qui combinent tests conventionnels et tests chromogéniques sur substrat unique sont décrites ci-après dans le tableau 1.

Tableau 1. Principes et composants du système RapID™ ONE

N° de cavité	Code du test	Ingrédients réactifs	Quantité	Principe	N° dans la bibliographie
1	URE	Urée	0,25 %	L'hydrolyse de l'urée produit des éléments basiques entraînant une hausse du pH et le changement de l'indicateur.	1, 3
2	ADH	Arginine	1,0 %	L'hydrolyse du substrat acide aminé produit des éléments basiques entraînant une hausse du pH et le changement de l'indicateur.	1-3
3	ODC	Ornithine	1,0 %		
4	LDC	Lysine	1,0 %		
5	TET	Thiol aliphatique	0,2 %	L'hydrolyse du composé thiol produit des éléments acides entraînant une baisse du pH et le changement de l'indicateur.	4
6	LIP	Ester d'acide gras	1,0 %	L'hydrolyse de l'ester d'acide gras provoque la libération d'éléments acides entraînant une baisse du pH et le changement de l'indicateur.	3, 4
7	KSF	Aldéhyde de glucose	1,0 %	L'hydrolyse des hydrates de carbone produit des éléments acides entraînant une baisse du pH et le changement de l'indicateur.	3, 4
8	SBL	Sorbitol	1,0 %		
9	GUR	p-nitrophényl-β-D-glucuronide	0,1 %		
10	ONPG	o-nitrophényl-β-D-galactoside	0,1 %		
11	βGLU	p-nitrophényl-β-D-glucoside	0,1 %		
12	βXYL	p-nitrophényl-β-D-xyloside	0,1 %	L'hydrolyse enzymatique du groupement glycoside ou phosphoester aryl substitué incolore entraîne la libération d'o- ou de p-nitrophényl jaune.	1, 3, 4-7
13	NAG	p-nitrophényl-N-acétyl-β-D-glucosaminide	0,1 %		
14	MAL	Malonate	0,5 %	L'utilisation du malonate produit des éléments basiques entraînant une hausse du pH et le changement de l'indicateur.	1, 3
15	PRO	Proline-β-naphthylamide	0,1 %	L'hydrolyse enzymatique du substrat arylamide entraîne la libération de β-naphthylamine libre qui est détectée par le réactif RapID™ ONE.	2, 7
16	GGT	γ-glutamyl-β-naphthylamide	0,1 %		
17	PYR	Pyroglutonyl-β-naphthylamide	0,1 %		
18	ADON	Adonitol	1,0 %	L'hydrolyse des hydrates de carbone produit des éléments acides entraînant une baisse du pH et le changement de l'indicateur.	1, 3
18	IND	Tryptophane	0,4 %	L'utilisation du tryptophane provoque la formation d'indole qui est détecté par le réactif spot indole RapID™.	1-3

### RÉACTIFS\*

Réactif RapID™ ONE (fourni dans le kit)

(15 ml/flacon)

Ingrédients réactifs par litre :

p-diméthylaminocinnamaldéhyde .....0.06 g

Liquide d'inoculation RapID™ (REF R8325106, fourni séparément)

(2 ml/tube)

KCl .....6.0 g

CaCl<sub>2</sub> .....0.5 g

Eau déminéralisée .....1000.0 ml

Réactif Spot Indole RapID™ (REF R8309002, fourni séparément)

(15 ml/flacon)

p-diméthylaminocinnamaldéhyde .....10.0 g

Acide chlorhydrique .....100.0 ml

Eau déminéralisée .....900.0 ml

\*Avec compensations éventuelles pour satisfaire aux normes de performance.

### PRÉCAUTIONS

Ce produit exclusivement destiné à un usage diagnostique *in vitro* ne doit être utilisé que par des personnes dûment formées. Toutes les précautions contre les risques microbiologiques doivent être prises et il est indispensable de bien stériliser les prélèvements, les récipients, les milieux et les plaquettes de test après usage. Toutes les instructions doivent être lues attentivement et scrupuleusement respectées.

### Attention !

1. Le réactif RapID™ ONE est toxique et peut être nocif pour l'environnement. Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau ou les yeux. Peut altérer la fertilité ou avoir des effets néfastes sur l'enfant pendant la grossesse.
2. Le réactif spot indole RapID™ peut irriter la peau, les yeux et les voies respiratoires.
3. Se reporter aux fiches signalétiques pour des détails sur les réactifs chimiques.

**STOCKAGE**

Le système Rapid™ ONE et le réactif spot indole Rapid™ doivent être stockés dans leur conditionnement d'origine et conservés à une température de 2 à 8°C jusqu'à utilisation. Attendre que les produits soient à température ambiante avant de les utiliser. NE PAS échanger les réactifs provenant de différents systèmes Rapid™. Sortir seulement le nombre de plaquettes nécessaires au test. Refermer immédiatement le sachet en plastique et remettre le produit dans son lieu de stockage entre 2 et 8°C. Une fois sorties, les plaquettes doivent être utilisées le jour même. Le liquide d'inoculation Rapid™ doit être stocké dans son flacon d'origine et conservé à température ambiante (20 à 25°C) jusqu'à son utilisation.

**DÉTÉRIORATION DU PRODUIT**

Ce produit ne doit pas être utilisé si (1) la couleur du réactif a changé, (2) la date de péremption est dépassée, (3) le plateau en plastique est cassé ou son dispositif de fermeture est endommagé ou (4) qu'il présente d'autres signes de détérioration.

**COLLECTE, STOCKAGE ET TRANSPORT DE PRÉLÈVEMENTS**

Les prélèvements doivent être collectés et manipulés conformément aux recommandations en usage dans la profession.<sup>8,2</sup>

**MATÉRIEL FOURNI**

(1) 20 plaquettes Rapid™ ONE, (2) 20 formulaires de rapport, (3) réactif Rapid™ ONE (flacon compte-gouttes en plastique contenant du réactif pour 20 plaquettes), (4) 2 boîtes d'incubation en aggloméré, (5) mode d'emploi.

**MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI**

(1) Dispositif de stérilisation en boucle, (2) boucle à inoculation, porte-coton, récipients de collecte, (3) incubateurs, systèmes environnementaux alternatifs, (4) milieux supplémentaires, (5) organismes de contrôle de qualité, (6) réactifs de coloration de Gram, (7) lamelles de microscope, (8) réactif d'oxydase, (9) porte-coton, (10) liquide d'inoculation Rapid™ - 2 ml (REF R8325106), (11) échelle de turbidité n° 2 McFarland standard ou équivalent (REF R20412), (12) pipettes, (13) réactif spot indole Rapid™ (REF R8309002), (14) liste de codes Rapid™ ONE (REF R8326006) ou ERIC® (Electronic Rapid™ Compendium, REF R8323600).

**PROCÉDURE****Préparation de l'inoculum:**

1. Cultiver les organismes à tester en culture pure et effectuer une coloration de Gram et un test d'oxydase avant de les utiliser dans le système.

**Remarques:**

- Seuls les bacilles à oxydase négative, et à Gram négatif doivent être testés sur le système Rapid™ ONE. Les bacilles à oxydase positive doivent être testés sur le système Rapid™ NF Plus.
- Le test d'oxydase doit être interprété avec précaution en cas d'utilisation de croissance bactérienne provenant de différentes géloses contenant des teintures car ces dernières peuvent perturber l'interprétation.

2. Les organismes à tester peuvent être retirés de divers milieux de croissance de gélose sélectifs et non sélectifs. Les types de milieux suivants sont recommandés:

Milieux non sélectifs: gélose trypticase soja avec ou sans 5% de sang de mouton; gélose nutritive.

Milieux différentiels ou sélectifs: gélose de Hektoen; gélose de MacConkey; gélose d'éosine-bleu de méthylène; gélose désoxycholate; gélose Salmonella-Shigella.

**Remarques:**

- Utiliser de préférence des boîtes de culture âgées de 18 à 24 heures pour la préparation de l'inoculum. Les isolats à prolifération lente peuvent être testés sur des boîtes de culture âgées de 48 heures.
- L'utilisation de milieux autres que ceux recommandés peut nuire aux performances du test.

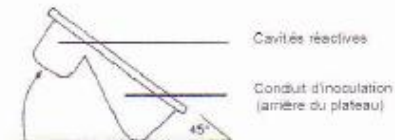
3. À l'aide d'un porte-coton ou d'une anse d'inoculation, suspendre une quantité suffisante de croissance bactérienne prélevée sur la boîte de culture sur gélose dans le liquide d'inoculation (2 ml) Rapid™ afin d'obtenir une suspension d'une turbidité comparable à l'échelle de McFarland n°2 ou un équivalent.

**Remarques:**

- Les suspensions de turbidité nettement inférieure à l'échelle de McFarland n°2 provoquent des réactions aberrantes.
  - Les suspensions bactériennes d'une turbidité **légèrement** supérieure à l'échelle de McFarland n°2 sont sans effet sur les performances du test et sont recommandées pour les cultures souches et les souches destinées au contrôle qualité. Cependant, les suspensions présentant une turbidité très supérieure à l'échelle de McFarland n°2 nuisent aux performances du test.
  - Mélanger les suspensions de façon homogène en utilisant, le cas échéant, un agitateur-mélangeur vortex.
  - Les suspensions doivent être utilisées dans les 15 minutes suivant leur préparation.
4. Prélever éventuellement une pleine anse de la suspension à tester et inoculer une boîte de culture sur gélose pour en vérifier la pureté et effectuer tout test supplémentaire, le cas échéant. Incuber la boîte de culture pendant 18 à 24 heures à une température comprise entre 35 et 37°C.

**Inoculation des plaquettes Rapid™ ONE:**

1. Retirer la membrane de la plaquette recouvrant le port d'inoculation en tirant vers le haut et vers la gauche la languette portant la mention « Peel to Inoculate ».
2. À l'aide d'une pipette, transférer doucement l'intégralité du contenu du tube de liquide d'inoculation dans l'angle inférieur droit de la plaquette. Reboucher le port d'inoculation en remettant en place la languette précédemment retirée.
3. Après avoir ajouté la suspension, tout en maintenant la plaquette en contact avec une surface plane, écarter la plaquette des cavités réactives en la plaçant à un angle d'environ 45 degrés (voir ci-dessous).



4. Alors qu'elle est toujours penchée, agiter doucement la plaquette pour obtenir une distribution homogène de l'inoculum le long des déflecteurs arrière, comme sur l'illustration ci-dessous.



5. Tout en stabilisant la plaquette en position horizontale (le plus simple est de faire reposer le fond des cavités réactives sur la pailleuse), faire basculer doucement la plaquette vers les cavités réactives jusqu'à ce que l'inoculum s'y écoule depuis les déflecteurs (voir ci-dessous). Tout l'inoculum doit s'évacuer de la partie arrière de la plaquette.

**Remarque:** Si le mouvement de basculement de la plaquette est trop brusque, il se peut que de l'air soit emprisonné au point de jonction de la cavité de test, d'où une restriction de déplacement du liquide.



6. Remettre la plaquette en position horizontale. Le cas échéant, tapoter doucement la plaquette sur la pailleuse pour évacuer l'air emprisonné dans les cavités.

**Remarques:**

- Vérifier que les cavités sont remplies de façon uniforme, sans bulles. De très légères irrégularités de remplissage des cavités sont acceptables et n'affectent pas les performances du test. Si la plaquette comporte des problèmes de remplissage importants, elle doit être jetée et une autre plaquette doit être inoculée.
- Terminer l'inoculation de chaque plaquette destinée à recevoir le liquide d'inoculation avant d'en inoculer de nouvelles.
- L'inoculum ne doit pas rester dans la partie arrière de la plaquette pendant des périodes prolongées avant la fin de la procédure.

### Incubation des plaquettes RapiD™ ONE:

Mettre à incuber les plaquettes inoculées entre 35 et 37°C dans un incubateur sans CO<sub>2</sub> pendant 4 heures. Pour faciliter la manipulation, les plaquettes peuvent être mises à incuber dans les boîtes d'incubation en aggloméré fournies avec le kit.

### Évaluation des plaquettes RapiD™ ONE:

Les plaquettes RapiD™ ONE contiennent 18 cavités réactives permettant d'enregistrer 19 résultats de tests. La cavité 18 est bifonctionnelle; elle peut accueillir deux tests différents. Les tests bifonctionnels sont interprétés une première fois avant l'ajout de réactif, ce qui donne un premier résultat, puis la même cavité est examinée à nouveau après l'ajout de réactif pour obtenir un second résultat. Un cadre dessiné autour des cavités 15 à 17 indique quels sont les tests nécessitant le réactif RapiD™ ONE. Le test bifonctionnel n° 18, qui utilise le réactif spot indole RapiD™, est indiqué par un cadre tracé autour du test nécessitant le réactif.

1. Tout en maintenant fermement la plaquette RapiD™ ONE sur la paillasse, retirer la membrane recouvrant les cavités réactives en tirant vers le haut et vers la gauche la languette située en bas à droite.

- Ajouter deux gouttes de réactif RapiD™ ONE dans les cavités 15 (PRO) à 17 (PYR).
  - Lire et interpréter les résultats des cavités 1 (URE) à 18 (ADON), de gauche à droite, conformément au guide d'interprétation du tableau 2. Consigner les résultats dans les cases du formulaire prévues à cet effet, en utilisant le code indiqué au-dessus de la barre pour les tests bifonctionnels.
  - Ajouter 2 gouttes de réactif spot indole RapiD™ dans la cavité n° 18 (ADON/IND).
- Remarque:** Seul le réactif spot indole RapiD™ (REF R8309002) doit être utilisé. Le réactif indole de Kovacs ou d'Ehrlich ne donne pas de résultats satisfaisants.
- Patienter au moins 10 secondes et au plus 2 minutes pour permettre le développement de la couleur.
  - Évaluer le résultat de la cavité n°18 (IND). Consigner les résultats dans la case prévue à cet effet sur le formulaire de rapport.
  - Identifier le microcode obtenu sur le formulaire de rapport à l'aide de la liste de codes RapiD™ ONE ou ERIC® (Electronic RapiD™ Compendium).

### Emplacement de test sur plaquette RapiD™ ONE

N° de cavité	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Code du test	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	βGLU	βXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON
															Réactif RapiD™ ONE			IND

Tableau 2. Interprétation des tests du système RapiD™ ONE\*

N° de cavité	Code du test	Réactif	Réaction		Commentaires
			Positif	Négatif	
1	URE	Aucun	Rouge ou violet	Jaune ou orange	Seule une coloration violacée ou rouge bien définie doit être considérée comme la marque d'un test positif.
2	ADH				
3	ODC	Aucun	Violacé brillant ou bleu	Jaune, gris, paille ou vert-jaune	Seule une coloration violacée brillante ou bleue bien définie doit être considérée comme la marque d'un test positif. Les teintes jaunes, grises, paille, marron ou vertes sont à considérer comme une réaction négative.
4	LDC				
5	TET				
6	LIP	Aucun	Jaune	Rouge ou orange	Seule une coloration jaune bien définie dans toute la cavité doit être considérée comme la marque d'un test positif. Des couches de couleur jaune ne doivent pas être considérées comme un résultat positif. Il peut être nécessaire de mélanger le contenu des cavités avec un bâtonnet applicateur pour faciliter la lecture.
7	KSF				
8	SBL				
9	GUR				
10	ONPG				
11	βGLU	Aucun	Jaune	Légère coloration ou brun clair	Seule une coloration jaune bien définie doit être considérée comme la marque d'un test positif. Des teintes jaune pâle ou non définies doivent être considérées comme un résultat négatif.
12	βXYL				
13	NAG				
14	MAL	Aucun	Rouge	Jaune ou orange	Seule une coloration rouge bien définie doit être considérée comme la marque d'un test positif. Des nuances orangées sont à considérer comme une réaction négative.
15	PRO	Réactif RapiD™ ONE	Violet, violacé, rouge ou rose soutenu	Légère coloration, jaune, orange ou rose très pâle	Seule une coloration violette, violacée, rouge ou rose foncée bien définie doit être considérée comme la marque d'un test positif. L'orange jaune pâle ou les nuances rosâtres sont à considérer comme négatives.
16	GGT				
17	PYR				
18	ADON	Aucun	Jaune ou orange très clair	Rouge ou rouge orangé foncé	Toute coloration jaune ou jaune orangée dans toute la cavité doit être considérée comme la marque d'un test positif.
18	IND	Réactif Spot Indole RapiD™	Marron, noir ou violacé	Orange ou rouge	Toute coloration marron, violacée ou noire bien définie doit être considérée comme la marque d'un test positif.

\*REMARQUE : Les plaquettes doivent être examinées en regardant les cavités réactives contre un fond blanc.

## RÉSULTATS ET PLAGE DES VALEURS ATTENDUES

Le tableau différentiel Rapid™ ONE illustre les résultats escomptés pour le système Rapid™ ONE. Les résultats du tableau différentiel sont exprimés sous la forme d'une série de pourcentages positifs pour le test de chaque système. Ces informations apportent un soutien statistique à l'utilisation de chaque test et, par un codage chiffré des résultats de tests numériques, constituent la base d'une approche probabiliste pour l'identification de l'isolat à tester.

Les identifications s'effectuent en associant les résultats des tests réalisés sur les plaquettes Rapid™ ONE à d'autres tests de laboratoire (ex. : coloration de Gram, oxydase) pour définir un profil ressemblant statistiquement à la réactivité connue de taxons enregistrés dans la base de données du système Rapid™. Ces profils sont comparés à l'aide du tableau différentiel Rapid™ ONE ou déterminés à partir d'un microcode et de la liste des codes Rapid™ ONE ou ERIC®.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Tous les numéros de lot du système Rapid™ ONE ont été testés avec les organismes de contrôle qualité suivants et reconnus acceptables. Les tests des organismes de contrôle effectués doivent satisfaire aux critères établis pour les procédures de contrôle qualité en laboratoire. En cas de résultats de contrôle qualité aberrants, ne pas retenir les résultats obtenus sur les échantillons cliniques. Le tableau 3 donne la liste des

résultats escomptés pour les organismes soumis à la batterie de tests sélectionnée.

### Remarques:

- Le contrôle qualité du réactif Rapid™ s'effectue par obtention des réactions attendues pour les tests nécessitant l'ajout de réactifs (cavités 15 à 18).
- Les organismes ayant été transférés de façon répétée et prolongée dans des milieux gélosés donnent parfois des résultats aberrants.
- Les souches destinées au contrôle qualité doivent être congelées ou lyophilisées. Avant utilisation, ces souches doivent être transférées deux ou trois fois de leur lieu de stockage sur un milieu gélosé recommandé avec le système Rapid™ ONE.
- Les formules, les additifs et les ingrédients des milieux de culture varient d'un fabricant à l'autre et peuvent même varier d'un lot à l'autre. Il en résulte que les milieux de culture peuvent parfois influencer l'activité enzymatique constitutive de certaines souches destinées au contrôle qualité. Si les résultats d'une souche contrôle qualité ne sont pas conformes aux profils attendus, une sous-culture implantée dans un milieu provenant d'un autre lot ou d'un autre fabricant élimine souvent ces disparités.

Tableau 3. Contrôle de qualité des plaquettes Rapid™ ONE

Organisme	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	βGLU	βXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 6380	+	V	-	-	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> <sup>2</sup> ATCC® 25922	-	-	+	(+)	-	-	-	(+)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	V	+	V	V	V	+	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	-	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> <sup>2</sup> ATCC® 13048	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	-	-

+ = positif, - = négatif, V = variable, (+) = généralement positif

<sup>2</sup>Les souches indicatrices principales présentent des performances acceptables du substrat le plus labile du système et une réactivité dans un nombre important de puits, conformément aux préconisations du « Clinical and Laboratory Standards Institute » relatives à un contrôle de qualité simplifié.<sup>14</sup>

## LIMITES

- L'utilisation du système Rapid™ ONE et l'interprétation des résultats exigent l'intervention d'un technicien de laboratoire compétent et formé aux méthodes générales en vigueur en microbiologie, capable en outre de mettre judicieusement à profit ses connaissances, son expérience, les informations sur les prélèvements et toutes les autres procédures pertinentes avant d'émettre un avis quant à l'identité de l'isolat obtenu à l'aide du système Rapid™ ONE.
- L'origine des prélèvements, le test d'oxydase, les résultats de la coloration de Gram et de la croissance sur géloses sélectives doivent être pris en compte lors de l'utilisation du système Rapid™ ONE.
- Le système Rapid™ ONE doit être utilisé sur des cultures pures des organismes à tester. L'utilisation de populations microbiennes non homogènes ou le test direct de matériel clinique sans culture donne des résultats aberrants.
- Le système Rapid™ ONE est conçu pour être utilisé avec les taxons dont la liste est donnée dans le tableau différentiel Rapid™

ONE. L'utilisation d'organismes non recensés dans ces listes peut conduire à des erreurs d'identification.

- Les valeurs attendues répertoriées pour le système Rapid™ ONE peuvent différer des résultats de tests conventionnels ou des informations publiées précédemment.
- La précision du système Rapid™ ONE repose sur l'utilisation statistique d'une multiplicité de tests spécialement conçus et sur une base de données exclusive. L'utilisation individuelle des tests proposés par le système Rapid™ ONE dans le but d'établir l'identification d'un isolat testé est sujette aux erreurs inhérentes à ce test pris de façon autonome.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Les performances du système Rapid™ ONE ont été établies par des tests de laboratoire réalisés par Remel sur des cultures de référence et des cultures souches, ainsi que par des évaluations cliniques utilisant des isolats cliniques frais et des isolats souches.<sup>10-13</sup>

Reference #, No. de référence, Referenz-Nr. \_\_\_\_\_

Date, Date, Datum \_\_\_\_\_

Tech, Tech, Techn. \_\_\_\_\_

Source, Source, Quelle \_\_\_\_\_

Reagent / Réactif / Reagenz	None, Aucun, Keine,													RapID ONE Reagent / Réactif RapID ONE / RapID ONE Reagens			None / Aucun / Keine		RapID Spot Indole	
Positive Reactions / Réactions positives / Positive Reaktionen	Red or violet / Rouge ou violet / Rot oder Violett		Bright Purple or blue / Violaocé brillant ou bleu / Leuchtendes Purpur oder Blau			Yellow / Jaune / Gelb							Red / Rouge / Rot	Violet, purple, red, or dark pink / Violet, violaocé, rouge ou rose soutenu / Purpur, Violett, Rot oder Dunkelrosa			Yellow or very light orange / Jaune ou orange très clair / Gelb oder sehr helles Orange		Brown, black, or purple / Marron, noir ou violaocé / Braun, Schwarz oder Purpur	
Cavity #, No. cavité / Kammer-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18	
Test Code / Code du test / Testcode	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	BGLU	BXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI
Value / Valeur / Wert	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
Result / Resultat / Ergebnis																				
Value Total / Total des valeurs / Gesamtwert																				

IDENTIFICATION / IDENTIFICATION / IDENTIFIZIERUNG \_\_\_\_\_



Microcode \_\_\_\_\_  
 REMEL Inc 800-255-6730 Printed in USA 9/03

**Annexe n°7 : Liste et définition des variables explicatives non retenues pour le modèle statistique**

<i>Variables</i>	<i>Classes</i>	<i>Pourcentages des restaurants concernés par les différentes classes</i>
Type de plat à base de porc	Porc seul	30,9
	Porc et accompagnement	65,7
	Porc vendu avec une autre viande	3,4
Catégorie	Indépendantes	61,7
	Familiales	38,3
	Société	0
Uniforme spécifique pour le personnel	Non	58,3
	Oui	41,7
Lavage des habits et uniformes au moins deux fois par semaine	Non	58,3
	Oui	41,7
Fréquence de lavage des mains en cuisine	Régulièrement ou à chaque nouvelle commande	51,7

	Parfois ou en début et fin de service	48,3
Fréquence de lavage des mains en salle	Régulièrement et à chaque nouvelle commande	48,3
	Parfois ou en début et fin de service	51,7
Lavage des mains avec un produit désinfectant	Non	1,7
	Oui	98,3
Eau utilisée pour le lavage des mains	Eau de ville	96,6
	Eau de rivière	0
	Eau de puits	1,7
	Autre	1,7
Lavage du matériel de préparation des plats entre chaque préparation	Non	3,3
	Oui	96,7
Produit de lavage du matériel de cuisine si pratique réalise	Eau et savon	98,4
	Eau seulement	0
	Tablier	0
	Autre	0
Lavage des plats de service entre chaque commande	Non	0
	Oui	100
Produit de lavage utilisé pour les plats	Eau et savon	100
	Eau seulement	0
	Tablier	0
	Autre	0
Fréquence de remplacement des nappes pour les restaurants les utilisant	Chaque jour	43
	Tous les trois jours	0
	Chaque semaine	7
	Quand elles sont sales	43
	Autre	7
Origine de la viande vendue en restaurant	Elevage familial	3,3

	Elevage professionnel	31,7
	Boucherie	65
Nombre de boucheries partenaires	Une	93,3
	Deux	5
	Plus de deux	1,7
Boucherie préférée	Non	1,7
	Oui	98,3
Raison pour la boucherie préférée	Prix de la viande	21,6
	Qualité de la viande	75
	Sécurité qu'apporte la boucherie	1,7
	Proximité de la boucherie par rapport à la gargote	1,7
	Régularité de la boucherie dans l'approvisionnement de la gargote en viande	0
		0
	Famille	0
Mode de transport de la viande jusqu'à l'établissement	Pied/voiture/bus avec glacière	5
	Pied/voiture/bus sans glacière	95
Temps de transport de la viande jusqu'à l'établissement	Moins d'une heure	83,3
	Plus d'une heure	16,7
Horaire de livraison de la viande	Tôt le matin	18,3
	Le matin	43,3
	Dans la journée	38,3
Surveillance température de cuisson de la viande	Non	50
	Oui	50
Surveillance du temps de cuisson de la viande de porc	Moins d'une heure	6,7
	Plus d'une heure	73,3
	Non	11,7
Nettoyage des légumes	Non	5



	Oui	95
Mode de cuisson de la viande de porc vendue	Bouillie	100
Préparation des plats à base de porc	La vielle	38,3
	Le matin même	61,3
Mode de sockage des plats avant leur vente	Au froid	1,7
	A température ambiante	56,7
	Au chaud	35
Mode de stockage des plats s'ils ne sont pas vendus le jour même et en cas de conservation des invendus	Au froid	6,7
	A température ambiante	3,3
	Au chaud	1,7
Nettoyage de l'établissement	Non	0
	Oui	100
Fréquence de nettoyage de l'établissement	Plusieurs fois dans la journée	11,7
	Une fois par jour	81,7
	Chaque semaine	6,7
Produit de nettoyage	Désinfectant	61,7
	Désinfectant et eau	31,7
	Eau seule	6,7
Existence de moyen de lutte contre les nuisibles	Non	35
	Oui	65
Type de moyen de lutte	Mécanique	16,7
	Chimique	48,3
	Aucun	35
Protection contre la boue	Non	35
	Oui	65

Protection contre les insectes	Non	43,3
	Oui	56,7
Proximité avec la rue	Très proche	61,7
	Proche	20
	Eloigné	18,3
Présence d'une cuisine isolée de la salle de service	Non	56,7
	Oui	43,3

### **Bibliographie :**

- Abdalla M.A., Sihanm E.S., Alian Y.Y.H.A. and Amel O.B., 2008. Food safety knowledge and practice of street food-vendors in Khartoum city. *Sud. J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 47, 126-136.
- Acha P.N. and Szyfres B., 2005. Salmonellose. *In: Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Volume I : bactérioses et mycoses, Troisième édition, OIE, Paris, France, p 213-227.*

- Adams M.R. and Moss M.O., 1995. Salmonella. *In: Food microbiology*; second edition. Royal Society of Chemistry , p 237-240.
- Akaike H., 1974. A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control AU-19*, 716– 722.
- Amoah P., Drechsel P., Abaidoo R.C. and Ntow W. J., 2006. Pesticide and Pathogen Contamination of Vegetables in Ghana's Urban Markets. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 1–6.
- Ancelle T., 2011. Chapitre 13: Utilisation pratique des tests statistiques. *In: Statistique épidémiologie*, 3ème édition, Maloine, Paris, p 160.
- Attala O.A. and Kassem G.M.A, 2011. Effect of Good Manufacturing Practices (GMPs) application on the bacteriological status of butcher's area in small scale meat processing plant. *Global Veterinaria* 7 (2), 123-128.
- Badrie, N., Joseph, A., Chen, A., 2003. An observational study of food safety practices by street vendors and microbiological quality of street-purchased hamburger beef patties in Trinidad, West Indies. *Internet Journal of Food Safety* 3, 25– 31.
- Barro N. et al., 2007. Street-Vended Foods Improvement: Contamination Mechanisms and Application of Food Safety Objective Strategy: Critical Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 6 (1), 1-10.
- Berends B.R., Van Knapen F., Mossel D.A.A. and Burt S.A., 1998. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *International Journal of Food Microbiology* 44, 207-217.
- Bhanti M. and Taneja A., 2007. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. *Chemosphere* 69, 63–68.
- Bonardi S. et al., 2003a. Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 85, 101– 110.
- Bonardi S. et al., 2003b. Isolation of *Salmonella enterica* from Slaughtered Pigs. *Veterinary Research Communications*, 27 Suppl. 1, 281–283.
- Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G. et Verne-Bourdais E., 2002. Chapitre V: recherche et identification des microorganismes responsables de toxi-infections alimentaires. *In: Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires*, doin éditeur - Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Bordeaux, France, p 153-178. [On line]. [2012/08/06]. <URL : [http://books.google.mg/books?id=Td\\_lde2hLX4C&pg=PA177&lpg=PA177&dq=salmonelle+ONPG&source=bl&ots=xmAs0IJl3&sig=VOfQ2eMI54LHZ4XGnYSIVOU0wAc&hl=fr&sa=X&ei=7bcfUO7tBOXq0gGDt4HQDw&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=salmonelle%20ONPG&f=false](http://books.google.mg/books?id=Td_lde2hLX4C&pg=PA177&lpg=PA177&dq=salmonelle+ONPG&source=bl&ots=xmAs0IJl3&sig=VOfQ2eMI54LHZ4XGnYSIVOU0wAc&hl=fr&sa=X&ei=7bcfUO7tBOXq0gGDt4HQDw&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=salmonelle%20ONPG&f=false) >.
- Botteldoorn N. et al., 2003. Salmonella on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *Journal of Applied Microbiology* 95, 891–903.

- Bouyer J., 1996. Chapitre 7: Comparaison de deux pourcentages. *In: Méthodes statistiques Médecine – Biologie*, Inserm, De Boeck Estem, Paris, p 122.
- Brenner F. W., Villar R. G., Angulo F. J., Tauxe R., Swaminathan B., 2000. Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology Vol. 38, No. 7*, 2465–2467
- Cardinale E., Perrier Gros-Claude J.D., Tall F., Guèye E.F., Salvat G., 2005. Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended poultry dishes in Dakar, Senegal. *International Journal of Food Microbiology 103*, 157-165.
- Carrasco E., Morales-Rueda A. and García-Gimeno R.M., 2012. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International 45*, 545–556.
- CEDEAO-CSAO/OCDE, 2007. Atlas de l'intégration régionale en Afrique de l'Ouest, série population. Les dynamiques démographiques. [On line]. [2012/07/02]. <URL : <http://www.oecd.org/dataoecd/7/42/39803778.pdf> >.
- CGAD, 2006. Paquet hygiène. Journal Officiel de l'Union européenne du 30/04/2004. [On line]. [2012/02/10]. <URL : <http://www.lesmetiersdugout.fr>>.
- Chauliac M., Bricas N., Ategbro E., Amoussa W. and Zohoun I., 1998. Food habits outside the home by school children in Cotonou (Benin). *Sante Volume 8 Issue 2*, 101-109.
- Chen C-Y. et al., 2012. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection 45*, 228-236.
- Choudhury M., Mahanta L.B., Sarmah Goswami J., M. Dutta Mazumder M., 2011. Will capacity building training interventions given to street food vendors give us safer food? A cross-sectional study from India. *Food Control 22*, 1233-1239.
- De Jong B. et Ekdahl K., 2006. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *BMC Public Health, 6, 4*, 9p.
- Delarras C., 2007. Chapitre n°5: 5) Milieux de culture pour Salmonella et Shigella. *In: Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*, Lavoisier, Clamecy, France, p 265-268.
- Denis F., Ploy M-C., Martin C., Bingen E. et Quentin R., 2007. Chapitre 31: Bacilles Gram négatif aéro-anaérobies. *In: Bactériologie médicale, techniques usuelles*, Elsevier-Masson, Issy-les-Moulineaux, France, p 306-310.
- Dharod M.J. et al., 2009. Bacterial Contamination of Hands Increases Risk of Cross-contamination among Low-income Puerto Rican Meal Preparers. *Journal of Nutrition Education and Behavior Volume 41, Number 6*, 389-397.
- Di Giannatale E. et al., 2012. First outbreak of food poisoning caused by Salmonella enterica subspecies enterica serovar Berta in Italy. *Letters in Applied Microbiology 55*, 122–127.

- Dione M.M. et al., 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Salmonella Isolated from Broiler Farms, Chicken Carcasses, and Street-Vended Restaurants in Casamance, Senegal. *Journal of food protection Volume 72 Issue 11*, 2423-2427.
- Donkor E.S., Kayang B.B., Quaye J. and Akyeh M.L., 2009. Application of the WHO Keys of Safer Food to Improve Food Handling Practices of Food Vendors in a Poor Resource Community in Ghana. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6, 2833-2842.
- Dougan G., John V., Palmer S., Mastroeni P., 2011. Immunity to salmonellosis. *Immunological Reviews Vol. 240*, 196–210.
- Ekanem E.O., 1998. The street food trade in Africa: safety and socio-environmental issues. *Food Control Volume 9 Number 4*, 211-215.
- Fan Y-X and Liu X-M, 2008. Quantitative microbiological risk assessment of Salmonella spp. in common catering foods. *Chinese journal of preventive medicine Vol 42 (5)*, 312-318.
- FAO/OMS, 2005a. Le secteur informel de la distribution de produits alimentaires (aliments vendus sur la voie publique): importance et enjeux. In: Conférence régionale FAO/OMS sur la sécurité sanitaire des aliments pour l'Afrique. Harare, Zimbabwe, 3-6 octobre 2005. [On line]. [2012/02/14]. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/010/j6087f.pdf>.
- FAO/OMS, 2005b. Analyse de la Situation des Systèmes de Sécurité Sanitaire des Aliments de la République de MADAGASCAR. In: Conférence régionale FAO/OMS sur la sécurité sanitaire des aliments pour l'Afrique, Harare, Zimbabwe, 3-6 octobre 2005. [On line]. [2012/06/06]. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/af069f.pdf>.
- FAO/OMS, 2005c. Practical actions to promote food safety. In: Regional Conference on Food Safety for Africa, final report. Harare, Zimbabwe, 3-6 October 2005. 144p. [On line]. [2012/07/20]. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/010/a0215e/a0215e00.pdf>.
- FAO/OMS, 2001. Organically Produced Foods. Codex alimentarius commission, joint FAO/WHO Food Standards Programme, Italy, Rome, 73p. [On line]. [2012/02/09]. <URL: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y2772E/Y2772E00.HTM#Contents>>.
- Forsythe S.J. and Hayes P.R., 1999. Food hygiene microbiology and HACCP; third edition. Springer, Gaithersburg, Maryland, USA, 449 p.
- Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P., 2007. Précis de bactériologie clinique, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, France, éditions ESKA, 1764 p.
- Gadaga T.H., Samende B.K., Musuna C., Chibanda D., 2008. The microbiological quality of informally vended foods in Harare, Zimbabwe. *Food Control 19*, 829–832.
- Gerner-Smidt P. and Whichard J.M., 2009. Foodborne Disease Trends and Reports. *Foodborne pathogens and disease, Volume 6, Number 5*, 523-524.
- Gorman R., Bloomfield S. and Adley C.C., 2002. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology 76*, 143– 150.

- Gousia P., Economou V., Sakkas H., Leveidiotou S. and Papadopoulou C., 2011. Antimicrobial Resistance of Major Foodborne Pathogens from Major Meat Products. *Foodborne pathogens and disease Volume 8, Number 1*, 27-38.
- Guerin P.J. et al., 2003. Shigella dysenteriae serotype 1 in West Africa: intervention strategy for an outbreak in Sierra Leone. *Lancet* 362, 705–06.
- Haileselassie M., Taddele H. and Adhana K., 2012. Source(s) of contamination of ‘raw’ and ‘ready-to-eat’ foods and their public health risks in Mekelle City, Ethiopia. *Journal of Food and Agriculture Science Vol. 2(2)*, 20-29.
- Harley J.P. et al., 2010. Partie I: Introduction à la microbiologie. In: Microbiologie, 3ème édition, de boeck, Bruxelles, p26.
- Hosmer, D.W. and Lemeshow, S., 2000. Applied logistic regression. Wiley, New York, 373 p.
- Isara A.R., Isah E.C., Lofor P.V.O. and Ojide C.K., 2010. Food contamination in fast food restaurants in Benin City, Edo State, Nigeria: Implications for food hygiene and safety. *Public health* 124, 467- 471.
- Joffin J-N. et Leyral G., 2006. Microbiologie technique tome 1 dictionnaire des techniques. Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine, 363 p.
- Joly B. et Reynaud A., 2009. *Entérobactéries*, systémique et méthodes de diagnostique. Paris, France, Lavoisier, Editions TEC et DOC, 356 p.
- Kassim Q.Z., Haque M., Aziz A. A. and Cheung H. A. S., 2003. Isolation of Proteus mirabilis from severe neonatal sepsis and central nervous system infection with extensive pneumocephalus. *Eur J Pediatr* 162, 644–645.
- Kernéis S. et al., 2009. A Look Back at an Ongoing Problem: Shigella dysenteriae Type 1 Epidemics in Refugee Settings in Central Africa (1993–1995). *Plos One, Vol 4 Issue 2*, 1-6.
- Kotloff K. L. et al., 1999. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (8), 651-666.
- Le Bouquin S. et al., 2010. Prevalence and risk factors for Salmonella spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 97, 245-251.
- Letellier A. et al., 2009. Risk Factors at Slaughter Associated with Presence of Salmonella on Hog Carcasses in Canada. *Journal of food protection* 72 (11), 2326-2331.
- Lok Wong T., MacDiarmid S. and Cook R., 2009. Salmonella, Escherichia coli O157:H7 and E. coli biotype 1 in a pilot survey of imported and New Zealand pig meats. *Food Microbiology* 26, 177–182.
- Luber P., Brynstad S., Topsch D., Scherer K. and Bartelt E., 2006. Quantification of Campylobacter Species Cross-Contamination during Handling of Contaminated Fresh Chicken Parts in Kitchens. *Applied and environmental microbiology, Vol. 72, No. 1*, 66–70.

- Lublin A. and Sela S., 2008. The Impact of Temperature During the Storage of Table Eggs on the Viability of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Virchow in the Eggs. *Poultry Science* 87, 2208-2214.
- Majowicz S.E. et al., 2010. The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis. *CID* 50, 882-889.
- Mahugija Marco J.A. and Kishimba M.A., 2005. Concentrations of pesticide residues in grasses and sedges due to point source contamination and the indications for public health risks, Vikuge, Tanzania. *Chemosphere* 61, 1293–1298.
- Marin C., Balasch S., Vega S. and Laineza M., 2011. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 98, 39–45.
- Martin W., 1997. A structured approach for analysing survey data and making useful causal inferences. *Epidémiologie santé animale*, 31-32.
- Melloul A.A, Hassani L. and Rafouk L., 2001. *Salmonella* contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 207-209.
- Ministère de l'économie, du commerce et de l'industrie, 2009. Programme National de Renforcement de la Compétitivité des Industries de Madagascar. [On line]. MECI / ONUDI, 128p. [2012/02/13]. <URL : [http://www.gefp.com/admin/docs/madagascar\\_industrial\\_competitiveness\\_plan\\_micp\\_\\_finaldraft\\_\\_0801091.pdf](http://www.gefp.com/admin/docs/madagascar_industrial_competitiveness_plan_micp__finaldraft__0801091.pdf) >.
- Minten B., Randrianarisoa J.C., Randrianarison L., 2003. Agriculture, pauvreté rurale et politiques économiques à Madagascar. [On line]. FOFIFA, INSTAT, Cornell Food and Nutrition Policy Program, 108p. [2012/02/13]. <URL : <http://www.ilo.cornell.edu/ilo/bookfr.html>>.
- Morpeth S.C., Ramadhani H.O. and Crump J.A., 2009. Invasive Non-Typhi *Salmonella* Disease in Africa. *Clinical Infectious Diseases* 49, 606-611.
- Mpuchane S. et al., 2005. Association between german cockroaches (*blattella germanica*) and street food vending: implications for food safety in botswana. In Chow-Yang Lee and William H. Robinson, editors. Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests, Singapore, July 10-15, 2005. [On line]. [2012/05/27]. <URL: <http://idisk.mac.com/chowyang/Public/068.pdf>>.
- Mürmann L., dos Santos M.C., Longaray S.M., Corrêa Both J.M. and Cardoso M., 2008. Quantification and molecular characterization of salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in rio grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 529-534.
- Nicolay N. et al., 2011. *Salmonella enterica* serovar Agona European outbreak associated with a food company. *Epidemiol. Infect.* 139, 1272–1280.
- Niehaus A.J., Apalata T., Coovadia Y.M., Smith A.M. and Moodley P., 2011. An outbreak of foodborne salmonellosis in rural KwaZulu-Natal, South Africa. *Foodborne Pathog Dis.* 8(6), 693-700.

- Ogasawara N. et al., 2008. Antimicrobial Susceptibilities of Salmonella from Domestic Animals, Food and Human in the Mekong Delta, Vietnam. *J. Vet. Med. Sci.* 70(11), 1159–1164.
- Oliveira M. et al., 2010. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded ‘Romaine’ lettuce. *Food Microbiology* 27, 375-380.
- Oliveira C. J.B., Carvalho L. F.O.S., Fernandes S.A., Tavechio A.T. and Domingues Jr F.J., 2005. Prevalence of pigs infected by Salmonella Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. *International Journal of Food Microbiology* 105, 267– 271.
- OMS, 2010. Madagascar: Health profile. Global Health Observatory (GHO). [On line]. [2012/07/19]. <URL: <http://www.who.int/gho/countries/mdg.pdf>>.
- OMS, 2007. Food safety and foodborne illness. Media centre, fact sheet N°237. [On line]. [2012/02/08]. <URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>.
- OMS, 2006. Five keys to safer food manual. [On line]. OMS, 28p. [2012/07/20]. <URL : [http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual\\_keys.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf)>.
- OMS, 1996. Essential Safety Requirements For Street-vended Foods (Revised Edition). [On line]. OMS/FNU/FOS, 36p. [2012/05/20]. <URL : [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/streetvend.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/streetvend.pdf)>.
- Paweena R. and Issaraporn S., 2010. Pathogenic bacterial contaminations in hospital cafeteria foods. *Pakistan Journal of Biology Sciences Volume: 13 Issue: 3*, 143-150.
- Phan, H. and Lehman D., 2012. Cerebral Abscess Complicating Proteus mirabilis Meningitis in a Newborn Infant. *Journal of child neurology Volume: 27 Issue: 3*, 405-407.
- Pikuda O.O. and Ilelaboye N.O.A., 2009. Proximate Composition of Street Snacks Purchased from Selected Motor Parks in Lagos. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (10), 1657-1660.
- Prendergast D.M. et al., 2008. Prevalence and numbers of Salmonella spp. and Enterobacteriaceae on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1209–1219.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. and Carter G.R., 1994. Enterobacteriaceae. *In: Clinical veterinary microbiology*. Mosby, p 209-237.
- Raharisoa M., 2012. Secteur privé : une hausse de salaire confirmée. L’express, quotidien d’information et d’analyse de Madagascar. [On line]. n°5190. [2012/06/30]. <URL : <http://www.lexpressmada.com/5190/secteur-prive-madagascar/33376-une-hausse-de-salaire-confirnee.html>>.
- Razafindramiadana L., 2011. Commerce extérieur : l’embargo sur la viande bovine est levé. L’express, quotidien d’information et d’analyse de Madagascar. [On line]. n°4980. [2012/02/13]. <URL : <http://www.lexpressmada.com/commerce-exterieur-madagascar/25797-l-embargo-sur-la-viande-bovine-leve.html>>.
- Razakarivony L.C., 2010. Contribution à l’amélioration de la sécurité sanitaire des aliments de rue dans le district d’Antananarivo Renivohitra. Mémoire de fin d’étude, Athénée St-Joseph, Antsirabe, Madagascar. 73p.



- Rheinländer T. et al., 2008. Keeping up appearances: perceptions of street food safety in urban Kumasi, Ghana. *Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine*, Vol. 85, No. 6, 952-964.
- Rousset D. et al., 2001. Introduction de la Peste Porcine Africaine a Madagascar, histoire et leçons d'une émergence. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* Vol 67 (1-2), 31-34.
- Sarter G. and Sarter S., 2012. Promoting a culture of food safety to improve hygiene in small restaurants in Madagascar. *Food Control* 25, 165-171.
- Sheth A.N. et al., 2011. A National Outbreak of Salmonella Serotype Tennessee Infections From Contaminated Peanut Butter: A New Food Vehicle for Salmonellosis in the United States. *CID* 53, 356-362.
- Shilangale R.P., Di Giannatale E., Chimwumombe P.M. and Kaaya G.P., 2012. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* in animal feed produced in Namibia. *Veterinaria Italiana*, 4 (2), 125-132.
- Solhan S. et al., 2011. An outbreak of gastroenteritis caused by Salmonella enterica serotype Enteritidis traced to cream cakes. *WPSAR* Vol 2, No 1, 1-8.
- Spiehs M. and Goyal S., 2007. Best management practices for pathogen control in manure management systems. *University of Minnesota*, 1-10.
- Stevens A. et al., 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of Salmonella isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International Journal of Food Microbiology* 110, 178–186.
- Thai T.H., Hirai T., Lan N.T. and Yamaguchi R., 2012. Antibiotic resistance profiles of Salmonella serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. *International Journal of Food Microbiology* 156, 147–151.
- Ukuku D.O. and Sapers G.M., 2007. Effect of time before storage and storage temperature on survival of Salmonella inoculated on fresh-cut melons. *Food Microbiology* 24, 288–295.
- Valleron A-J., 2007. Chapitre 10: Analyses de la liaison entre deux variables. In: *Biostatistique de la biologie à la clinique*, Flammarion, Paris, p 125.
- Van Asselt E.D., De Jong A.E.I., De Jonge R. and Nauta M.J., 2008. Cross-contamination in the kitchen: estimation of transfer rates for cutting boards, hands and knives. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1392–1401.
- Van Boxstael S. et al., 2012. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of Salmonella Typhimurium isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. *Food Research International* 45, 913–918.
- Vindigni M.S et al., 2007. Prevalence of Foodborne Microorganisms in Retail Foods in Thailand. *Foodborne pathogens and disease* Volume 4, Number 2, 208-215.
- Vollaard A. M. et al., 2004. Risk factors for transmission of foodborne illness in restaurants and street vendors in Jakarta, Indonesia. *Epidemiology and Infection* 132, 863-872.

- Von Holy A. and Makhoane F.M., 2006. Improving street food vending in South Africa: Achievements and lessons learned. *International Journal of Food Microbiology* 111, 89–92.
- Woolf B., 1955. On estimating the relation between blood group and disease. *Annals of Human Genetics* 19, 251–253.
- Yan H. et al., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in retail foods in northern China. *International Journal of Food Microbiology* 143, 230–234.
- Zaidi M.B. et al., 2006. Nontyphoidal Salmonella from Human Clinical Cases, Asymptomatic Children, and Raw Retail Meats in Yucatan, Mexico. *Clinical Infectious Diseases* 42, 21–29.