

La qualité microbiologique des viandes de volailles est un enjeu très important, tant sur le plan de la santé publique que sur le plan économique. En effet, la contamination de ces viandes par des micro-organismes pathogènes peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives.

L'abattage est parmi les éléments décisifs qui déterminent la contamination du produit final. Pour fournir un produit sain, un certain nombre de règles d'hygiène doivent être respectées, parmi celles-ci l'application des opérations de nettoyage et de désinfection. Ces opérations doivent faire partie intégrante du processus de transformation permettant aux industriels d'optimiser leurs activités de production, et leur efficacité doit être contrôlée et validée en permanence.

Actuellement, le contrôle des opérations de nettoyage et de désinfection est basé sur des méthodes classiques de croissance des micro-organismes qui nécessitent un temps de réponse de 24 heures au minimum. L'ATPmétrie technique de **biologie moléculaire**, basée sur le principe de la **bioluminescence** qui permet de mesurer la quantité d'ATP présente dans un échantillon est l'une des méthodes de contrôle qui permet l'obtention d'un résultat en quelques minutes et la mise en œuvre des actions correctives dans les délais les plus brefs. Elle permet le dosage de l'ATP d'un prélèvement par digestion à l'aide du complexe enzymatique luciférine-luciférase, l'interaction permet la production d'une quantité de lumière. Cette quantité de lumière, amplifiée par un luminomètre, mesurée en URL (unités relatives de lumière) est proportionnelle à la quantité d'ATP initiale, et donc à la quantité de souillures organiques ou d'agents microbiens dans le prélèvement [8].

Cette étude a consisté à déterminer la corrélation entre deux méthodes de contrôle d'hygiène des surfaces : l'ATPmétrie et le dénombrement de la flore totale, et à fixer un seuil d'acceptabilité des résultats d'ATPmétrie spécifique à l'abattoir de volailles de Taboukert (Wilaya de Tizi-Ouzou, Algérie).

ATPmétrie en abattoir de volailles

Évaluation de la méthode ATP-bioluminescence pour le contrôle de l'efficacité du nettoyage-désinfection en abattoir de volailles

Les caractéristiques de la technique d'ATPmétrie ont permis d'envisager son utilisation pour le contrôle de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection des surfaces dans les abattoirs de volailles. Ce contrôle est généralement basé sur le dénombrement de la flore totale et des entérobactéries, il doit être complété par une méthode comme l'ATPmétrie qui mesure la quantité des résidus issus des débris alimentaires et microbiens.

Science et technique

BENDEDOUCHE B. ; BENSID A.

École Nationale Supérieure Vétérinaire, BP 161, Hacène Badi, El Harrach – ALGER, ALGÉRIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Présentation de l'abattoir

L'étude a été réalisée dans un des abattoirs de volailles de la région centre de la wilaya de Tizi Ouzou, avec une capacité d'abattage de 3 000 sujets par heure, la production a dépassé dans ces trois dernières années 7 350 tonnes de poulet/an.

Cet abattoir est équipé d'une chaîne d'abattage automatique comprenant les opérations suivantes : l'accrochage, l'électro-anesthésie, la saignée des poulets, puis successivement l'échaudage, la plumaison, l'éviscération, le rinçage, le lavage, et enfin le refroidissement et le conditionnement en barquette des carcasses.

Quotidiennement, à la fin des opérations d'abattage, un lavage à l'eau tiède sous pression est réalisé, 4 fois par semaine, un nettoyage et une désinfection sont effectués et consistent en un pré-lavage pour évacuer la majeure partie des souillures, puis une application sous forme de mousse d'un dégraissant-désinfectant alcalin (Bis aminopropyl-laurylamine, tensioactifs anioniques et non ioniques); un rinçage à l'eau, pour évacuer les souillures organiques et microbiologiques issues de la mousse, termine les opérations.

Le pré-lavage et le rinçage sont réalisés avec une lance à eau sous pression pendant vingt minutes à une température de 20 °C. La pression de l'eau est de 20 bars et la distance buse-surface appliquée varie de 1 à 4 mètres.

La température et l'hygrométrie des trois salles de l'abattoir relevées durant notre étude sont : 24 °C et 70 % d'humidité en moyenne dans la salle de saignée et d'échaudage et 20 °C et 55 % dans les salles d'éviscération et de conditionnement, cette différence est due à la présence du bac d'échaudage dans la première salle.

Sites et nombre de prélèvements effectués

Trois cent quatre-vingt-dix-huit échantillons au total ont été réalisés pour les deux méthodes, chaque jour un prélèvement a été effectué par site et par méthode soit un total de 20 prélèvements par jour, notre étude s'est déroulée sur deux périodes : novembre 2007 et janvier 2008.

Les sites de prélèvement choisis, au nombre de dix sont représentés par : la lame des couteaux de la saignée et couteaux fendeurs d'abdomen, les parois internes du bac d'échaudage, les doigts plumés de la plumeuse, les tubes de guidage de l'arrache-têtes, la cuillère de l'éviscéreuse, la lame du craqueur de cou, la tuyère de la laveuse interne, la glissière pour carcasses, la bande transporteuse de carcasses et les paniers transporteurs de carcasses.

Le choix des sites a été motivé par leur contact direct avec les carcasses au cours des opérations d'abattage et la nature de leurs matériaux : acier inoxydable, PVC, Téflon et élastomère qui représentent les matériaux des principaux équipements de l'abattoir.

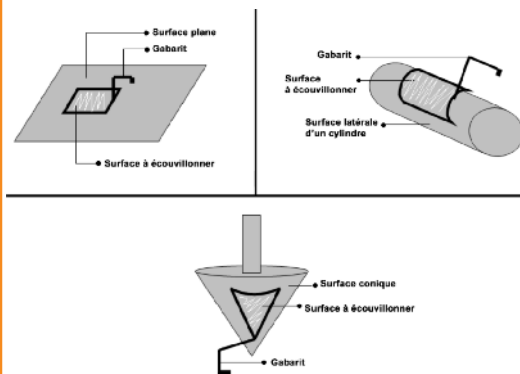
Pour des raisons pratiques, les prélèvements ont été effectués après les opérations de nettoyage et de la désinfection pour permettre aux surfaces à tester de sécher.

Mode de prélèvement des échantillons

Pour les deux méthodes, les échantillons ont été prélevés selon les dispositions de la réglementation française : note de service n°2007-8275 du 14 novembre 2007 par la technique de l'écouvillonnage humide d'une surface de 10 cm² délimitée par un gabarit stérile spécifique pour chaque surface [2, 3]. L'écouvillon de l'ATPmètre se présente sous forme de stylo-test prêt à l'emploi composé d'un écouvillon sec et d'un complexe luciférine-luciférase.

Chaque gabarit a été conçu spécifiquement pour délimiter 10 cm² et prendre la forme d'une partie de la surface à tester, ce qui nous a permis d'exercer la même pression sur toute la surface (figure 1). Presque tous les sites ont une forme plane ou cylindrique sauf la laveuse interne qui prend une forme conique.

Figure 1
DISPOSITION DES GABARITS UTILISÉS
POUR LES PRÉLÈVEMENTS SUR LES
SURFACES À TESTER



Dénombrement de la flore totale

Les échantillons sont préparés conformément à la réglementation française [2]. Ils ont été soumis au dénombrement de la flore aérobique mésophile totale sur milieu PCA (Plat Count Agar) conformément à la norme Afnor NF V 08-051.

Chaque écouvillon a été collecté dans un flacon contenant 40 mL de solution TSE (tryptone sel eau). Ce flacon a été secoué vigoureusement avant la dilution. À partir de cette solution mère, des séries de dilutions décimales jusqu'à la dilution 10⁻⁴ sont réalisées conformément à la norme ISO 6887-1. L'incubation est faite à 30 °C pendant 72 heures. Les colonies apparentes sont dénombrées.

Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par millilitre (UFC/mL) de produit initial, nous avons converti ces numérations par mL en numérations par cm² de surface à l'aide de la formule inspirée de la même réglementation [2] :

$$N' = N \times 4$$

Où :

N' : Nombre d'UFC par cm²,

N : Nombre d'UFC par mL de produit initial.

Mesure de l'ATP résiduelle

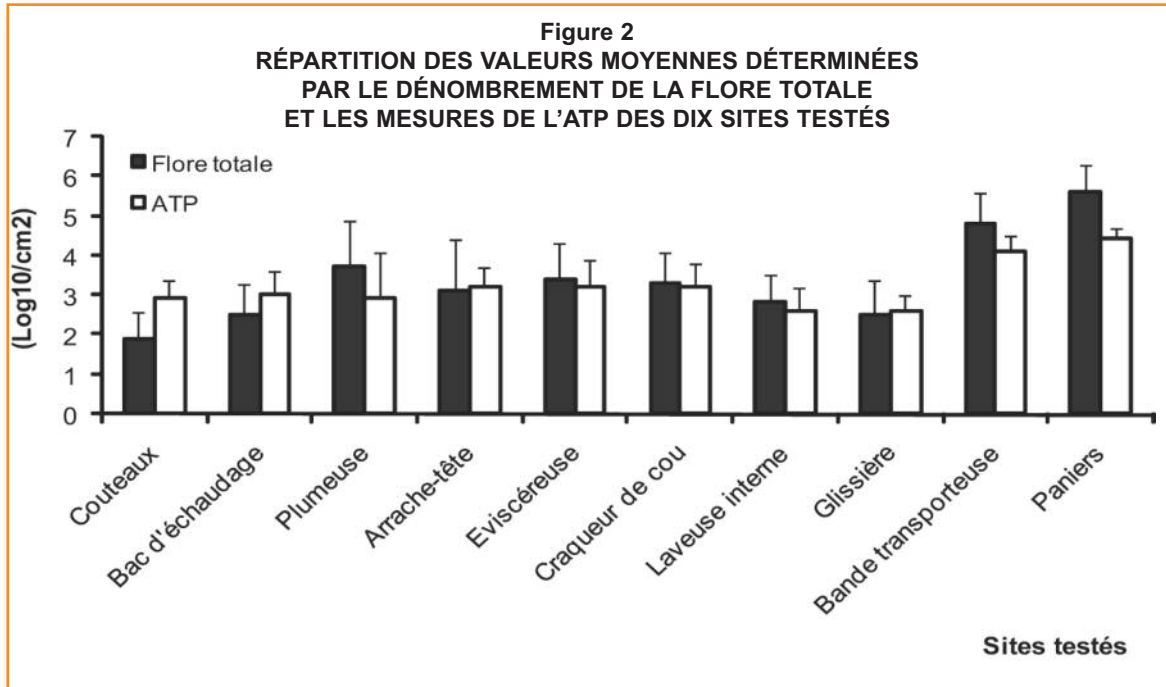
L'ATPmètre ou bioluminomètre portatif « LUMITESTER PD-10 » commercialisé par Kikkoman Corporation- Japon, donne directement une valeur qui correspond à la présence de souillure organique ou d'agents microbiens allant de 0 à 999.999 URL (unités relatives de lumière) avec un niveau de détection de 10⁻¹⁵ moles d'ATP.

La lecture de l'émission lumineuse du test se fait en plaçant le stylo homogénéisé après prélèvement dans l'ATPmètre, permettant l'obtention d'un résultat chiffré du taux de luminescence en dix secondes.

Analyse statistique des données

Les calculs ont été effectués après transformation logarithmique en base 10 des résultats issus de l'analyse microbiologique (UFC/cm²) et d'ATPmétrie (URL/cm²). Cette conversion est destinée à normaliser la distribution [4, 5].

Les traitements statistiques sont, dans un premier temps, appliqués à l'ensemble des prélèvements issus des deux méthodes comparées puis par site de prélèvement pour connaître s'il y a une relation entre ces deux méthodes de contrôle en calculant le coefficient de corrélation et l'équation de la droite de régression. Dans un second temps, les résultats sont analysés par type de surface, et pour chaque surface, nous avons calculé la moyenne arithmétique et l'écart type des log₁₀ UFC/cm² et des log₁₀ URL/cm².



RÉSULTATS

Répartition des UFC et des URL des dix sites testés

Les résultats des mesures d'ATPmétrie et de dénombrement de la flore totale par type de surface obtenus à partir des dix sites testés sont représentés par la figure n° 2.

Les niveaux de contamination et d'encrassement, obtenus par ATPmétrie et par dénombrement de la flore totale, sont significativement supérieurs sur les dix sites choisis par rapport aux seuils d'acceptabilité des deux méthodes. Nous avons observé que la bande transporteuse de carcasses avec $4,8 \pm 0,8 \log_{10}\text{UFC}$ et $4,1 \pm 0,4 \log_{10}\text{URL}$ et les paniers transporteurs de carcasses avec $5,6 \pm 0,7 \log_{10}\text{UFC}$ et $4,4 \pm 0,3 \log_{10}\text{URL}$ sont plus contaminés et encrassés que les autres surfaces testées. Cependant, le niveau de la flore totale des couteaux avec $1,9 \pm 0,7 \log_{10}\text{UFC}$ est le plus bas toujours par rapport aux autres surfaces.

Le niveau le plus élevé de la flore totale et de l'ATP de la bande transporteuse de carcasses peut s'expliquer par le vieillissement accompagné de fissures de celle-ci qui permet l'accrochage des souillures organiques et microbiologiques. Les souillures sèches déposées sur les surfaces des paniers après un refroidissement à $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 12 h dans la chambre froide sont les plus difficiles à éliminer par la mousse du détergent

sans brossage, ce qui explique le niveau élevé en ATP et en flore totale. Nous avons remarqué que le niveau le plus bas en flore totale est observé sur les couteaux qui sont nettoyés régulièrement à l'eau chaude à $82\text{ }^{\circ}\text{C}$, cette pratique a un effet sur la survie des micro-organismes.

Nous avons remarqué une augmentation de la quantité d'ATP quand le nombre d'UFC augmente (figure 2). Par ailleurs, 15,8 % de prélèvements ont donné des résultats à valeurs élevées avec la méthode d'ATPmétrie et des résultats totalement différents avec la méthode de dénombrement de la flore totale (valeurs faibles). Ceci peut s'expliquer par l'efficacité du désinfectant même en présence de matières organiques, c'est-à-dire : un

nettoyage déficient pouvait être compensé partiellement par une bonne désinfection [9].

Corrélation entre l'ATPmétrie et le dénombrement de la flore totale

La relation entre les mesures d'ATPmétrie et le dénombrement de la flore totale sur les dix sites choisis appliquée à la totalité des échantillons est présentée dans la figure 3.

Les résultats suggèrent un lien entre l'ATPmétrie et le dénombrement de la flore totale, le coefficient de corrélation issu de la totalité des échantillons est faible ($R = 0,57$) (figure 3), tandis que ce coefficient calculé par site de prélèvement est trop faible

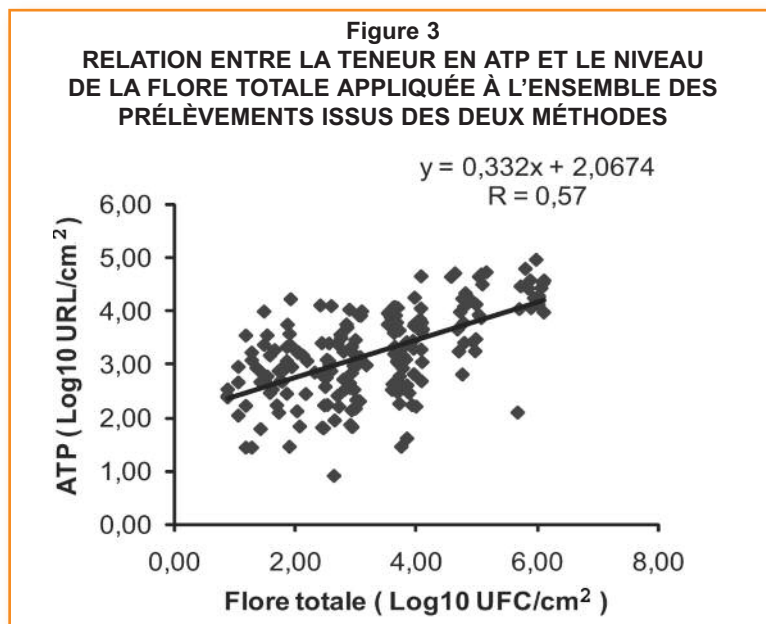


Tableau 1
CRITÈRES D'INTERPRÉTATION MICROBIOLOGIQUE
FIXÉS PAR LA RÉGLEMENTATION FRANÇAISE [2]

Seuil d'acceptabilité de la flore totale à 30 °C pendant 72 h	Satisfaisant		Non satisfaisant	
	UFC/cm ²	Log ₁₀ UFC/cm ²	UFC/cm ²	Log ₁₀ UFC/cm ²
	0 — 10	0 — 1	> 10	> 1

Tableau 2
SEUILS D'ACCEPTABILITÉ DES URL

Seuil d'acceptabilité d'ATPmétrie	Satisfaisant		Non satisfaisant	
	URL/cm ²	Log ₁₀ URL/cm ²	URL/cm ²	Log ₁₀ URL/cm ²
	0 — 250	0 — 2,4	> 250	> 2,4

pour l'éviscéreuse, l'arrache-tête, le craqueur de cou et les paniers avec respectivement : 0,08; 0,19; 0,06 et 0,004, et il est faible pour le bac d'échaudage, la plumeuse, la laveuse interne, la bande transporteuse de carcasses, la glissière et les couteaux avec respectivement : 0,36; 0,52; 0,39; 0,46; 0,51 et 0,3.

Critères d'interprétation des résultats de la flore totale et d'ATPmétrie

1) Dénombrement de la flore totale

La réglementation française fixe un seuil d'acceptabilité des UFC (tableau 1) pour interpréter les résultats issus du dénombrement de la flore totale.

2) Analyses d'ATPmétrie

Aujourd'hui, l'ATPmétrie est une technique récente, pour laquelle, nous disposons que de peu de publications concernant l'interprétation des résultats en abattoir de volailles. En effet, il y a une différence de valeurs d'ATP selon les types d'appareils commercialisés d'où la nécessité d'établir les limites d'acceptabilité en rapport avec les spécifications de notre matériel.

Les résultats d'ATPmétrie sont comparés à ceux de la mesure de la flore totale pour déduire un seuil d'acceptabilité des URL, ce seuil a été inspiré de l'équation de la droite de régression tirée de la corrélation entre les deux méthodes (figure 2).

$$Y = 0.332 * X + 2.0674$$

Après une transformation logarithmique en base 10 de la valeur tirée des critères d'interprétation des résultats selon le niveau des UFC « $\text{Log}_{10} 10\text{UFC} = 1$ », et après un remplacement de X par cette

valeur, nous aurions une estimation du seuil d'acceptabilité des URL : $Y = 2,4 \text{ Log}_{10} \text{URL}$ ($Y = 250\text{URL}$).

Le seuil d'acceptabilité donné pour l'ATP n'est valable qu'avec l'appareil « LUMITESTER PD-10 » parce que les valeurs mesurées varient selon le niveau de détection de chaque type d'appareil.

DISCUSSION

Les résultats de la flore totale et d'ATPmétrie montrent que le niveau de contamination et d'encrassement des surfaces testées est élevé et dépasse le seuil d'acceptabilité pour chaque méthode. Lors d'une étude similaire faite à l'abattoir de volailles de la ville de Batna (Algérie) [1] utilisant le dénombrement de la flore totale et la méthode détectant le taux de protéines microbiennes « KIT PRO 3S » sur les équipements et les surfaces de travail nettoyés et désinfectés quotidiennement par un détergent non ionique et un désinfectant iodé, le niveau hygiénique a été considéré comme acceptable. Cette différence est sans doute due à la présence au niveau de notre site d'étude d'un matériel plus ancien, mal entretenu et à des pratiques de nettoyage-désinfection non quotidiennes. La détergence dynamique par la mousse sans action mécanique n'a pas pu éliminer toute la matière organique et entraîne l'accumulation de débris alimentaires, d'où la nécessité de revoir les procédures de nettoyage et de désinfection en matière de fréquence, choix de produit, concentration, application, protocole de nettoyage – désinfection en phases combinées ou séparées pour préserver la propreté microbiologique des surfaces.

L'ATPmétrie est une méthode rapide

de contrôle de l'efficacité du nettoyage qui est utilisée dans plusieurs secteurs des industries agroalimentaires dont la filière viande et en particulier le secteur « abattage de volailles »; nous ne disposons que de quelques références sur l'utilisation de cette méthode et sa comparaison avec les méthodes microbiologiques.

La faible valeur du coefficient de corrélation ($r = 0.57$), obtenue entre les mesures d'ATP et les résultats du dénombrement de la flore totale et issue de la totalité des prélèvements, montre que cette corrélation est statistiquement significative, mais elle est faible pour que l'ATPmétrie remplace les méthodes microbiologiques de contrôle des surfaces. Les coefficients de corrélation calculés par site de prélèvement sont tous faibles ou trop faibles, nous constatons que les deux méthodes concordent plus pour le bac d'échaudage, la plumeuse, la laveuse interne, la bande transporteuse de carcasses, la glissière et les couteaux que pour l'éviscéreuse, l'arrache-tête, le craqueur de cou et les paniers.

Ces faibles valeurs du coefficient de corrélation trouvées, ainsi que les 15,8 % des prélèvements donnant en même temps des valeurs élevées en ATP et des valeurs basses en flore totale, nous obligent à faire une distinction entre le dénombrement de la flore totale et l'ATPmétrie et de faire ressortir que la méthode de référence basée sur le dénombrement de la flore totale ne peut être considérée comme une méthode fiable pour le contrôle du nettoyage et de la désinfection. Elle renseigne uniquement sur l'efficacité de la désinfection car elle ne permet pas de détecter les problèmes d'encrassement des surfaces.

Selon la littérature, les quantités



d'ATP sont très variables d'un type de cellule à l'autre, il y a 300 000 fois plus d'ATP dans une cellule somatique que dans une bactérie. Il a été démontré que le seuil élevé de détection des micro-organismes (1 000 bactéries/écouvillon ou 10 levures/écouvillon) [6, 7] en utilisant des luminomètres plus récents avec un niveau de détection de 10^{-15} moles d'ATP, et les interactions avec l'ATP libre issu de débris cellulaires de la matière organique rendraient cette méthode difficilement utilisable pour le contrôle de la désinfection, mais elle renseigne d'avantage sur la présence de débris organiques et par conséquent sur la qualité du nettoyage [8].

Les dernières recherches s'orientent vers un développement de l'ATPmétrie en éliminant l'ATP somatique pour mesurer l'ATP microbienne mais il reste toujours le

problème du seuil de détection élevé. Une bactérie typique émet 10^{-18} molles d'ATP alors que les appareils actuels ont un niveau de détection qui ne dépasse pas 10^{-15} molles d'ATP c'est-à-dire 1 000 bactéries par écouvillon. Une diminution à 10 bactéries par écouvillon du seuil de détection et une augmentation de la sensibilité à 10^{-17} peut résoudre ce problème.

Nous pouvons constater que le contrôle de la flore totale des surfaces exigé par la réglementation doit être complété par un contrôle de propreté des surfaces en utilisant une méthode comme l'ATPmétrie. Nos conclusions, dans l'ensemble, concordent avec celles remarquées dans quelques études comme celle qui compare l'ATPmétrie au contrôle microbiologique des surfaces dans le secteur abattage-découpe de porc [10].

CONCLUSION

L'analyse comparative de l'ATPmétrie au dénombrement de la flore totale, nous a permis de déterminer une certaine complémentarité entre ces deux méthodes. Aujourd'hui dans un abattoir de volailles, l'utilisation des deux méthodes simultanément s'avère la solution la plus judicieuse pour contrôler le nettoyage par ATPmétrie et la désinfection par le dénombrement de la flore totale. Pour des protocoles de nettoyage – désinfection en deux phases distinctes, l'application de l'ATPmétrie pour le contrôle du nettoyage en méthode de routine permet la mise en œuvre d'actions correctives immédiatement et s'avère être un outil de validation des protocoles lors de changement de produit ou de concentration de ce dernier.

B I B L I O G R A P H I E

1. ALLOUI N., AYACHI A., KRIM A., NOUCER F. : Comparison of two control methods of disinfection in a poultry slaughterhouse. *ISAH*. 2005, 2, 56-59.
2. ANONYME : Note de service française DGAL/SDSSA/N2007-8275 du 14 novembre 2007 relative aux critères microbiologiques applicables aux carcasses d'animaux de boucherie et de volailles, et lignes directrices relatives aux contrôles de surface du matériel en abattoir et en atelier de découpe d'animaux de boucherie et de volailles.
3. GUYADER P., AMGAR A., COIGNARD M. : La désinfection : la vérification et la validation de l'efficacité des opérations de désinfection. In : BOURGEOIS C.M., MESCLE J.-F., ZUCCA J. : Microbiologie alimentaire (Tome1). Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1996, 451-455.
4. BORCARD D. (Page consultée le 23 mars 2008). Transformation de données : normalisation, stabilisation des variances, 1998, [en ligne]. Adresse URL : http://www.biol09.biol.umontreal.ca/bio2042/Transf_donn.pdf
5. ROUANET H., LECLERC B. : Le rôle de la distribution normale en statistique. *Mathématique et Sciences humaines*, 1970, 32, 57-74.
6. CHMIELEWSKI R.A.N., FRANK J.F. : Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2003, 2, 22-32.
7. SQUIRRELL D.J., PRICE R.L., MURPHY M.J. : Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence. *Analytica Chimica Acta.*, 2002, 457, 109 – 114.
8. JAY J.M. : Determining Microorganisms and/or Their Products in Foods. In : *Modern Food Microbiology (Sixth Edition)*. Aspen publication, Maryland, 2000, 177-249.
9. CORREGE I., RUGRAFF Y. : Mise au point d'une méthode de contrôle de l'efficacité du nettoyage-désinfection des véhicules de transport des porcs vivants. *Techniporc.*, 1998, 21 (4), 29-33.
10. MINVIELLE B. : Contrôle du nettoyage et de la désinfection : l'ATPmétrie en complément du contrôle microbiologique. *Viandes Prod. Carnés.*, 2000, 21 (1), 11-18.