



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 20 mars 2007

## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un projet de Règlement relatif à la décontamination des carcasses de volailles

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 avril 2006 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) d'une demande d'avis portant sur un projet de Règlement communautaire relatif à la décontamination des carcasses de volailles.

Après consultation du comité d'experts spécialisés (CES) « Microbiologie » réuni les 24 octobre, 28 novembre 2006 et le 11 janvier 2007, et d'un expert en analyse chimique du CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », l'Afssa rend l'avis suivant :

#### Eléments de contexte

La Commission a présenté en groupe de travail les 31 janvier et 6 mars 2006 un projet de Règlement (SANCO/2006/0048 Rev.4) autorisant le recours à quatre substances pour la décontamination des carcasses de volailles (dioxyde de chlore, chlorite de sodium acidifié, phosphate trisodique et peroxyacides). Ce projet s'appuie d'une part sur l'article 3 du point 2 du Règlement CE n° 853/2004 du 29 avril 2004, qui donne la possibilité de recourir à d'autres substances que l'eau propre ou l'eau potable pour éliminer la contamination de la surface des produits d'origine animale, et d'autre part sur deux avis de l'Agence européenne de sécurité alimentaire (AESA) publiés le 16 janvier 2006<sup>1</sup>.

Le projet de Règlement pose un certain nombre de questions en matière de sécurité sanitaire que la DGAI a considérées comme devant faire l'objet d'une expertise spécifique. Ces questions sont les suivantes :

1. Principe du recours au traitement antimicrobien des carcasses de volailles et du risque d'une moindre vigilance dans les règles d'hygiène en amont de la chaîne ;
2. Action des substances antimicrobiennes (critères d'efficacité, effets secondaires connus, conséquences en termes de résistance, recontamination...);
3. Efficacité et innocuité des quatre substances antimicrobiennes citées en annexe du projet de Règlement.

En complément de la saisine, il est demandé à l'Afssa par courrier de la DGAI reçu le 6 juin 2006, de lister les principaux inconvénients et avantages en termes de santé publique qui peuvent être reliés à l'emploi des traitements antimicrobiens sur les aliments en général et sur la viande de volaille en particulier.

Une note de l'Afssa concernant le projet de Règlement relatif à la décontamination chimique des carcasses de volailles a été rendue le 4 juillet 2006, dans laquelle l'Agence indiquait qu'elle n'était pas en mesure d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de ces substances en l'absence de dossiers industriels. Le présent avis porte sur les questions scientifiques de la saisine.

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
94701

Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

<sup>1</sup>- Opinion of the Scientific Panel BIOHAZ on "Evaluation of the efficacy of peroxyacids for use as an antimicrobial substance applied on poultry carcasses". Adopted on 14-15 December 2005.

- Opinion of the Scientific Panel on Food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to: Treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. Adopted on 6 December 2005.

### Questions instruites

1. Principe du recours au traitement antimicrobien des carcasses de volailles :
  - Les démarches engagées dans la filière avicole pour la maîtrise des salmonelles, associées aux mesures de maîtrise des dangers tout au long de la chaîne alimentaire par le biais des plans HACCP, permettent-elles de maintenir un niveau élevé de protection des consommateurs, ou devraient-elles être associées au recours à des agents de décontamination des carcasses ?
  - Le recours à de tels agents devrait-il être préconisé de façon systématique ou de manière ciblée ? Dans cette dernière hypothèse, dans quelles circonstances ?
  
2. Concernant les quatre molécules retenues dans le projet de règlement relatif à la décontamination des carcasses de volailles :
  - Le développement d'une plus grande tolérance à ces molécules est-il possible ? Si oui, quelles pourraient en être les conséquences ?
  - Outre les contrôles portant sur les conditions d'utilisation des produits en abattoir, de quels moyens analytiques les services d'inspection pourraient-ils disposer pour s'assurer de la conformité des produits décontaminés et pour distinguer des carcasses décontaminées de celles ne l'ayant pas été ?
  
3. Lister les principaux inconvénients et avantages en terme de santé publique qui peuvent être reliés à l'emploi des traitements antimicrobiens sur les aliments en général et sur la viande de volaille en particulier.

### Expertise

#### Principales définitions

##### **Décontamination:**

Opération ou résultat momentané, permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes présents au moment de l'opération. (définition AFNOR)

Ce terme se distingue de celui de « désinfection » par le fait que pour la décontamination l'inhibition peut être prise en compte.

Le terme « traitement antimicrobien » peut être utilisé comme un synonyme de « décontamination ».

##### **Désinfectant:**

Produit ou procédé utilisé pour la désinfection ou la décontamination dans des conditions définies. (définition AFNOR)

##### **Substances antimicrobiennes**

Ce terme peut être utilisé pour désigner aussi bien des désinfectants que des antibiotiques. Dans cet avis, il s'agit des substances antimicrobiennes non antibiotiques.

##### **Adaptation:**

Phénomènes induits par une modification de l'environnement conduisant les bactéries à supporter, sans dommage significatif et jusqu'à un certain seuil, des concentrations plus élevées de désinfectant.

##### **Résistance / Tolérance**

Dans la grande majorité des cas, une souche est dite résistante à un antimicrobien lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cette souche est significativement supérieure à celle de la majorité des souches de l'espèce considérée. C'est notamment dans ce sens que « résistance » est utilisé dans le terme « antibiorésistance ».

Cependant, en ce qui concerne les antimicrobiens non antibiotiques, le terme « résistance » est utilisé dans la littérature aussi bien pour décrire une CMI élevée, une concentration minimale

bactéricide<sup>2</sup> (CMB) significativement supérieure à celle de la majorité des souches de l'espèce considérée, ou une diminution de sensibilité d'une population adhérente qui ne révèle aucune résistance quand elle est étudiée sous forme d'une suspension.

En l'absence d'une terminologie normalisée, le terme « tolérance » sera utilisé dans la suite de l'avis pour désigner les résistances qui peuvent avoir lieu lorsque des micro-organismes sont soumis à des doses sublétales de substances antimicrobiennes non antibiotiques.

Des extraits du rapport d'expertise du CES « Microbiologie » complètent le présent avis et figurent en annexe.

## I. S'agissant du principe du recours au traitement antimicrobien des carcasses de volailles

Depuis de nombreuses années, des démarches ont été engagées dans les productions primaires avicoles nationales, notamment pour la maîtrise des salmonelles. Ces démarches sont associées à des moyens de maîtrise des dangers tout au long de la chaîne alimentaire.

La question qui se pose est de savoir si l'usage de ces traitements antimicrobiens est susceptible de remettre en cause l'ensemble des mesures réalisées en amont. Cette possibilité d'utiliser certains traitements chimiques de décontamination, a déjà fait l'objet, en Europe, de quelques évaluations scientifiques (CSMVSP, 1998, 2003 ; AESA, 2005, 2006).

Les règlements européens en vigueur (Règlement CE n° 2160/2003) établissent clairement une stratégie d'éradication des salmonelles dans les élevages de l'espèce *Gallus gallus* (poulets de chair, poules pondeuses d'œufs de consommation), et les dindes.

La situation épidémiologique de la filière de production de poulets de chair vient de faire l'objet d'une évaluation par le biais d'une enquête de prévalence<sup>3</sup> qui s'est déroulée d'octobre 2005 à septembre 2006 ; cette enquête a montré que la situation était relativement satisfaisante vis-à-vis de *Salmonella* spp. ; en effet 9% (8,7% +/- 3% ) des troupeaux enquêtés se sont révélés positifs en salmonelles, et, parmi ces troupeaux, un seul était contaminé par *Salmonella* Enteritidis et un seul par *Salmonella* Typhimurium, les deux sérovars les plus fréquemment incriminés lors d'épisodes de toxi-infections alimentaires. De plus, des travaux complémentaires relatifs à la quantification des salmonelles sur les carcasses de volailles, ont permis de démontrer que le niveau de contamination était toujours très faible et que la plupart des dénombrements effectués conduisaient à des résultats inférieurs à 10 salmonelles par gramme de peau.

→ Dans ce contexte, étant données les prévalences actuellement affichées au niveau national, le recours au traitement antimicrobien des carcasses de volailles ne paraît pas justifié au regard du danger *Salmonella* spp, si ce n'est dans le cadre d'une action ponctuelle et ciblée.

Cependant, s'agissant des autres productions avicoles nationales (canards, pintades, etc.), il convient de signaler l'absence de données sur la situation sanitaire vis-à-vis de *Salmonella* spp.

Par ailleurs, l'utilisation de ces substances antimicrobiennes pourrait être envisagée pour réduire la contamination par d'autres microorganismes pathogènes pour l'homme. Ainsi, il est reconnu que *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* dont l'incidence en matière de santé publique est avérée, sont des espèces bactériennes présentes, en quantité parfois importante, sur les carcasses de volailles<sup>4</sup>. Or, à l'heure actuelle, les producteurs de volailles ne disposent que de peu de moyens de maîtrise de ces dangers, d'autant que, contrairement aux salmonelles, ces microorganismes ne présentent pas de voie de transmission verticale. En conséquence, l'éradication de *Campylobacter* sp. dans les troupeaux de volailles reproductrices éventuellement contaminés ne conduira pas, comme pour les salmonelles, à une diminution de la pression d'infection dans les élevages.

<sup>2</sup> Concentration qui permet 5 réductions décimales d'une population microbienne en 5 minute à 20°C, généralement déterminée par des méthodes normalisées.

<sup>3</sup> Enquête épidémiologique sur la contamination des troupeaux de poulets de chair par *Salmonella* spp- Volet français de l'étude communautaire d'estimation de la prévalence de la contamination des troupeaux – second rapport intermédiaire, oct 2006 (S. Le Bouquin, I. Petetin, M. Chemaly, S. Rouxel)

<sup>4</sup> Appréciation des risques alimentaires liés aux campylobacters. Application au couple poulet / *Campylobacter jejuni*. Afssa, 2004.

Ainsi, l'utilisation de ces substances chimiques pourrait être envisagée afin de réduire la charge microbienne des carcasses vis-à-vis de *Campylobacter sp.* Cette stratégie permettrait de garantir aux consommateurs non pas l'absence totale de *Campylobacter sp.* sur les viandes de volailles, mais une réduction suffisante pour limiter les contaminations croisées, notamment lors de la préparation ultérieure des carcasses.

→ Par conséquent, pour les autres espèces avicoles (canards, pintades, etc.) d'une part et pour les microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme pour lesquels aucune mesure spécifique n'est actuellement appliquée en élevage d'autre part, l'utilisation systématique d'un traitement de décontamination peut être un outil dans les options de maîtrise hygiénique.

En conclusion, la mise en place d'un traitement de décontamination doit être considérée comme une aide technologique appliquée dans un processus hygiénique, mais ne peut, en aucune manière, se substituer aux démarches actuelles menées tant au niveau des élevages que des abattoirs.

L'utilisation de ces substances peut avoir une influence sur l'équilibre de l'ensemble de la flore bactérienne, non seulement celle potentiellement pathogène pour l'homme (*Salmonella spp.*, *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli*, etc.), mais également celle responsable de l'altération des denrées, présente à la surface des carcasses. En ce sens, le traitement peut majorer la durée de vie du produit avec un risque de développement des bactéries potentiellement pathogènes non détruites ou moins sensibles au traitement.

→ En conséquence, l'application d'un tel traitement n'est pas un argument suffisant pour justifier un allongement de la durée de vie du produit (date limite de consommation, DLC). En cas de modification de la DLC, des essais appropriés devront tenir compte des déséquilibres de la microflore induits par le traitement.

## II. S'agissant de l'augmentation de la tolérance aux quatre substances antimicrobiennes et des conséquences d'un tel phénomène

### ▪ Analyse de la bibliographie sur la tolérance bactérienne aux 4 substances antimicrobiennes

L'analyse de la bibliographie sur la tolérance bactérienne aux 4 substances antimicrobiennes (Cf. annexe 1) conduit à la conclusion suivante.

Les traitements antimicrobiens des carcasses ne sont que des stress chimiques parmi d'autres, pouvant induire des mécanismes spécifiques ou le plus souvent non spécifiques. De tels traitements peuvent avoir deux conséquences : la mort d'une partie de la population bactérienne et la survie de l'autre. Les bactéries survivantes mettent, a priori toujours, en place des mécanismes d'adaptation qui impliquent, entre autre, la synthèse de protéines de stress. L'augmentation de la tolérance peut avoir d'autres explications en particulier la formation d'agrégats bactériens et l'adhésion des cellules bactériennes à la surface de la peau de l'animal. De fait, après implantation sur une surface, une proportion des cellules résistent à des doses de désinfectants par ailleurs efficaces sur des cellules en suspension. Ce phénomène touche toutes les espèces bactériennes. De même, la forte réactivité de certaines substances antimicrobiennes avec la matrice peut entraîner une diminution des concentrations d'emploi à des concentrations effectives sublétales.

S'agissant des quatre substances concernées par le projet de Règlement et compte tenu des conditions d'application, les mécanismes d'adaptation apparaissent le plus souvent comme des mécanismes généraux communs à d'autres stress (thermique, salinité, etc.). Des mécanismes plus spécifiques semblent être mis en œuvre pour le peroxyde d'hydrogène et les peracides. Ainsi, des moyens de défense ( induction de système multigènes) contre le stress oxydatif lié aux peracides ou au peroxyde d'hydrogène ont pu être identifiés. Le plus souvent, la mise en évidence de ces phénomènes a été faite au laboratoire et plus rarement directement sur les carcasses de volailles.

Il convient en revanche de considérer que l'utilisation de désinfectants permet une survie plus importante de bactéries naturellement résistantes. Compte tenu de l'absence de données, il

apparaît toutefois difficile de conclure sur le risque de survie de bactéries naturellement résistantes suite à l'usage des quatre substances antimicrobiennes.

▪ **Conséquences d'une tolérance augmentée aux quatre substances antimicrobiennes**

Trois conséquences éventuelles à l'augmentation de la tolérance aux substances antimicrobiennes sont à considérer :

- la persistance d'une microflore résidente dans les ateliers agroalimentaires,
- l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques,
- l'acquisition d'une tolérance à l'acidité gastrique.

**1. Une augmentation de tolérance aux quatre substances proposées peut-elle être la cause de la persistance d'une flore microbienne dans les ateliers de l'industrie agroalimentaire ?**

La microflore des surfaces des ateliers agroalimentaires serait susceptible de mieux tolérer la substance antimicrobienne utilisée lors des applications successives, et par conséquent de devenir résidente. La question se pose précisément pour la microflore présente dans et autour de la cuve dans laquelle sont immergées les carcasses ou dans l'environnement proche de la zone où est réalisée l'aspersion des carcasses.

Bien que l'augmentation de la tolérance à un antimicrobien, se traduisant par une CMI plus forte ou par une moindre mortalité, est bien visible dans des expérimentations conduites au laboratoire, le peu d'expérimentations de terrain ne permet pas d'apporter la preuve que ce phénomène soit à l'origine de la persistance de micro-organismes dans les environnements agro-industriels. Il est à noter que les souches de *Listeria monocytogenes* qui persistent dans les ateliers (souches dites résidentes) n'apparaissent pas plus tolérantes aux substances antimicrobiennes que des souches transitoires.

La résidence des bactéries peut en effet avoir d'autres explications en particulier l'adhésion des cellules bactériennes à une surface et la compétition des bactéries pour les nutriments et l'espace.

Il serait judicieux de recommander aux industriels qui pratiqueraient une décontamination des carcasses, de veiller à ce que l'équipement et la zone où cette pratique est mise en oeuvre soient soumis à un nettoyage et à une désinfection aussi poussés que dans le reste de l'atelier (cf. recommandations annexe 1).

**2. Une augmentation de tolérance aux quatre substances peut-elle s'accompagner d'une antibiorésistance ?**

Un large déficit d'études et de données sur ce sujet n'autorise pas à s'engager dans des hypothèses sur la corrélation entre tolérance et antibiorésistance, même si pour d'autres molécules antibactériennes, très différentes dans leur structure chimique, cette résistance croisée est avérée.

Deux mécanismes de résistance communs aux antibiotiques et aux désinfectants sont connus : les pompes à efflux et la diminution de la perméabilité de la membrane externe.

Les pompes à efflux sont surexprimées après contact avec de très nombreux produits. L'application d'un désinfectant pourrait conduire à la sélection de mutants ayant des pompes à efflux exprimées de façon permanente.

Lors d'un point des connaissances réalisé en juillet 2001 à l'occasion de la Conférence « Antibiotic and Biocide Resistance in Bacteria »<sup>5</sup>, les biocides<sup>6</sup> impliqués dans des phénomènes de résistance croisée se limitaient à la liste suivante : ammoniums quaternaires, chlorhexidine, triclosan, huile de pin, acridine, cristal violet, bromure d'éthidium.

<sup>5</sup> Conférence organisée par la « Society for applied microbiology » à Swansea, Grande Bretagne en 2001. Journal of Applied Microbiology 2002 ; Volume 92, Issue s1.

<sup>6</sup> L'usage des quatre substances concernées par le projet de Règlement, qui au sens commun sont des biocides, n'entre pas dans le champ de la directive « biocides » 98/8/CE ; Toutefois les molécules sont incluses la liste des substances actives existantes du règlement 2032/2003 concernant la seconde phase du programme de travail relatif à la directive « biocides ».

Russel (2002) concluait cependant, lors de la conférence de Swansea, qu'il est très peu probable que l'usage de biocides puisse être à l'origine de la sélection de bactéries antibiorésistantes.

→ En conséquence, il est peu probable qu'il puisse y avoir une acquisition de résistance aux antibiotiques suite à l'usage des quatre substances antimicrobiennes citées dans le projet de Règlement.

### 3. Une augmentation de tolérance aux quatre substances proposées peut-elle s'accompagner d'une augmentation de la tolérance bactérienne à l'acidité gastrique?

De nombreux travaux confirment l'augmentation de la tolérance bactérienne à des pH acides de valeur 3,5 après un prétraitement à des pH acides moyens de 5 à 5,5, un pH de 3,5 étant léthal pour les bactéries étudiées. Il est donc légitime de craindre une tolérance à l'acidité gastrique des bactéries soumises à des produits acides tels que le chlorite de sodium acidifié et les peroxyacides. La tolérance aux pH acides a été observée pour *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*.

La tolérance aux pH acides ou aux oxydants est cependant perdue après culture des cellules dans un milieu favorable à la croissance. En d'autres termes, si la croissance microbienne est possible après le traitement des carcasses, la tolérance aux acides et aux oxydants sera perdue. Sachant que la température de conservation des carcasses est telle qu'en conditions normales, la croissance des salmonelles et des campylobacters ne peut avoir lieu, il est possible qu'un traitement par ces substances soit à l'origine d'un risque d'une tolérance accrue aux acides gastriques et une cause du passage de bactéries au travers de la barrière gastrique.

Ce risque est cependant à relativiser au regard du rôle inhibiteur de la croissance bactérienne des acides très largement utilisé en alimentation.

### III. S'agissant des méthodes analytiques permettant de distinguer les carcasses décontaminées de celles n'ayant pas été traitées

Concernant une différence de sensibilité aux substances antimicrobiennes entre les flores bactériennes permettant de distinguer les carcasses traitées des carcasses non traitées, il n'a été trouvé aucune donnée permettant de penser qu'une telle voie est envisageable (efficacités similaires sur flores Gram+ et Gram-, incertitudes de mesure des analyses microbiologiques, etc.).

L'étude a été orientée sur les moyens analytiques permettant de détecter les résidus des produits de traitement sous réserve qu'un produit correctement traité comporte de tels résidus. S'agissant du niveau de résidus et des produits de réaction sur les carcasses traitées, les données sont issues des avis du Comité Scientifique des Mesures Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique (CSMVSP) d'avril 2003 et de l'AESA de décembre 2005.

L'analyse de la littérature scientifique et technique sur les méthodes de détection des résidus de ces 4 substances antimicrobiennes (Cf. annexe 2) conduit à la conclusion suivante.

Hormis pour le HEPD<sup>7</sup>, des méthodes de dosage des différentes molécules envisagées dans le projet de Règlement ont pu être retrouvées dans la littérature scientifique ou technique (cf. Annexe 3). Cependant les matrices dans lesquelles le dosage de ces molécules est décrit sont différentes de la surface d'une carcasse de volaille. Il s'agit en général d'eaux ou de liquides (vins, solutions de désinfection, eaux de procédés). Les peroxydes ainsi que les chlorites et chlorates ont fait l'objet de dosages dans des matrices plus complexes (laits, filets de poisson, etc.). Quelle que soit la molécule considérée, l'application de son dosage à la surface de carcasse de volaille resterait à adapter (le rinçage de la carcasse étant probablement le mode de prélèvement le plus approprié). Les performances des protocoles ainsi obtenus devraient être établies, notamment en ce qui concerne leur seuil de détection, qui doit permettre de détecter les résidus éventuellement présents sur les carcasses.

Cependant, d'après les données recueillies dans l'avis du CSMVSP d'avril 2003, seuls le HEPD et des résidus de traitement par le dioxyde de chlore (chlorite et chlorate) seraient susceptibles d'être

<sup>7</sup> HEPD : Acide 1-hydroxyéthylidène-1, 1-diphosphonique ; agent séquestrant, composant des peroxyacides

déTECTABLES sur les carcasses après traitement. Le niveau de résidus de traitement du phosphate trisodique reste à déterminer. Par ailleurs, selon l'avis de l'AESA de décembre 2005, les éventuels sous produits de réaction (semicarbazides, acides gras oxydés) ne sont pas détectables sur les carcasses de volaille (taux inférieur au seuil de détection). La recherche de ces sous produits ne semble donc pas être une voie pertinente pour l'identification des carcasses traitées.

→ En conséquence et en l'état actuel des données recueillies, la distinction des carcasses traitées par des moyens analytiques paraît être difficile à réaliser. Des études complémentaires spécifiques devraient être entreprises afin de le vérifier. L'étiquetage par l'exploitant semble le seul moyen de distinguer les carcasses décontaminées de celles n'ayant pas été traitées.

#### **IV. Conclusion sur les bénéfices et limites de la décontamination chimique des carcasses de volailles**

##### **Les bénéfices**

La décontamination chimique peut constituer un outil dans les options de maîtrise hygiénique, en particulier pour les espèces avicoles et les microorganismes pathogènes pour lesquels aucune mesure spécifique n'est appliquée en élevage.

Les quatre substances antimicrobiennes citées en annexe du Règlement ont fait l'objet d'une évaluation par l'AESA et le CSMVSP. Trois substances (dioxyde de chlore, chlorite de sodium acidifié, phosphate trisodique) sont jugées efficaces en termes de réduction des flores pathogène et d'altération. Les données concernant les peroxyacides sont jugées insuffisantes.

S'agissant de l'innocuité des quatre substances antimicrobiennes, l'AESA a rendu un avis le 6 décembre 2005 qui concluait à l'innocuité des quatre traitements étudiés (sous l'angle des résidus et des produits de réaction).

##### **Les limites**

L'utilisation systématique des ces antimicrobiens pourrait conduire à une perte de vigilance dans les bonnes pratiques d'hygiène et l'HACCP en amont de la chaîne. Il est donc à souligner que ces traitements ne doivent pas se substituer aux démarches menées dans les élevages (programmes de maîtrise) et en abattoirs (Bonnes pratiques d'hygiène, HACCP) définies dans les règlements européens.

Les traitements antimicrobiens des carcasses de volailles sont des stress chimiques pouvant induire des mécanismes d'adaptation (spécifiques ou non) chez les bactéries leur permettant de rester viables, cultivables ou non cultivables, ou de se multiplier. S'agissant des substances concernées, et compte tenu des conditions d'application, les mécanismes d'adaptation semblent peu spécifiques et communs à d'autres stress chimiques.

Toutefois, il convient de considérer que ces traitements peuvent favoriser la survie de bactéries préalablement résistantes aux substances antimicrobiennes qu'il s'agisse d'une résistance directe ou d'une résistance croisée. Cette opinion n'est cependant pas partagée par trois experts du CES « Microbiologie ».

Trois conséquences éventuelles à l'augmentation de la tolérance aux substances antimicrobiennes sont à considérer :

1. La persistance d'une microflore résidente dans les ateliers agroalimentaires

Il n'existe pas de preuve indiquant une relation entre une tolérance augmentée aux antimicrobiens et la persistance d'une microflore résidente. La résidence des bactéries peut en effet avoir d'autres explications en particulier l'adhésion des cellules bactériennes à une surface et la réactivité des antimicrobiens avec la matrice.

2. L'acquisition d'une résistance aux antibiotiques

L'acquisition d'une résistance croisée ou associée entre désinfectants et antibiotiques a été décrite pour un certain nombre de molécules mais pas pour les quatre substances concernées. En

conséquence, il est peu probable qu'il puisse avoir une acquisition de résistance aux antibiotiques à la suite de l'usage de ces quatre substances antimicrobiennes.

Les conclusions relatives aux deux premières hypothèses ne sont cependant pas partagées par un expert du CES « Microbiologie ». Celui-ci considère que la conséquence éventuelle d'un traitement chimique des carcasses consiste en la persistance dans les ateliers agroalimentaires ou sur les carcasses, d'une microflore tolérante aux substances concernées ou résistante à certaines molécules antibiotiques. Le niveau de risque associé à cette persistance est inconnu.

### 3. L'augmentation de la tolérance à l'acidité gastrique

De nombreux travaux confirment une augmentation de tolérance suite à un choc acide. Cette augmentation de tolérance est perdue après croissance en absence d'acidité. On ne peut exclure le risque qu'un traitement par les substances acides (le chlorite de sodium acidifié et les peroxyacides en particulier) induise une tolérance accrue aux acides gastriques et soit la cause du passage de cellules microbiennes à travers la barrière gastrique. Ce risque est cependant à relativiser au regard du rôle inhibiteur de la croissance bactérienne des acides très largement utilisé en alimentation.

→ En conclusion, compte tenu de ces avantages et inconvénients, le recours à la décontamination chimique des carcasses de volailles pourrait être envisagé parmi les mesures de maîtrise des agents pathogènes à l'abattoir, sous réserve :

- de la validation de l'innocuité des substances antimicrobiennes et de leur efficacité sur les principaux microorganismes pathogènes,
- et de la prise en compte, lors de la détermination de la durée de vie du produit, des déséquilibres de la microflore induits par le traitement.

## Conclusions générales de l'Afssa

Tels sont les éléments de réponse que l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments est en mesure d'apporter sur les questions soulevées par le projet de Règlement communautaire relatif à la décontamination des carcasses de volailles.

Par ailleurs, l'Afssa souligne la nécessité d'une évaluation scientifique des substances antimicrobiennes destinées à la décontamination de surface des aliments d'origine animale. Des références scientifiques et techniques devront démontrer notamment l'efficacité des molécules (dans des conditions industrielles) sur les principaux microorganismes pathogènes rencontrés dans les filières de productions animales. En ce sens, il paraît important de suivre les recommandations édictées par l'AESA sur l'innocuité et l'efficacité des substances utilisées pour décontaminer les surfaces des aliments d'origine animale<sup>8</sup>.

**Mots clés** : décontamination ; carcasses ; volailles ; paquet hygiène ; *Salmonella* ; *Campylobacter*

La Directrice générale de l'Agence française  
de sécurité sanitaire des aliments

**Pascale BRIAND**

<sup>8</sup> Joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and the efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin. ( EFSA-Q-2006-008)



**Annexe 1**

Extrait du rapport du CES « Microbiologie » validé le 11 janvier 2007

**Augmentation de la tolérance aux quatre substances antimicrobiennes****I. Généralités concernant les réponses aux stress de cellules bactériennes**

En l'absence d'une terminologie normalisée, le terme « tolérance » sera utilisé pour désigner les résistances de faible niveau qui peuvent avoir lieu lorsque des micro-organismes sont soumis à des doses sublétales de substances antimicrobiennes non antibiotiques.

La littérature sur les tolérances augmentées porte sur celles qui se développent après un seul traitement sublétal et sur celles qui s'amplifient après des repiquages successifs dans un milieu de culture contenant des doses croissantes d'un antimicrobien. Dans ce dernier cas, les études portent essentiellement sur des ammoniums quaternaires, famille de désinfectants très utilisés dans l'industrie agroalimentaire et l'augmentation de tolérance se mesure généralement par une augmentation de la concentration minimale inhibitrice de la croissance (CMI) et rarement de la concentration minimale bactéricide (CMB<sup>9</sup>) alors que ces molécules sont utilisées pour leur pouvoir bactéricide. Dans les rares études où CMI et CMB sont déterminées sur les mêmes souches, on constate qu'une forte CMI ne se traduit pas par une forte CMB (Langsrud *et al.* 2003a). Il faut noter qu'aucune des molécules proposées pour la décontamination des carcasses n'appartient à la famille des ammoniums quaternaires.

Lorsqu'un traitement sublétal est appliqué, les bactéries survivantes mettent, a priori toujours, en place des mécanismes d'adaptation qui impliquent, entre autre, la synthèse de protéines de stress. On peut alors observer :

- une activité catabolique orientée vers la respiration terminale et l'exclusion de protons pour le maintien de l'homéostasie cellulaire au dépend des biosynthèses, d'où une croissance ralentie,
- des phénomènes de réparation ou destruction des protéines dénaturées,
- après un traitement au chlore à faible concentration : une augmentation de la synthèse de glutathion intracellulaire,
- après des repiquages successifs dans un milieu de culture contenant des doses croissantes d'un ammonium quaternaire : une modification de la composition des acides gras membranaires, etc.

Il est bien connu qu'une tolérance augmentée à une agression peut entraîner une tolérance augmentée à une autre agression (tolérance augmentée croisée). Par exemple, une CMI augmentée à un ammonium quaternaire peut entraîner une CMI augmentée à un autre ammonium quaternaire, à la chlorhexidine (un antiseptique) ou à des produits amphotères (Jones *et al.* 1989 ; Langsrud et Sundheim, 1997 ; Méchin *et al.* 1999 ; Langsrud *et al.* 2003a). Une agression peut aussi s'accompagner d'une sensibilité augmentée à d'autres agressions, phénomène exploité dans le concept des barrières (« hurdle concept »).

**II. Cas des quatre molécules proposées**

Les traitements antimicrobiens des carcasses ne sont que des stress chimiques parmi d'autres, pouvant induire des mécanismes spécifiques ou le plus souvent non spécifiques. De tels traitements peuvent avoir deux conséquences : la mort d'une partie de la population et la survie de l'autre. Cette survie ou persistance peut avoir d'autres explications. La formation d'agrégats bactériens et l'inclusion de ces cellules bactériennes au sein de biofilms sur la peau de l'animal conduisent à empêcher la diffusion des produits, au cœur des bactéries, en concentration suffisante. De même, la forte réactivité de certains antimicrobiens avec la matrice peut réduire les concentrations d'emploi à des concentrations effectives sublétales.

<sup>9</sup> Concentration qui permet 5 réductions décimales d'une population microbienne en 5 minute à 20°C, généralement déterminée par des méthodes normalisées.

### 1. Phosphate trisodique (PTS)

L'application d'une solution à 10 % (pH=12,7) produit un pH résiduel sur la peau de poulet de 8 à 9 (Capita, 2002). L'utilisation d'une concentration sublétale (1,5 % ou pH= 10) induit sur *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, d'une part une augmentation de la tolérance à la fois à une dose de 2,5 % de PTS et à un pH plus élevé et d'autre part un accroissement de la thermotolérance (Sampathkumar, 2004). Dans le domaine des plantes et vis à vis de *Salmonella* Chester des traitements de 3 à 12 % de PTS (pH=12,3, 5 min) diminuent la population bactérienne de 10 à 100 fois, en mettant en évidence une population résistante en proportion de 0,7 à 7,1 % (Liao, 2001). Ces phénomènes d'adaptation liés aux stress apparaissent comme des mécanismes généraux. Yuk (2006) le démontre en exposant *Escherichia coli* 0157:H7 à de faibles concentrations de PTS (jusqu'à 0,6 %) puis en constatant une augmentation du temps de survie à pH=1,5 (valeur de D de 58 min) associé à une augmentation de la concentration extracellulaire en vérotoxine.

Dans le même temps un bénéfice peut être tiré d'une exposition en concentration sublétale de PTS (0,5 à 5 mmol/L- 10 min) sur *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis par l'augmentation de leur sensibilité au lysozyme et à la nisine (Carneiro de Melo, 1998).

En complément de cette analyse sur le PTS, l'effet du pH alcalin dans une gamme de 7,1 à 12,5, par l'emploi d'un produit de nettoyage appliqué sur 5 souches de *Listeria monocytogenes*, produit une augmentation de la tolérance à pH= 10,4, mais dans le même temps accentue leur sensibilité à d'autres antimicrobiens que sont les ammoniums quaternaires (Taormina, 2002).

Enfin, en associant au PTS l'effet de la température, il est constaté une durée de survie de *Listeria monocytogenes* sur la volaille passant de 10 min à 20 min, respectivement à la température ordinaire et à 10°C, lors d'un traitement au PTS (8 %). Cette espèce s'avère un peu plus tolérante que *Campylobacter jejuni* et beaucoup plus que *Escherichia coli* 0157:H7 (Somers, 1994).

### 2. Chlorite de sodium acidifié

Employé sur des carcasses de poulets à la concentration d'emploi de 0,1 % (pH= 2,3 à 3,2) cet antimicrobien produit une réduction de 1,5 à 1,6 logarithme décimal des populations de *Campylobacter spp* et *Escherichia coli* (Oyarzabal, 2004). Le plus couramment l'acide citrique est utilisé comme acidifiant.

Chatarapanont (2004) observe, à partir de *Campylobacter jejuni* inoculé sur peau de poulet, une diminution d'un log10 à la concentration de 100 ppm en 5 min et note que l'efficacité n'est pas dépendante de la localisation des cellules bactériennes en profondeur entre 0 et 30 µm. L'incapacité du produit à éliminer *Campylobacter jejuni* n'apparaît pas un résultat de la protection liée à la localisation.

Dans une étude sur le traitement de carcasses de bovin contaminées par *Escherichia coli* 0157:H7, préalablement adapté à 0,2 % d'acide lactique, il se produit une augmentation de la tolérance au chlorite de sodium acidifié (0,12 %) (Stopforth, 2004).

### 3. Dioxyde de chlore

La bibliographie est apparemment très réduite et nous n'avons retenu qu'une étude sur levure démontrant l'augmentation de tolérance au dioxyde de chlore, à la concentration de 0,3 mg/l (Ramirez-Orozco, 2001).

### 4. Peroxyacides

Ces produits sont des associations, en équilibre, faisant intervenir un mélange de peroxyde d'hydrogène, de peracides et d'acides organiques (acide acétique, acide octanoïque). Stopforth (2002) n'observe pas d'augmentation de résistance de *Listeria monocytogenes*, adapté ou non à l'acidité, après application d'acide peracétique. Ceci est en apparente contradiction avec l'étude de Chantarapanont (2004) concluant, sur *Campylobacter jejuni*, à des difficultés d'élimination de ces cellules bactériennes sur la peau de poulet. Zook (2001) établit une relation entre la tolérance au peroxyde d'hydrogène à 80mmol/L et l'exposition à l'acide peracétique à une concentration

sublétale (0,1 %). La valeur de D est supérieure à 2 h pour *Escherichia coli* 0157:H7 comparativement au 0,19 h pour cette même souche non pré-traitée.

En réponse au stress oxydatif (peroxyde d'hydrogène) des phénomènes d'adaptation sont observés. Ainsi Chapman (2003) démontre l'effet inducteur de peroxydes protégeant *Escherichia coli* ; un système multigènes s'exprime en produisant des protéines (catalase, superoxyde dismutase...). Cette induction le protège également vis à vis de l'acide hypochloreux. Une telle tolérance est aussi notée en constatant la diminution de la quantité de cellules détruites après application de concentrations en peroxyde d'hydrogène variant de 300 à 700 mg/l. Ainsi, à partir de 19 souches de *Listeria monocytogenes* prélevées dans l'industrie de la viande, une réponse adaptative est observée en constatant des écarts de CMI de 1 à 8 (Romanova, 2002). Dans une autre espèce, *Acinetobacter calcoaceticus*, le moyen de défense contre le stress oxydatif lié aux peracides a pu être identifié (Honda, 2003).

### III. Conclusion

En réponse aux agressions de bactéries potentiellement pathogènes par les produits chimiques que sont les antimicrobiens utilisés dans le traitement des carcasses de volailles, des mécanismes de défense, d'adaptation sont mis en place permettant aux bactéries de survivre dans un état viable cultivable ou non cultivable, ou/et de se multiplier. Ces mécanismes apparaissent le plus souvent comme des mécanismes généraux communs à d'autres stress (thermique, salinité, etc.). Des mécanismes plus spécifiques semblent être mis en œuvre pour le peroxyde d'hydrogène et les peracides. Nous n'avons pas identifié de travaux sur le dioxyde de chlore. Le plus souvent, la mise en évidence de ces phénomènes a été faite au niveau du laboratoire et peu, directement sur les carcasses de volailles.

Il convient en revanche de considérer que l'utilisation d'antibiotiques ou de désinfectants, la plupart du temps, peut favoriser la survie de bactéries naturellement résistantes ou s'adaptant aux contacts réitérés de substances actives. S'agissant des quatre substances concernées, les études et données sont manquantes, et ne permettent pas de cerner les mécanismes de résistance qui seraient mis en place.

### Conséquences d'une augmentation de la tolérance aux 4 substances antimicrobiennes

#### I. Une augmentation de tolérance aux 4 molécules proposées peut-elle être la cause de la persistance d'une flore microbienne dans les ateliers IAA ?

La microflore adhérant à la carcasse et qui a résisté au traitement antimicrobien quitte l'atelier après ce traitement. En revanche, la microflore des surfaces de l'atelier soumise à ce même traitement est celle qui est susceptible de mieux tolérer l'antimicrobien lors des applications qui suivront la première. Plus précisément, c'est à propos de la microflore qui est présente dans et autour de la cuve dans laquelle sont immergées les carcasses ou dans l'environnement proche de la zone où est réalisée l'aspersion des carcasses, que se pose la question de la possibilité d'une tolérance augmentée.

Deux possibilités se présentent, la plus vraisemblable est que ces zones soient soumises aux opérations d'hygiène pratiquées dans l'atelier, les produits d'hygiène y sont appliqués à des doses vraisemblablement plus agressives que celles qui sont utilisées sur les carcasses. Le problème d'une augmentation de tolérance est donc celui qui concerne l'ensemble de l'atelier, pas celui qui concerne la décontamination des carcasses.

L'autre possibilité, moins probable et non recommandée, serait que ces zones ne soient pas soumises aux produits d'hygiène utilisés dans l'atelier. On peut, en effet, imaginer que puisque l'équipement est en contact avec l'antimicrobien utilisé pour traiter les carcasses, les opérateurs estiment que la zone n'a pas à être nettoyée et désinfectée de façon aussi poussée que le reste de l'atelier. Dans ce cas on peut comprendre la crainte d'une augmentation de tolérance à la substance de traitement des carcasses due à son usage répété. Ce type de crainte est à l'origine de la pratique, largement répandue autant dans le domaine agro-alimentaire que dans le milieu

hospitalier, de l'alternance des molécules désinfectantes. Il n'existe cependant pas de consensus dans la communauté scientifique sur le bien fondé de cette pratique.

Certains auteurs annoncent que les augmentations de CMI aux ammoniums quaternaires, en particulier, qui peuvent être stables, justifient la nécessité de changer périodiquement de molécules (Langsrud *et al.* 2003a ; Lunden *et al.* 2003). Bien que les auteurs ne cherchent pas toujours à savoir si la tolérance augmentée est réversible, dans certaines études on constate une stabilité de l'augmentation de tolérance (Langsrud *et al.*, 2003a). D'après Bloomfield (2002) ce n'est pas fréquemment le cas, la tolérance augmentée serait, dans la majorité des cas, une adaptation phénotypique. Dans les cas où la réversibilité n'a pas été observée, Bloomfield (2002) suppose que l'expérimentation a conduit à la sélection d'un mutant plus tolérant. Force est de constater que les micro-organismes isolés dans les ateliers IAA sont souvent plus résistants aux doses bactéricides que des souches de collection (Langsrud *et al.* 2003b).

Murtough *et al.* (2001), Gilbert *et al.* (2002), Bloomsfield (2002) et Holah *et al.* (2002) estiment qu'il n'existe pas de preuves scientifiques que les phénomènes de persistance de certains micro-organismes dans les ateliers puissent s'expliquer par des CMI augmentées. Les arguments de Holah *et al.* (2002) sont les suivants : une tolérance augmentée se traduit par une faible augmentation de la concentration minimale inhibitrice (de 3 à 13 mg/l pour *Listeria monocytogenes* selon Mereghetti *et al.* 2000 ; elle peut être multipliée par 15 dans d'autres études) alors que les doses d'utilisation d'ammonium quaternaires sont de l'ordre de 1000 mg/l. Bloomfield (2002) explique de même qu'une augmentation de CMI témoigne de la modification d'une ou deux cibles mais aux doses bactéricides utilisées, la molécule agit sur de multiples cibles. Les désinfectants oxydants par exemple, comme l'acide peracétique qu'il est prévu d'utiliser sur les carcasses, aux doses bactéricides, oxydent toutes les protéines cellulaires. Bloomfield (2002) en conclut que les phénomènes observés au laboratoire n'ont pas de conséquence sur le terrain où les molécules sont utilisées à forte concentration. C'est le cas ici puisque le traitement des carcasses de volaille doit être bactéricide (et non bactériostatique) pour être considéré acceptable.

Enfin, Gilbert *et al.* (2002) considèrent que la compétition pour les nutriments et l'espace, entre les membres d'une communauté microbienne de diverses sensibilités donne un avantage à certains micro-organisme, lequel avantage dépasse largement celui que pourraient avoir des souches qui auraient une tolérance augmentée à un antimicrobien.

Une étude sur l'acquisition d'une CMI augmentée par *Listeria monocytogenes*, bactérie pathogène bien connue pour pouvoir persister dans les environnements industriels, a été conduite par Lundén *et al.* (2003). Ces auteurs montrent que 2 souches résidentes et 2 souches non-résidentes, progressivement soumises à des doses croissantes de désinfectant (ammoniums quaternaires) atteignent toutes des CMI similaires.

Une autre étude (Earnshaw et Lawrence, 1998) compare sur des suspensions bactériennes l'efficacité de 3 désinfectants utilisés dans une usine ou des souches de *Listeria monocytogenes* résidentes et transitoires ont été isolées. Aucune différence significative de sensibilité à des doses bactéricides entre les génotypes résidents et les génotypes transitoires de cette usine n'a pu être mise en évidence.

Enfin et surtout, le simple fait que des bactéries soient adhérentes peut être responsable de la survie d'une partie de la population après application d'une dose de désinfectant considérée efficace sur des cellules en suspension. La proportion de cellules qui survivent à une désinfection augmente avec l'âge de la communauté microbienne adhérente (Frank et Koffi, 1992 ; Leriche *et al.*, 2003 ; Pan *et al.*, 2006). Il est à noter que des cellules détachées de biofilms âgés de plusieurs jours (soumis ou non quotidiennement à un désinfectant), et donc très peu sensibles à un désinfectant, retrouvent après une première culture en suspension leur sensibilité initiale à ce désinfectant (Pan *et al.*, 2006 ; résultats non publiés). Des souches bactériennes isolées dans des pédiluves contenant une solution chlorée renouvelée quotidiennement se révèlent avoir une sensibilité normale au chlore lorsqu'elles sont testées en laboratoire (Langsrud *et al.* 2006). Les courbes de survie de bactéries adhérentes soumises à un désinfectant se terminent par une traînée, qui montre l'effet très limité, voire nul, d'une augmentation des durées de contact sur l'efficacité du désinfectant. Si la charge microbienne qui se dépose sur une surface est forte ou si le désinfectant est mal dosé, il est possible que les premières opérations d'hygiène n'éliminent pas le micro-organisme considéré qui peut alors devenir résident dans l'atelier. Bien que les mécanismes conduisant à cette résidence ne soient pas encore compris, le phénomène est bien connu. Mettler et Carpentier (1998) ont montré que l'implantation, sur le terrain, d'une flore résidente, dominée par

des micro-organismes non pathogènes par voie alimentaire, se fait en l'espace de quelques semaines. Ceci a lieu dans des ateliers où l'on pratique un nettoyage puis une désinfection par une formulation homologuée à une dose préconisée par le fournisseur qui est au moins égale à une CMB. Lorsque des micro-organismes indésirables deviennent résidents, ce qui a souvent été observé pour *Listeria monocytogenes*, il convient d'appliquer, de manière exceptionnelle, une procédure d'hygiène extrêmement poussée dans l'ensemble de l'atelier avec démontage des équipements qui peuvent l'être et remplacement des matériaux trop usés.

### Conclusion

La microflore de la carcasse quittant l'atelier après traitement, la microflore de l'atelier est celle qui est susceptible de mieux tolérer l'antimicrobien lors des applications suivantes.

Bien que l'acquisition d'une tolérance augmentée à un antimicrobien, qui se traduit par une concentration minimale inhibitrice plus forte ou par une moindre mortalité, est bien visible dans des expérimentations conduites au laboratoire, le peu d'expérimentations à ce jour sur le terrain ne permet pas d'apporter la preuve que ce phénomène soit à l'origine de la persistance de micro-organismes dans les environnements agro-industriels. Le simple fait que des micro-organismes soient adhérents est responsable d'une survie importante des bactéries aux traitements antimicrobiens.

### Recommandations

Il serait judicieux de recommander aux industriels qui pratiqueraient une décontamination des carcasses, de bien veiller à ce que l'équipement et la zone où ce traitement est utilisé soient soumis à un nettoyage et à une désinfection aussi poussés que dans le reste de l'atelier.

Si la désinfection est réalisée par un désinfectant à faible spectre c'est à dire efficace sur des cellules bactériennes sous forme végétative mais peu efficace sur des spores ou sur d'autres types de micro-organismes qui pourraient être considérés comme des dangers dans la filière considérée, il est recommandé d'appliquer périodiquement un désinfectant à large spectre.

Lorsque des micro-organismes indésirables deviennent résidents, ce qui a souvent été observé pour *Listeria monocytogenes*, il convient alors d'appliquer une procédure d'hygiène extrêmement poussée dans l'ensemble de l'atelier avec démontage des équipements qui peuvent l'être et remplacement des matériaux trop usés.

## II. Une augmentation de tolérance aux 4 molécules proposées peut-elle s'accompagner d'une antibiorésistance ?

Un large déficit d'études et de données sur ce sujet ne nous autorisent pas à nous engager dans des hypothèses sur la corrélation entre tolérance et antibiorésistance, même si pour d'autres molécules antibactériennes, très différentes dans leur structure chimique, cette résistance croisée est avérée.

Lors d'un point des connaissances réalisé en juillet 2001 à l'occasion de la Conférence « Antibiotic and Biocide Resistance in Bacteria »<sup>10</sup>, les biocides impliqués dans des phénomènes de résistance croisée se limitaient à la liste suivante :

- ammonium quaternaires (molécules utilisées comme désinfectants en milieu hospitalier et en IAA, seules ou en associations) : chlorure de benzalkonium (la molécule la plus étudiée), bromure de dodécyl-triméthylammonium, chlorure de cétylpyrimidium et le chlorure de didécyl-diméthylammonium ( produit utilisé en industrie laitière)
- chlorhexidine
- triclosan (incorporé dans des bandes de tapis convoyeurs pour les IAA, commercialisées en France)
- huile de pin
- acridine\*

<sup>10</sup> Conférence organisée par la « Society for applied microbiology » à Swansea, Grande Bretagne en 2001. Journal of Applied Microbiology 2002 ; Volume 92, Issue s1.

- cristal violet
- bromure d'éthidium\*

Deux mécanismes de résistance communs aux antibiotiques et aux biocides sont connus : les pompes d'efflux et la diminution de la perméabilité de la membrane externe.

Les pompes d'efflux sont surexprimées après contact avec de très nombreux produits : produits d'hygiène ménagers, moutarde, acide salicylique, ammoniums quaternaires, huile de pin, tétracycline. L'application de biocide pourrait conduire à la sélection de mutants ayant des pompes d'efflux exprimées de façon permanente.

Russel (2002) concluait cependant, lors de la conférence de Swansea, qu'il est très peu probable que l'usage de biocides puisse être à l'origine de la sélection de bactéries antibiorésistantes.

En conséquence il est peu probable qu'il puisse avoir une acquisition de résistance aux antibiotiques suite à l'usage des quatre substances antimicrobiennes.

### **III. Une augmentation de tolérance aux quatre substances proposées peut-elle s'accompagner d'une augmentation de la tolérance bactérienne à l'acidité gastrique?**

De nombreux travaux confirment l'augmentation de la tolérance à des pH acides de valeur 3,5 après un prétraitement à des pH acides moyen de 5 à 5,5, ce pH 3,5 étant létal pour les bactéries retenues. Il est donc légitime de craindre une tolérance aux acides gastriques des bactéries ayant été soumises à des produits acides tels que le chlorite de sodium acidifié et les peroxyacides.

La tolérance aux pH acides a été observée pour *Listeria monocytogenes* (O'Driscoll, 1996 ; Bolton, 1999 ; Davis, 1996), pour *Escherichia coli* 0157:H7 (Stopforth, 2004 ; Samelis, 2005), pour *Salmonella* Typhimurium (Park, 1996) et pour *Campylobacter jejuni* et *coli* (Chaveerach, 2003). Dans cette dernière étude, le traitement à l'acide formique (pH= 4) transforme les souches en viables non cultivables qui ont pu être revivifiées par passage sur œuf. De son côté Leyer (1993) conclut, après exposition de *Salmonella* Typhimurium à un pH acide moyen (pH= 5), à une augmentation de la tolérance à d'autres stress (chaleur, sel, agent de surface) mise en relation avec l'induction de gènes produisant des protéines membranaires (membrane externe) sans altération du lipopolysaccharide.

Ces substances sont aussi des oxydants forts et il existe aussi des mécanismes d'adaptation aux oxydants quand ils sont appliqués à des faibles doses. En outre, des mécanismes conduisant à une tolérance aux pH acides se sont révélés être impliqués dans la protection des cellules vis à vis de chocs oxydants chez *E. coli* (Ho Choi *et al.* 2000).

La tolérance aux pH acides ou aux oxydants est cependant perdue après culture des cellules dans un milieu favorable à la croissance. Si un rinçage des carcasses permet le retour au pH initial de la carcasse et que la croissance microbienne est possible, la tolérance aux acides et aux oxydants sera perdue.

Sachant que la température de conservation des carcasses est telle (sauf accident) que la croissance des salmonelles et des campylobacters ne peut avoir lieu, il est possible qu'un traitement par ces substances soit un risque de tolérance accrue aux acides gastriques et une cause du passage de cellules microbiennes au travers de la barrière gastrique. Ce risque est cependant le même que celui qui existe lorsque l'on ajoute du vinaigre à un aliment qui contient des pathogènes par exemple une mayonnaise qui contient des salmonelles.

---

\* non utilisés comme désinfectants car toxiques ( cancérigènes pour l'homme)  
[www.sfhf.net/telechargement/recommandations\\_LPD2005.pdf](http://www.sfhf.net/telechargement/recommandations_LPD2005.pdf)

**Annexe 2***Extrait du rapport du CES « Microbiologie » validé le 11 janvier 2007***Méthodes analytiques de détection des résidus et des produits de réactions**

Concernant une différence de sensibilité entre flores bactériennes permettant de distinguer les carcasses traitées des carcasses non traitées, il n'a été trouvé aucune donnée permettant de penser qu'une telle voie est envisageable (efficacités similaires sur flores Gram+ et Gram-, incertitudes de mesure des méthodes microbiologiques, etc.).

L'étude a été orientée sur les moyens analytiques permettant de détecter les résidus des produits de traitement, ceux-ci étant théoriquement absents d'un produit non traité, et sous réserve qu'un produit correctement traité comporte des résidus du traitement.

Concernant la recherche des produits de réaction sur les carcasses traitées, les données sont issues de l'avis de l'AESA (Question 2005-002) : Traitement des carcasses de volailles avec le dioxyde de chlore, le chlorite de sodium acidifié, le phosphate trisodique et les peroxyacides.

**I. Détection des résidus de traitement****1. Peroxyacides**

Sous cette dénomination sont regroupés, le peroxyde d'hydrogène, les acides acétique et octanoïque et leur produit d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène que sont l'acide peracétique et l'acide peroxy-octanoïque. S'y ajoute l'acide 1-hydroxyéthylidène-1, 1-diphosphonique (HEPD) également appelé acide éditronique, qui est un agent séquestrant, déjà utilisé dans les pâtes dentifrices et comme détergent de surfaces en agro-alimentaire.

Si l'acide acétique et l'acide octanoïque agissent, respectivement, le premier par son pouvoir acidifiant, le second comme surfactant, leur vocation essentielle est d'être les précurseurs de leurs formes peroxydées.

**- Le peroxyde d'hydrogène**

Une méthode de référence AOAC pour le dosage dans les aliments existe (Miyamoto et al. 1997), basée sur une mesure par électrode à oxygène dérivée de Toyoda et al. (1982) : homogénéisation et extraction par tampon phosphate pH= 7,0 + KBrO<sub>3</sub> et élimination par l'azote de l'oxygène dissout, avant mesure de l'oxygène dégagé par action de la catalase. Les taux de récupération varient en fonction des aliments de 77,8 % à 107,1 % pour des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1 à 10 µg/g (1 à 10 ppm) et des seuils de détection allant de 0,1 µg/g à 0,4 µg/g.

D'autres méthodes existent pour la détermination du peroxyde d'hydrogène dans les aliments : titrimétrique, spectrophotométrique (formation d'un complexe coloré absorbant à 415 nm en présence de tétrachlorure de titane, après précipitation des protéines du lait par l'acide trichloroacétique). Ces méthodes sont citées dans les articles de Juven et Pierson (1996) et Miyamoto et al. (1997).

On peut également noter l'existence de méthodes, plus lourdes mais plus spécifiques, faisant appel à la chromatographie en phase gazeuse (Tanaka et al., 1990).

Des systèmes commerciaux existent: électrodes (eaux potables, boissons, eaux industries agro-alimentaires, etc., avec des plages de mesure allant de l'ordre de 1 à 50 ppm), bandelettes (pour échantillons liquides tels que lait UHT, solutions désinfectantes et de rinçage en agro-alimentaire, eaux, etc.). Ces bandelettes contiennent une peroxydase qui transfère l'oxygène des peroxydes à un indicateur redox organique et permettent seulement une semi-quantification avec des seuils de détection annoncés, par exemple, de 0,5 à 1 mg/l. Les bandelettes commercialisées ne sont pas spécifiques du peroxyde d'hydrogène et mettent en évidence aussi bien les peroxydes organiques qu'inorganiques (fonctions O<sub>2</sub><sup>2-</sup>).

**- L'acide peracétique et l'acide peroxyoctanoïque**

La détermination spécifique de ces 2 molécules, qui sont des peroxydes organiques, est plus délicate, si tant est qu'elle présente un intérêt, dans la mesure ou certaines des méthodes citées pour le peroxyde d'hydrogène détectent vraisemblablement aussi ces peroxydes. Néanmoins on

peut citer un article décrivant une méthode HPLC avec détection par fluorescence après dérivation post-colonne (oxydation des peroxydes en un dimère fluorescent sous l'action de l'acide p-hydroxyphenyl-acétique catalysée par une hémimine). Cette méthode a été appliquée à l'eau de pluie et à l'air.

- L'acide acétique et l'acide octanoïque

L'acide octanoïque peut être dosé par chromatographie en phase gazeuse, avec détection par ionisation de flamme. Ce type de dosage est courant dans les vins après extraction à l'éther-hexane ou adsorption sur polymères (Rosario Salinas et al., 1994). Son analyse peut également être réalisée par HPLC avec un seuil de détection de 0,5 mg/l soit 0,5 ppm dans du plasma ou un broyat de tissu cérébral (Dean et al., 1989).

L'acide acétique peut être dosé par voie enzymatique, en présence d'acétate kinase. Différents kits commerciaux existent, dédiés aux boissons ou liquides. Son dosage peut également être réalisé par HPLC, par exemple dans les vins après une pré-séparation sur résine échangeuse d'anions (Goiffon et al., 1985).

- L'acide 1-hydroxyéthylidène-1, 1-diphosphonique (HEPD)

Peu de références existent sur le dosage de cette molécule. Le dosage de l'HEPD sur du liquide de rinçage de carcasses est pourtant relaté par la société ALCIDE, qui commercialise des produits de désinfection la contenant, données reprises dans les rapports du Comité Scientifique des Mesures Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique (CSMVSP) de 1998 et de 2003.

## 2. Dioxyde de chlore

La mesure de faibles concentrations de dioxyde de chlore a pu être réalisée dans l'eau par dosage colorimétrique sélectif à l'aide de rouge de chlorophénol en présence de cyclamate de sodium et de thioacétamide (Fletcher et Hemmings, 1985).

Des dosages par titration iodométrique et par titration au N, N-diéthyl-p- phénylène diamine (DPD) ferreux du dioxyde de chlore disponible (« Total available chlorine dioxyde » - APHA, 1989 a, b) ont été réalisés dans des solutions de désinfection de différents poissons (Kim et al., 1999). La question de son applicabilité à la surface ou à la peau des volailles n'est pas tranchée.

Des mesures au sein de biofilms à l'aide de micro-électrodes ont également été mentionnées (Jang et al., 2006). Des électrodes de mesure sont également commercialisées pour doser le dioxyde de chlore dans les eaux potables, industrielles, de procédé, etc. avec des limites de mesure annoncées de 0,5 ppm à 2 ppm.

## 3. Chlorite de sodium acidifié

Des dosages par titration iodométrique et par titration au N, N-diéthyl-phénylènediamine (DPD) ferreux sont réalisables dans les eaux et solutions de désinfection (APHA, 1989a, b).

Des dosages des ions chlorite et chlorate ont été réalisés sur des broyats de poisson par chromatographie ionique (Dionex), avec une gamme de mesure démarrant à 0,125 ppm et un seuil de détection dans l'eau désionisée de 0,05 ppm (Kim et al., 1999).

Des électrodes de mesure sont également commercialisées, pour le dosage de l'ion chlorite dans les eaux potables, industrielles, de procédé avec des limites de mesure annoncées de 0,03 ppm à 2,5 ppm. Leur utilisation est présentée comme beaucoup moins contraignante que le recours à la chromatographie ionique.

## 4. Phosphate trisodique

Cet additif (E338 – E341) peut être dosé par chromatographie ionique (Dionex), exprimé en acide ortho-phosphorique.



## II. Niveau des résidus de traitement sur les carcasses traitées

Les données sont extraites de l'avis du CSMVSP d'avril 2003, sur l'évaluation des traitements antimicrobiens des carcasses de volaille. Les études citées dans l'avis ont été menées par les producteurs des substances antimicrobiennes.

- Dioxyde de chlore : pas de données disponibles sur les niveaux de résidus après traitement ni sur leur évolution dans le temps. Cependant l'avis estime raisonnable d'assimiler le comportement de cette molécule à celui du chlorite de sodium acidifié, avec des niveaux maximum de résidus de 0,13mg /kg (chlorite) et 0,06 mg/kg (chlorate) de carcasse ;

- Chlorite de Sodium Acidifié : Après 1h dans un bain de décontamination ( $\text{NaClO}_2$  à 0,15 g/L ; pH= 2,8 ; 5°C) puis 5 min d'égouttage et rinçage 5min dans de l'eau propre, les taux de résidus sont soit inférieurs au seuil de détection (Chlorite - <16µg/kg) soit le deviennent après 2h (Chlorate - <19µg/kg).

- Peroxyacides : dans des conditions de traitement similaires à celles prévues dans le projet de règlement, les taux de résidus des peroxy-acides et peroxyde d'hydrogène sont inférieurs au seuil de détection (1mg/l de liquide de rinçage utilisé pour le dosage)

- HEPD : dans des conditions de traitement similaires à celui prévu dans le projet de règlement (solution à 10mg/l d'HEPD, immersion 15 s puis égouttage), 120 à 170 µg/kg de carcasse sont détectés dans le liquide de rinçage utilisé pour le dosage.

- Phosphate trisodique : Pas de données disponibles pour les volailles.

## III. Présence de produits de réaction sur les carcasses traitées

D'après l'avis de l'AESA, aucun sous-produit de réaction détectable n'est susceptible d'être présent sur les carcasses de volaille (semicarbazides, acides gras oxydés), tout au moins pas de façon caractéristique.

Le phosphate trisodique est inerte vis à vis des constituants de la matrice. L'acide chloreux ne forme pas de dérivés avec les acides aminés ou la matière grasse, exceptés en surface où une oxydation des lipides peut être mesurée.

## Conclusion

Hormis pour le HEPD, des méthodes de dosage des différentes molécules envisagées dans le projet de règlement ont pu être retrouvées dans la littérature scientifique ou technique.

Cependant les matrices dans lesquelles le dosage de ces molécules est décrit sont différentes de la surface d'une carcasse de volaille. Il s'agit en général d'eaux ou de liquides (vins, solutions de désinfection, eaux de procédés). Les peroxydes ainsi que les chlorites et chlorates ont fait l'objet de dosages dans des matrices plus complexes (laits, filets de poisson, etc.). Quelle que soit la molécule considérée, l'application de son dosage à la surface de carcasse de volaille resterait à adapter ( le rinçage de la carcasse étant probablement le mode de prélèvement le plus approprié). Les performances des protocoles ainsi obtenus devraient être établies, notamment en ce qui concerne leur seuil de détection, qui doit permettre de détecter les résidus éventuellement présents sur les carcasses. Cependant, d'après les données recueillies dans l'avis du CSMVSP d'avril 2003, seuls le HEPD et des résidus de traitement par le dioxyde de chlore (chlorite et chlorate) seraient susceptibles d'être détectables sur les carcasses après traitement. Le niveau de résidus de traitement du phosphate trisodique reste à déterminer.

Les sous produits de réaction (semicarbazides et acides gras oxydés) ne semblent pas être une voie pertinente pour l'identification des carcasses traitées, même si la mesure de l'oxydation des lipides en surface pourrait être étudiée.

En conséquence et en l'état actuel des données recueillies, la distinction par des moyens analytiques des carcasses traitées paraît être difficile à réaliser. Des études complémentaires spécifiques devraient être entreprises afin de le vérifier.

## Références bibliographiques

- American Public Health Association (APHA); 4500-CIO<sub>2</sub>/DPD Method. Standard methods for the examination of water and wastewater, 17<sup>th</sup> ed.; American Public Health Association: Washington, D.C., 1989b
- American Public Health Association (APHA); 4500-CIO<sub>2</sub>/Iodometric Method. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 17<sup>th</sup> ed.; American Public Health Association: Washington, D.C., 1989a
- Bloomfield, S. F. 2002. Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*:144S-157S.
- Bolton L.F., Frank J.F., 1999, Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Appl. Microbiol.*, 29, 350-353.
- Brul S., Coote P., 1999, Preservative agents in foods – Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. of Food Microbiol.*, 50, 1-17.
- Capita R., Alonso-Calleja C., del Camino Garcia-Fernandez M. and B. Moreno, 2002, Activity of trisodium phosphate compared with sodium hydroxide wash solutions against *Listeria monocytogenes* attached to chicken skin during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 19, 57-63.
- Carneiro de Melo A.M., 1998, Trisodium phosphate increases sensitivity of gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *J. Food Prot.*, 61, n° 7, 839-843.
- Chantarapanont W., 2004, Direct microscopic observation of viability of *Campylobacter jejuni* on chicken skin treated with selected chemical sanitizing agents. *J. Food Prot.*, 67, n° 6, 1146-1152.
- Chapman J.S., 2003, Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, coresistance. *Int. Biodet. and Biodegrad.*, 51, 271-276.
- Chaveerach P., AAHM Huurne, L.J.A. Lipman, F. van Knupen, 2003, Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 69, n° 1, 711-714.
- Davis M.J., P.J. Coote, C.P. O'Byrne, 1996, Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*, 142, 2975-2982.
- Dean H.G., Bonser J.C., Gent J.P. HPLC analysis of brain and plasma for octanoic and decanoic acids. *Clin. Chem.*, 1989, 35, 9, 1945-1948.
- Dukan S., D. Touati, 1996, Hypochlorous acid stress in *E.coli*: resistance, DNA damage and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. of Bacteriol.*, 178, 6145-6150.
- Earnshaw, A. M., et L. M. Lawrence. 1998. Sensitivity to commercial disinfectants, and the occurrence of plasmids within various *Listeria monocytogenes* genotypes isolated from poultry products and the poultry processing environment. *J Appl Microbiol* 84:642-8.
- EFSA. Joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and the efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin. Adopted on 13 July and 28 August 2006.
- EFSA. Opinion from the Scientific Panel BIOHAZ on the evaluation of the efficacy of L (+) Lactic acid for carcass decontamination. Adopted on 15-16 March 2006 (EFSA-Q-2005-107A)
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel BIOHAZ on "Evaluation of the efficacy of peroxyacids for use as an antimicrobial substance applied on poultry carcasses». Adopted on 14-15 December 2005.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to: Treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. Adopted on 6 December 2005.

European Commission – Health and consumer protection directorate general. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on The evaluation of antimicrobial treatments for poultry carcasses. Adopted on 14-15 April 2003. ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out63\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out63_en.pdf))

European Commission – Health and consumer protection directorate general. Report of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Benefits and limitations of antimicrobial treatments for poultry carcasses. 30 October 1998. ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out14\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out14_en.pdf))

Fletcher I.J., Hemmings P. Determination of chlorine dioxide in potable waters using chlorophenol red. *Analyst*, 1985, 110, 6, 695-699.

Foster JW, Hall HK. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1990 Feb;172(2):b771–778.

Frank, J., F., R. A. Koffi. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection* 53:550-554.

Gilbert, P., D. G. Allison, et A. J. McBain. 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol* 92 Suppl:98S-110S.

Goiffon J.P., Blachère M., Réminiac C. Dosage des acides organiques du vin par chromatographie en phase liquide. *Analisis*, 1985, 13, 5, 218-225.

Guerin-Méchin L., J.Y. Leveau, F. Dubois-Brissonnet, 2004, Resistance of spheroplasts and whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. *Microbial Research*, 159, 51-57.

Ho Choi S., Baumlér D.J., W. Kaspar C. 2000 Contribution of *dps* to Acid Stress Tolerance and Oxidative Stress Tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 66(9): 3911–3916.

Holah, J. T., J. H. Taylor, D. J. Dawson, et K. E. Hall. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 92 Suppl 1:111S-20S.

Honda, M. Kataoka K., E. Sakuradani, S. Shimizu, 2003, Role of *Acinetobacter calcoaceticus* 3,4-dihydrocoumarin hydrolase in oxidative stress defence against peroxyacids. *Eur. J. Biochem.*, 270, 486-494.

Jang A., Szabo J., Hosni A.A., Coughlin M., Bishop P.L. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72, 2, 368-376.

Jones, M. V., T. M. Herd, and H. J. Christie. 1989. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* 58:49-61.

Juven B.J., Merle D.P. Antibacterial effect of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Prot.*, 1996, 59, 11, 1233-1241.

Kim J., Marshall M.R., Du W.X., Otwell W.S., Wei C.I. Determination of chlorate and chlorite and mutagenicity of seafood treated with aqueous chlorine dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 3586-3591.

Langsrud, S., and G. Sundheim. 1997. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J Appl Microbiol* 82:705-12.

Langsrud, S., G. Sundheim, et R. Borgmann-Strahsen. 2003a. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J Appl Microbiol* 95:874-82.

Langsrud, S., L. Seifert, and T. Moretro. 2006. Characterization of the microbial flora in disinfecting footbaths with hypochlorite. *J Food Prot* 69:2193-8.

Langsrud, S., T. Moretro, et G. Sundheim. 2003b. Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *J Appl Microbiol* 95:186-95.

Lavoisier – Tec et doc- Les acquisitions récentes en chromatographie du vin »

Leriche, V., R. Briandet, and B. Carpentier. 2003. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environ Microbiol* **5**:64-71.

Leyer G.J., E.A. Johnson, 1993, Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 59, n° 6, 1842-1847.

Leyer G.J., E.A. Johnson, 1997, Acid adaptation sensitizes *salmonella typhimurium* to hypochlorous acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, n° 2, 461-467.

Liao C.H., 2001, Response to trisodium phosphate treatment of *Salmonella chester* attached to fresh-cut green pepper slices. *Can. J. Microbiol.*, 47, n° 1, 25-32.

Lunden, J., T. Autio, A. Markkula, S. Hellstrom, et H. Korkeala. 2003. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int J Food Microbiol* **82**:265-72.

Mechin, L., F. Dubois-Brissonnet, B. Heyd, and J. Y. Leveau. 1999. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol* **86**:859-66.

Mereghetti, L., R. Quentin, N. Marquet-Van Der Mee, et A. Audurier. 2000. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5083-6.

Mettler, E., et B. Carpentier. 1998. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *J Food Prot* **61**:57-65.

Meyer, B. 2006. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *Int J Food Microbiol* **112**:275-9.

Miyamoto F., Saeki M., Yoshizawa T. Improved protocol for an oxygen electrode method for determining hydrogen peroxide in foods. *J. AOAC Int.*, 1997, 80, 3, 681-687.

Murphy C., C. Carroll, K.N. Jordan, 2003, Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. *J. of Appl. Microbiol.*, 95, 704-708.

Murphy C., C. Carroll, K.N. Jordan, 2003, Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Letters*, 223, 89-93.

Murphy C., Carroll C., Jordan K.N. (2003). Induction of an adaptive tolerance response in the foodborne pathogen, *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters*, 223 (1) 89-93

Murtough, S. M., S. J. Hiom, M. Palmer, et A. D. Russel. 2001. Biocide rotation in the healthcare setting: is there a case for policy implementation? *Journal of Hospital Infection* **48**, 1-6.

O'Driscoll B., G.M. Gahan, C. Hill, 1996, Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62, n° 5, 1693-1698.

Oyarzabal and al, 2004. Effect of postchill Application of acidified sodium chlorite to control *Campylobacter* spp and *Escherichia coli*. *J. of Food Prot.*, 67, n° 10, 2288-2291.

Pan Y., Breidt JR et Kathariou (2006) Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* published online ahead of print on 29 september 2006. doi:10.1128/AEM.01065-06.

Ramirez-Orozco M., 2001, *Debaryomyces hansenii* growth in nonsterile seawater ClO<sub>2</sub>-peptone-containing medium. *Can. J. Microbiol.*, 47, n° 7, 676-679.

Romanova N., S. Favrin, M.W. Griffiths, 2002, Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 68, n° 12, 6405-6409.

Rosario Salinas M. Alonso G.L., Esteban Infantes J. Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aromas. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 1328-1331.

Russell, A. D. 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions.

Symp Ser Soc Appl Microbiol:171S-173S.

Samelis J., J.N. Sofos, P.A. Kendall, G.C. Smith, 2005, Survival or growth of E.coli 0157:H7 in a model system of fresh meat decontamination runoff waste fluids and its resistance to subsequent lactic acid stress. *App. and Environ. Microbiol.*, 71, n° 10, 6228-6234.

Sampathkumar B., 2004, Treatment of salmonella enterica serovar enteritidis with a sublethal concentration of trisodium phosphate or alkaline pH induces thermotolerance. *Applied Environmental Microbiol.*, 70, n° 8, 4613-4620.

Somers E.B., A.L. Lee Wong, 2004, Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *J. of Food Protection*, 67, n° 10, 2218-2229.

Stopforth J.D., Y. Yoon, K.E. Belk, J.A. Scanya, P.A. Kendall, G.C. Smith, J.N. Sofos, 2004, Effect of simulated spray chilling with chemical solutions on acid-habituated and non-acid-habituated E.coli 0157:H7 cells attached to beef carcass tissue. *J. of Food Protection*, 67, n° 10, 2099-2106.

Stopforth J.D., J. Samelis, J.N. Sofos, P.A. Kendall, G.C. Smith, 2002, Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *J. of Food Protection*, 65, n° 11, 1717-1727.

Tanaka A., Iijima M., Kikuchi Y. Determination of hydrogen peroxyde in fish products and noodles (japanese) by gas-liquid chromatography with electron-capture detection. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 2154-2159.

Taormina P.J., L.R. Beuchat, 2002, Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *J. of Appl. Microbiol.*, 92, 71-80.

Toyoda M., Iwaida M., Utangi Y., Ohashi M., Fujii M. Simple and rapid determination of hydrogen peroxyde contained in milk by use of an oxygen electrode. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 1982, 17, 41-46.

Xu J., Chen Z. Determination of peroxydes in environmental samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Se Pu.*, 2005, 23, 4, 366-369.

YPark. K., B. Bearson, S.H. Bang, I.S. Bang, J.W. Foster, 1996, Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of salmonella typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 20, 605-611.

Yuk H.G., 2006, Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion and acid resistance of E.coli 0157:H7 in simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, n° 1, 39-44.

Zook C.D., 2001, Sublethal sanitizer stress and adaptive response of E.coli 0157:H7. *J. Food. Prot.*, 64, n° 6, 767-769.