



Réflexions sur les techniques bactériologiques applicables aux lactariums en 2019

Résultats de l'enquête sur les pratiques bactériologiques actuelles

Céline DUPIEUX-CHABERT

Laboratoire de Bactériologie, Hospices Civils de Lyon



Les règles de bonne pratique ; décret 2007

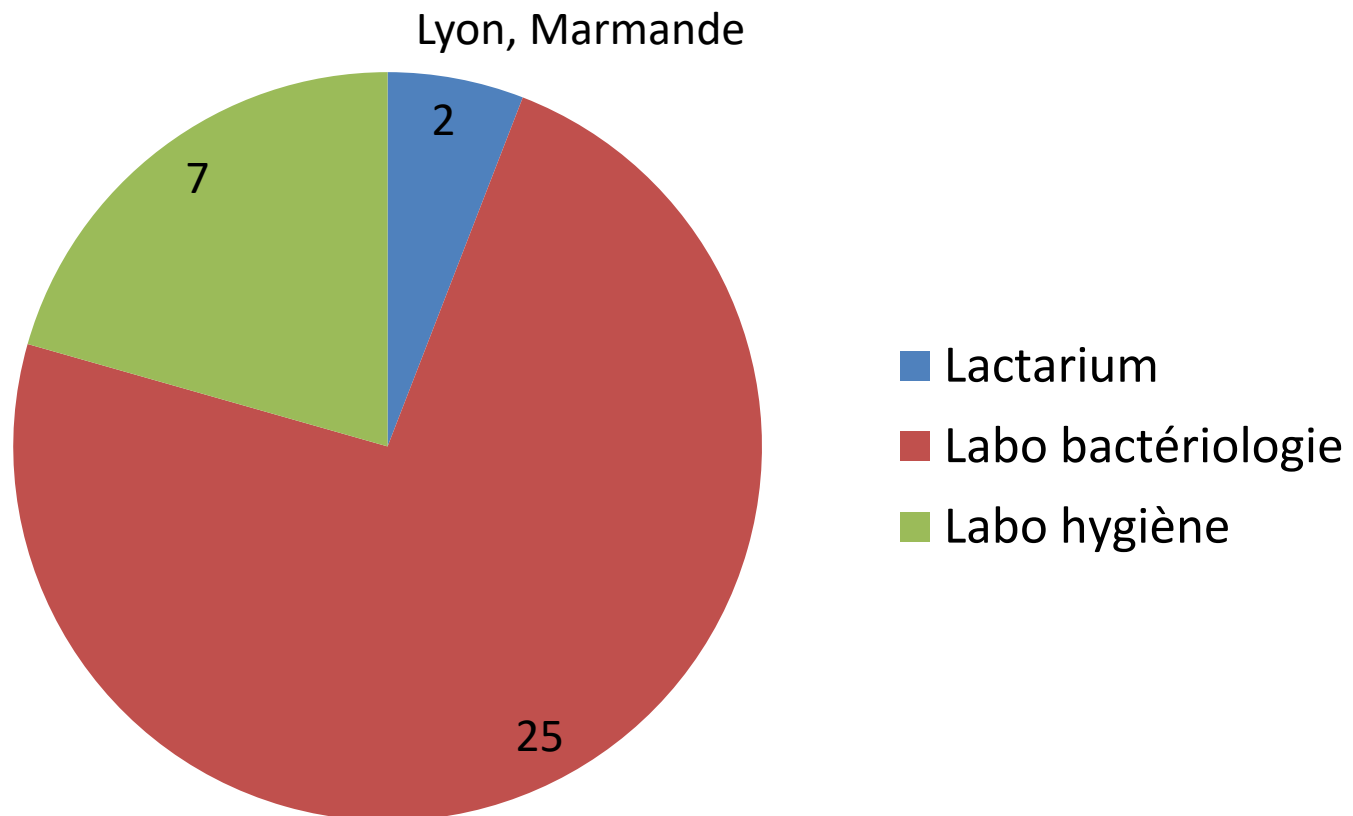
- Recommandations sur les tests bactériologiques à réaliser (**milieux** de culture, **durée** d'incubation +/- **volume** d'ensemencement) avant et après pasteurisation et les seuils décisionnels
 - Pré-P :
 - Flore totale aérobie : gélose au sang, 48h
 - *S. aureus* (« Staphylocoque à coagulase positive ») : milieu de Chapman, 48h
 - Post-P :
 - Contrôle de « stérilité » : gélose au sang, 48h, 0.5 mL

Quelques questions que nous pouvons nous poser

- Les bonnes pratiques sont-elles **adaptées** aux **laboratoires** et/ou **techniques** de bactériologie d'aujourd'hui ?
 - Ne plus imposer de milieux de culture ou en changer ?
 - Quantité de lait à ensemer ?
 - Techniques plus performantes ?
- Problématiques :
 - Justification des seuils ?
 - Pré-P : entérotoxines
 - Post-P : screener le *Bacillus cereus* ? exigence de stérilité ?

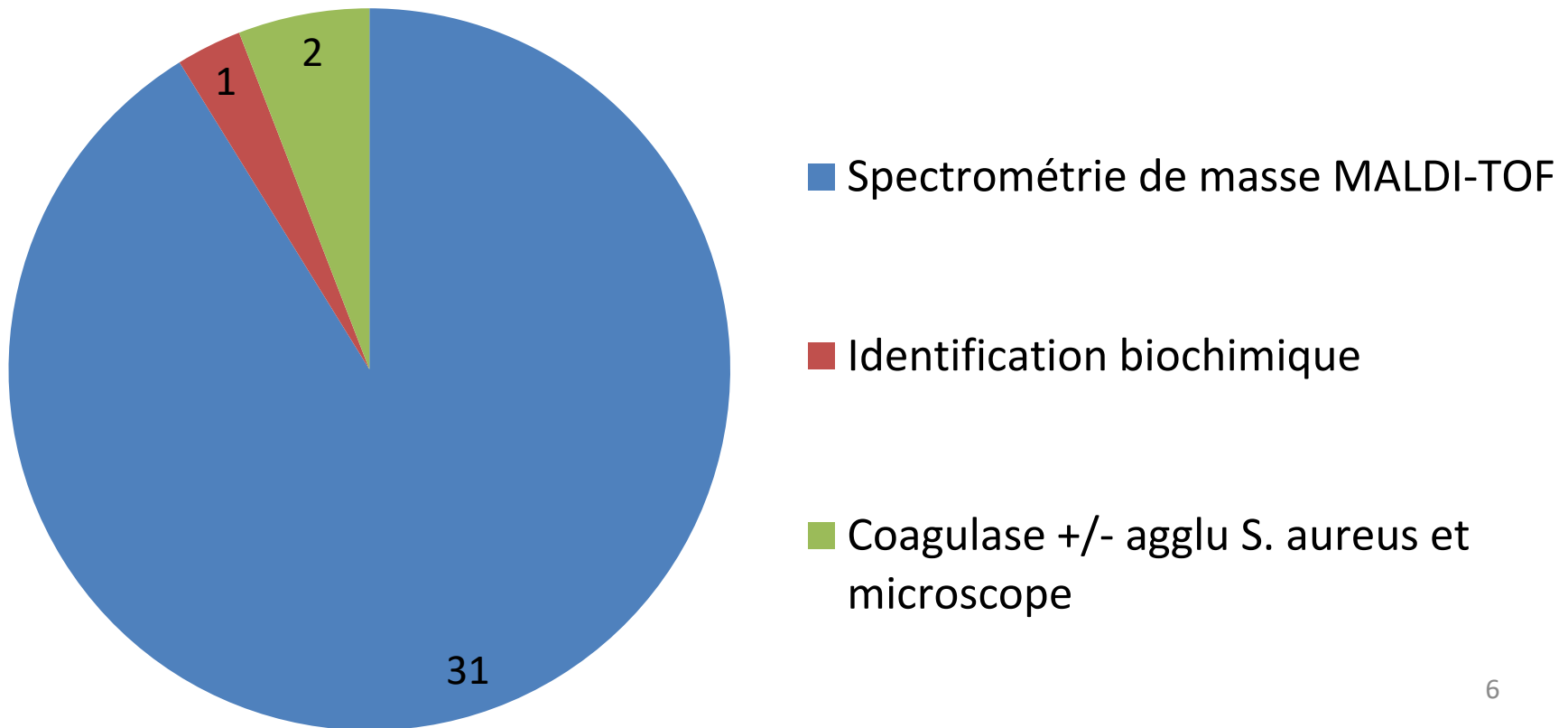
Enquête bactériologie dans les lactariums de France

1 - Par qui est réalisée la bactériologie du lait maternel ? (n=34)



Enquête bactériologie dans les lactariums de France

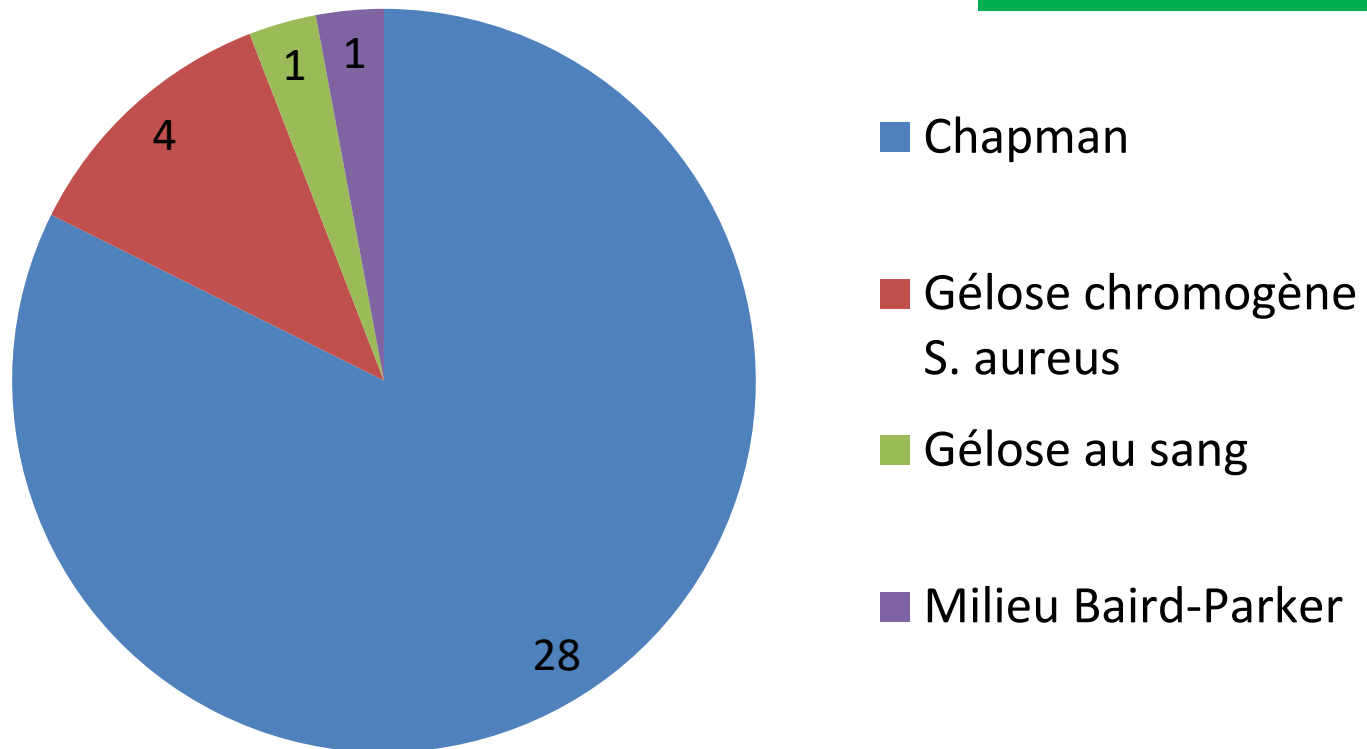
2 - Quelles techniques d'identification des germes utilisez-vous ? (n=34)



Enquête bactériologie dans les lactariums de France

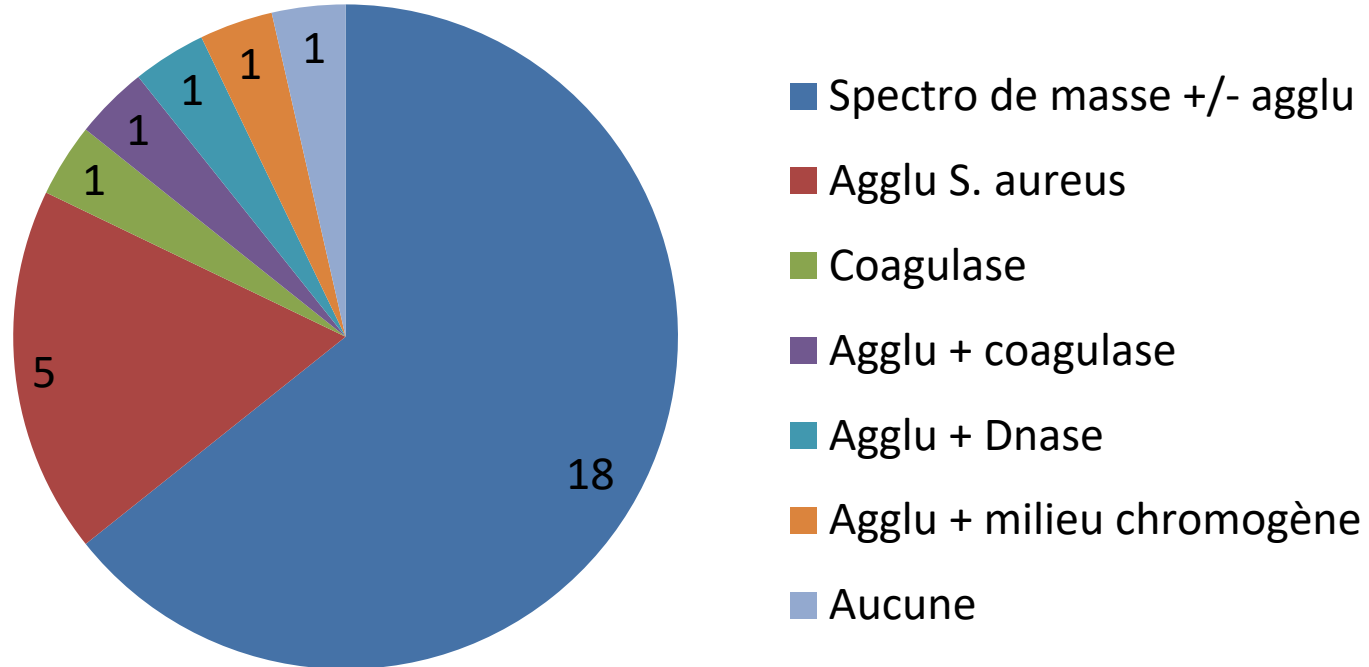
3 – Utilisez-vous le milieu de Chapman pour détecter *Staphylococcus aureus* ? (n=34)

BP2007 : Chapman



Enquête bactériologie dans les lactariums de France

3 – Utilisez-vous le milieu de Chapman pour détecter S. aureus ?
Si oui (n=28), techniques complémentaires pour confirmer l'identification ?

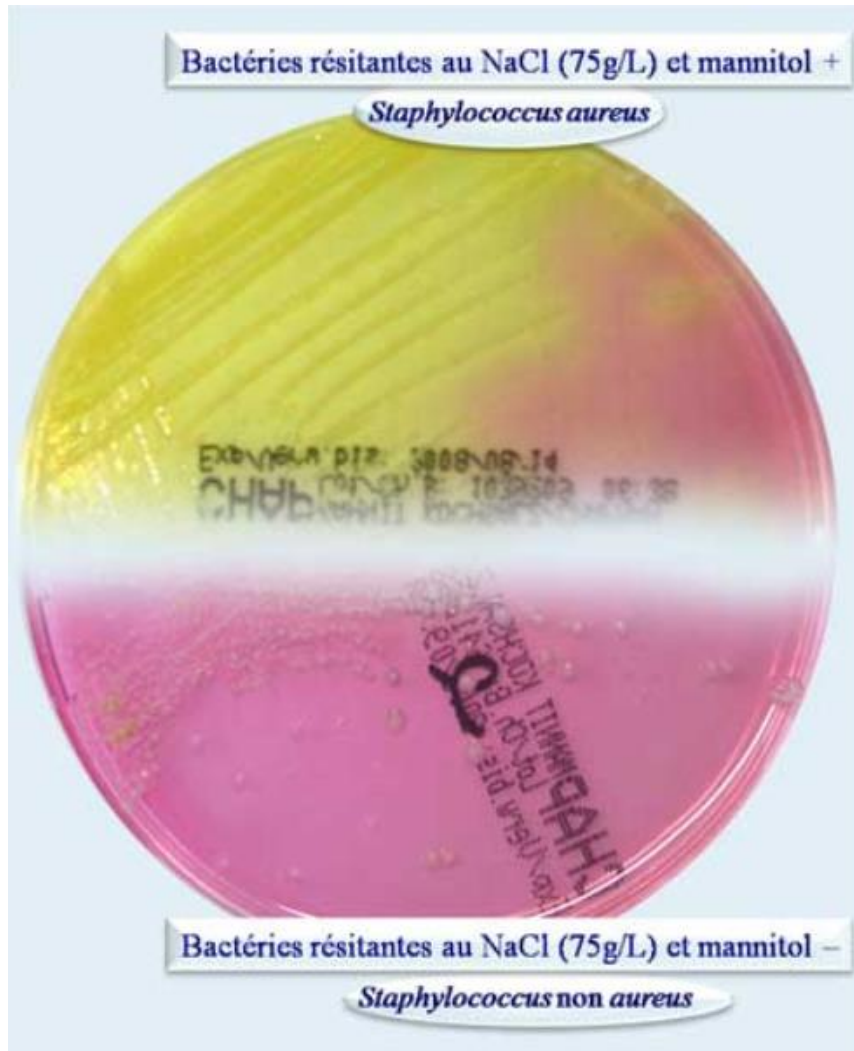


Autres milieux : Baird-Parker (n=1) -> coagulase

milieu chromogène (n=4) -> spectro de masse (n=2), aucune (n=1), NSP (n=1)

gélose sang (n=1) -> spectro de masse +/- agglu

Milieu de Chapman (MSA, mannitol salt agar medium)



- Incubation 48h sinon risque de faux-négatifs
- Validé pour lait, alimentaire, prélèvements cliniques
- Identification présomptive des staphylocoques à coagulase positive : nécessité confirmation car faux-positifs (*S. epidermidis*, entérocoques...)

Autres milieux utilisables pour *S. aureus*

- **Milieux chromogènes**

- Validés pour prélèvements cliniques +/- alimentaires
- Identification en 24h, pas de confirmation nécessaire
- Risque de faux-positif si >24h
- Sensibilité > Chapman
- Spécificité $\approx$ 98-99% à 24h (équivalente Chapman)



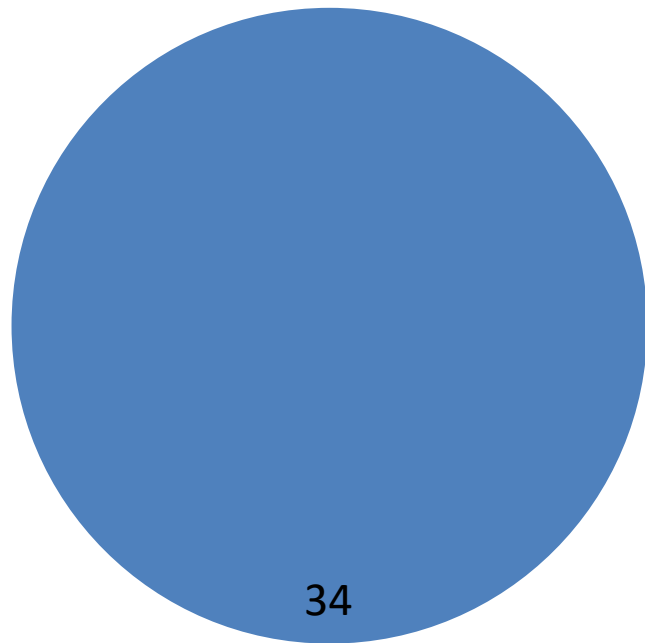
- **Milieu Baird-Parker**

- Utilisé en bactériologie alimentaire, hygiène
- Incubation 48h
- Identification directe si contient du plasma de lapin + fibrinogène
- Sinon nécessite confirmation par coagulase ou MALDI-TOF



Enquête bactériologie dans les lactariums de France

5 – Utilisez-vous la gélose au sang comme milieu de culture pour détecter la flore totale ? (n=34)



BP2007 : gélose au sang

■ Oui

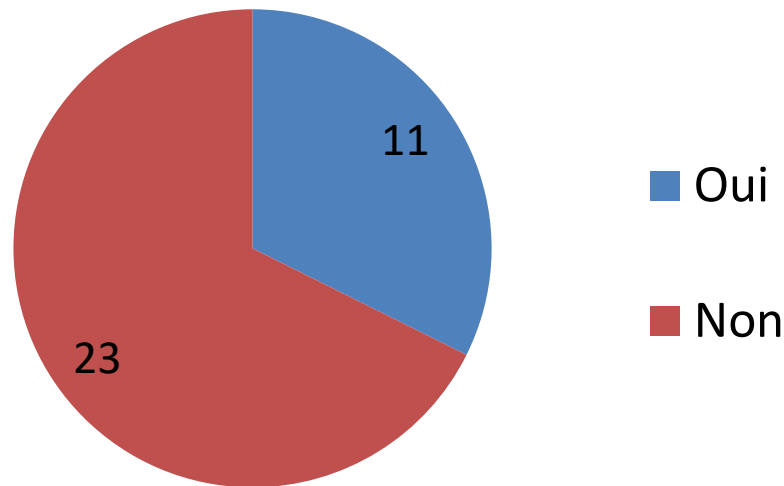
→ Mais est-ce un bon milieu de dénombrement ?
En hygiène/bactério alimentaire, Plate count agar PCA

Enquête bactériologie dans les lactariums de France

6 - Recherchez-vous d'autres germes spécifiquement, en dehors du *Bacillus cereus* ?

BP2007 : pas d'autre recherche

Autres micro-organismes identifiés (n=34)



Pas de milieu spécifique supplémentaire réalisé
Identification parmi la flore totale de :

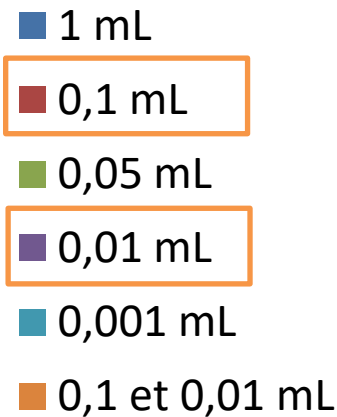
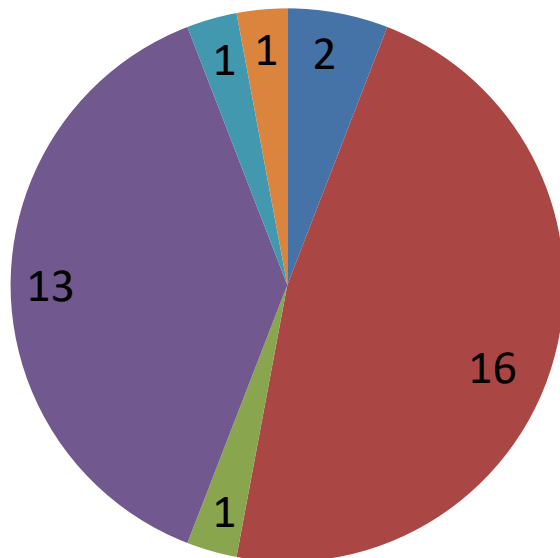
entérobactéries,
Pseudomonas/BGN non fermentants,
streptocoques bêta-hémolytiques,
entérocoques,
levures,
flore monomorphe,
tout germe potentiellement pathogène,
tout germe sauf staphylocoque

→ Attitude différente selon type et quantité du germe ?

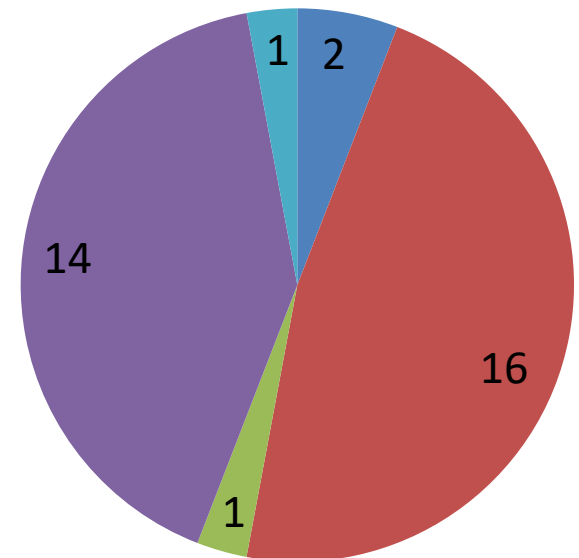
Enquête bactériologie dans les lactariums de France

7 - Quelle quantité de lait (pur ou dilué) est utilisée pour ensemer le milieu de culture ?

Flore totale



S. aureus

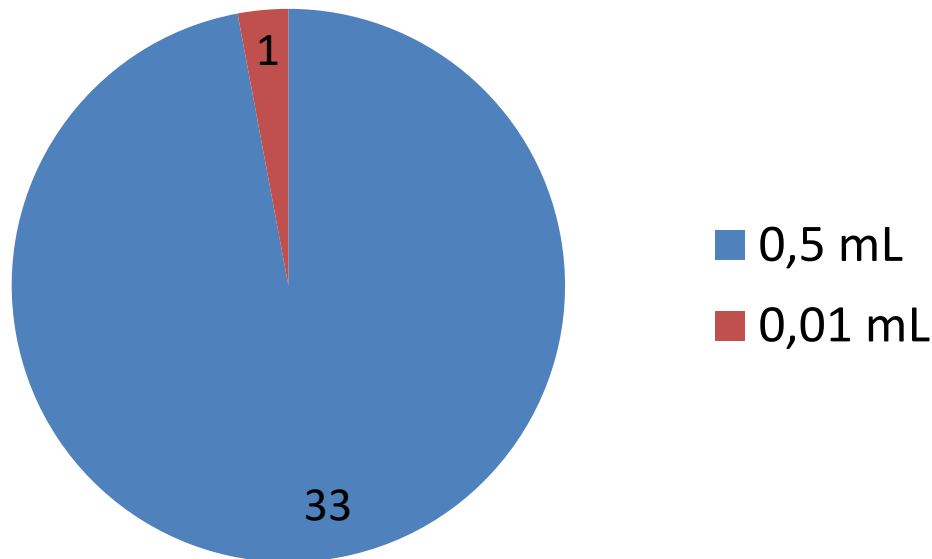


Enquête bactériologie dans les lactariums de France

7 - Quelle quantité de lait est utilisée pour ensemer le milieu de culture ? (n=34)

Post-pasteurisation

BP2007 : 0,5 mL

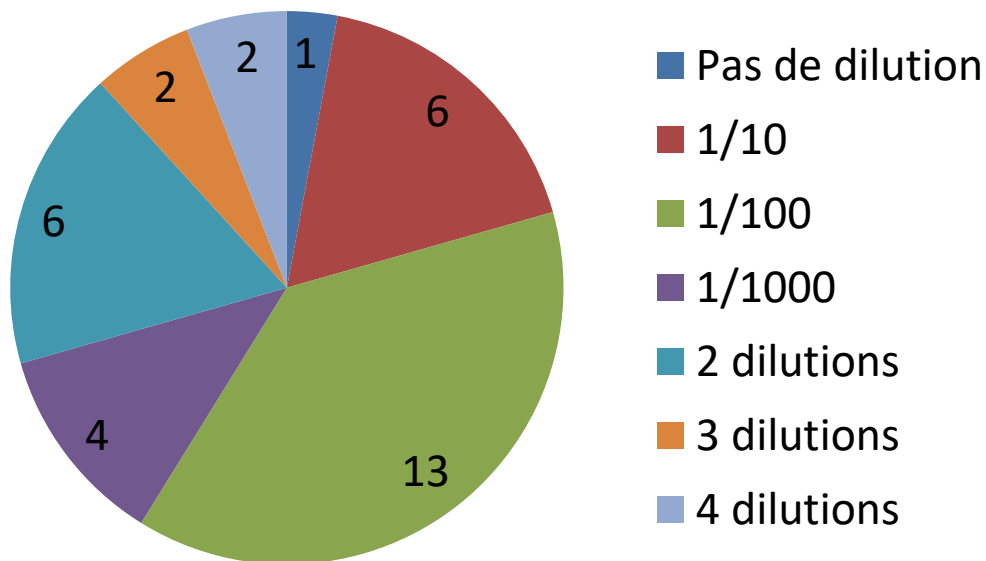


Exception : Necker
0,01 mL après **pré-incubation**
18h à 37°C de 20 mL de lait
permettant d'augmenter la
charge bactérienne (notamment
Bacillus) et de diminuer le
nombre de contaminants

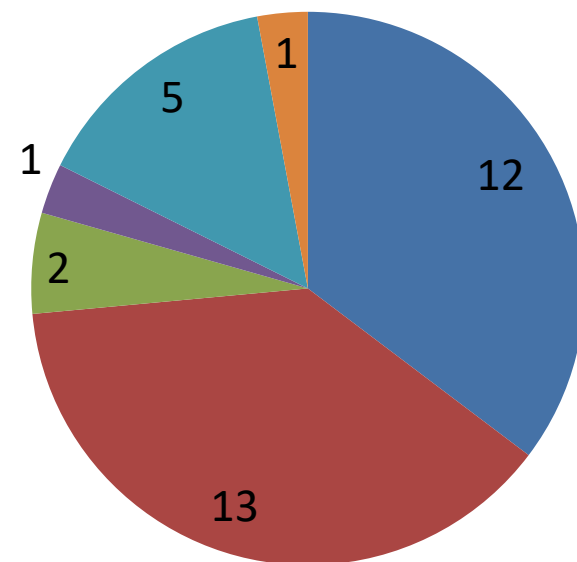
Enquête bactériologie dans les lactariums de France

8 - Effectuez-vous une dilution du lait avant d'ensemencer ?

Flore totale



S. aureus



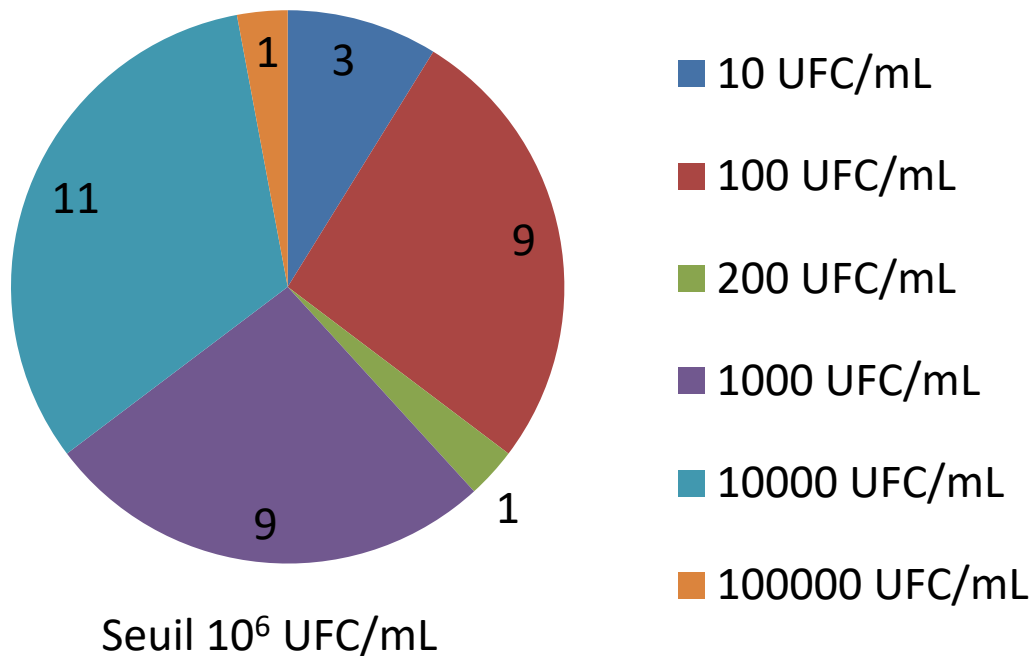
En post-pasteurisation, sur la gélose (flore totale) : pas de dilution

BP2007 : pur en post-P

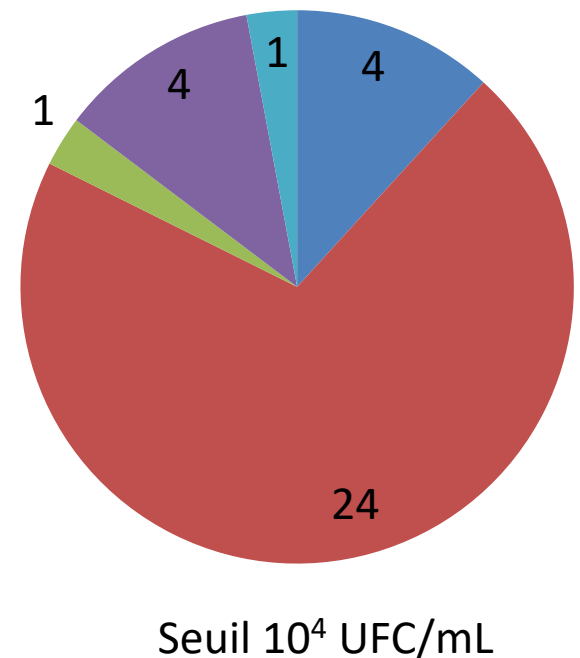
Enquête bactériologie dans les lactariums de France

Sensibilité de détection selon le volume et la dilution utilisés

Flore totale



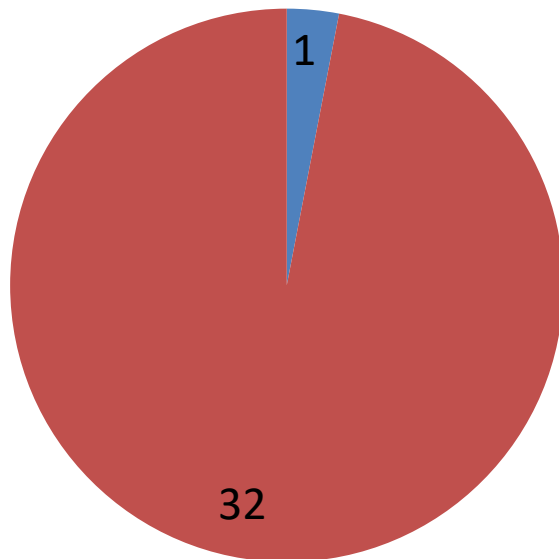
S. aureus



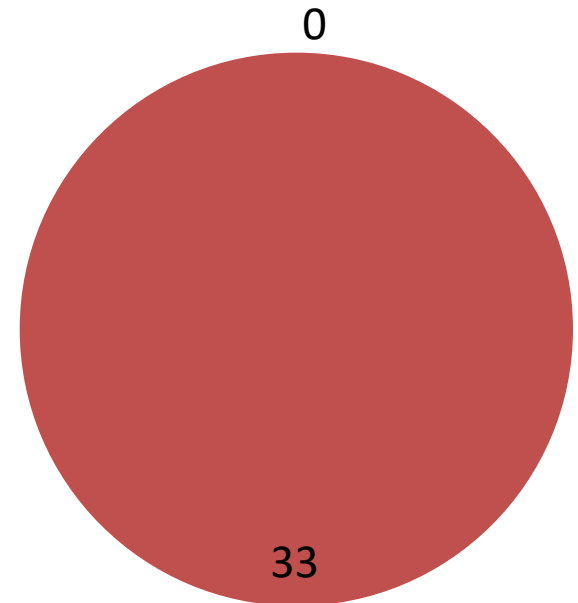
Enquête bactériologie dans les lactariums de France

9 – Quelle durée d'incubation utilisez-vous ? (n=33)

Flore totale pré-P



Milieu *S. aureus* et post-P

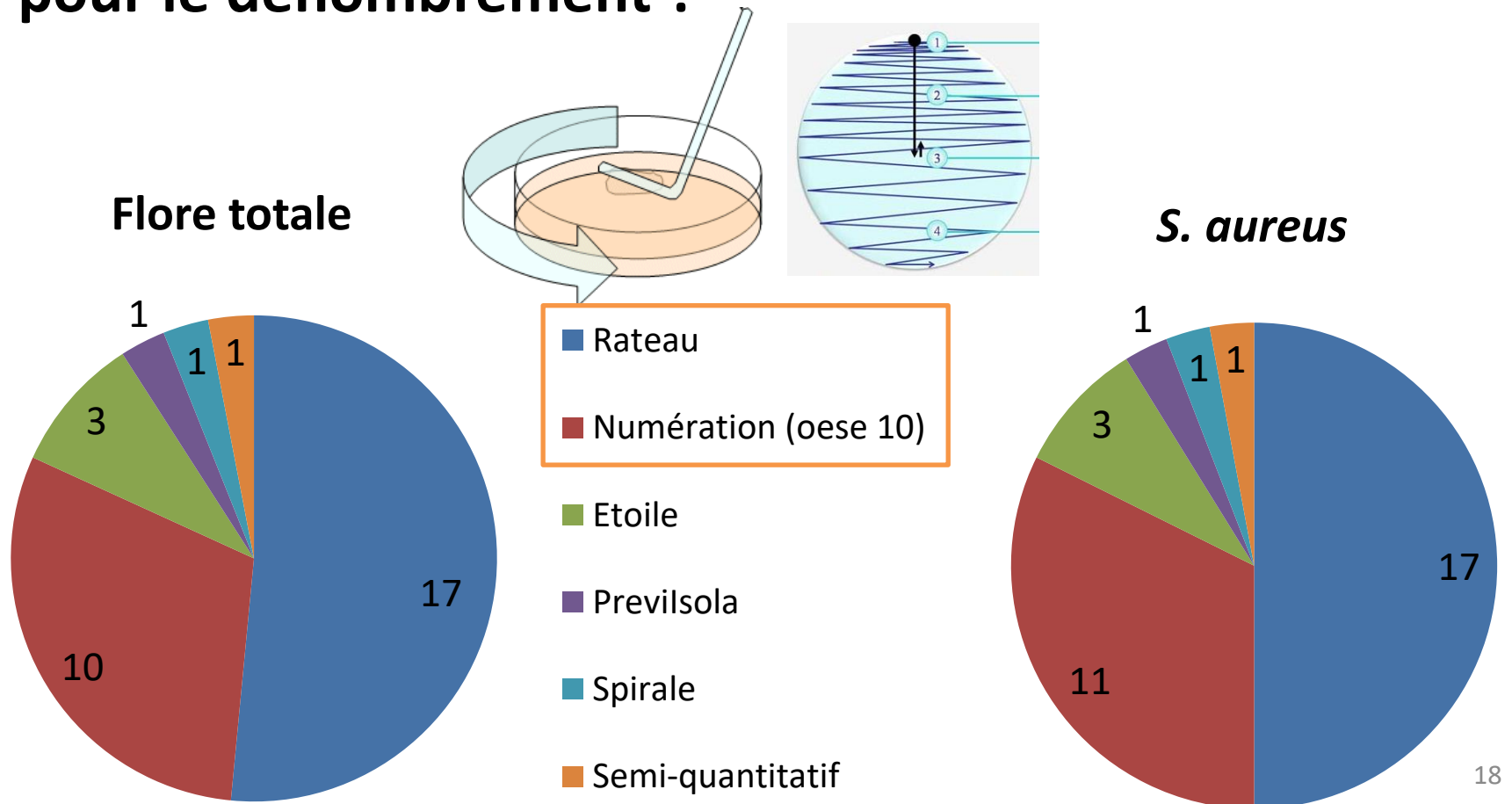


■ 24h
■ 48h

BP2007 : 48h sauf sous-lots, 24h

Enquête bactériologie dans les lactariums de France

11 – Quelle technique d'ensemencement utilisez-vous pour le dénombrement ?



Enquête bactériologie dans les lactariums de France

10 – Quelle température de mise en culture utilisez-vous ? (n=34)

35-37°C pour tous

BP2007 : 37°C

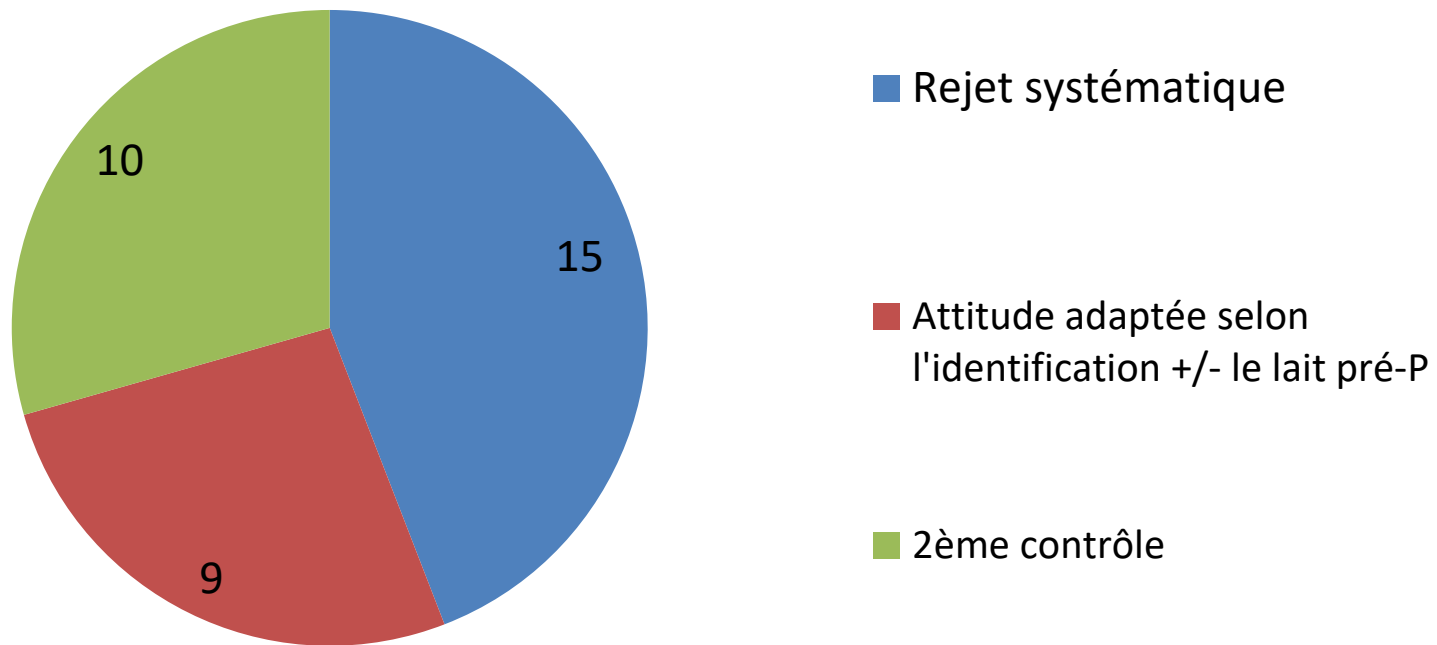
12 - Comment se fait la lecture des résultats ? (n=34)

Automatisée 1

Manuelle 33

Enquête bactériologie dans les lactariums de France

13 - Que faites-vous si vous trouvez 1 à 2 colonies (probable contamination) en post-pasteurisation ?



Influence sur le taux de rejet de lait ? 14,7% en moyenne si rejet systématique vs. 10,2% et 9,7% si adaptation selon identification ou 2^{ème} contrôle

Enquête bactériologie dans les lactariums de France

16 - Effectuez-vous une technique particulière pour détecter le *Bacillus cereus* ?

Seulement 2/34

Necker : en post-P

pré-incubation 18h à 37°C de 20 mL de lait
puis ensemencement de 0,01 mL, incubés 18h à 37°C

Tours : en pré-P

ensemencement de 0,5 mL de lait pur sur gélose au sang en râteau

Composition bactérienne du lait humain

TABLE 1. BACTERIA CONTAMINATING DONOR HUMAN MILK POOLS BEFORE HOLDER PASTEURIZATION

Organism	Prevalence	Colony counts	
		Range	Average
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	87%	100–86,000	4,100
GNRs			
Lactose-fermenting	61%	100–52,000	7,400
Non-lactose-fermenting (e.g., <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i>)	44%	100–40,000	8,100
Oxidase-positive GNRs (e.g., <i>Aeromonas</i>)	20%	100–50,000	9,200
<i>Enterococcus</i>	16%	100–15,000	3,600
α - <i>Streptococcus</i>	8%	100–10,000	1,450
<i>Bacillus</i> sp.	5%	100–1,000	395
<i>S. aureus</i>	4%	100–10,000	1,350
Diphtheroids	2%	100–4,500	980

Landers *et al.* Breastfeeding Medicine, 2010

Table 2 Type of bacteria and occurrence in milk samples

Type of bacterium	Occurrence (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	85.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.1
α Haemolytic streptococcus	10.6
<i>Acinetobacter</i> species	5.4
<i>Serratia</i> species	2.5
<i>Klebsiella</i> species	2.0
<i>Enterobacter</i> species	1.8
<i>Bacillaceae</i> species	1.5
<i>Escherichia coli</i>	0.45
Others	1.0

Lindemann *et al.* Arch Dis Child, 2003

Des données de lactariums français publiées

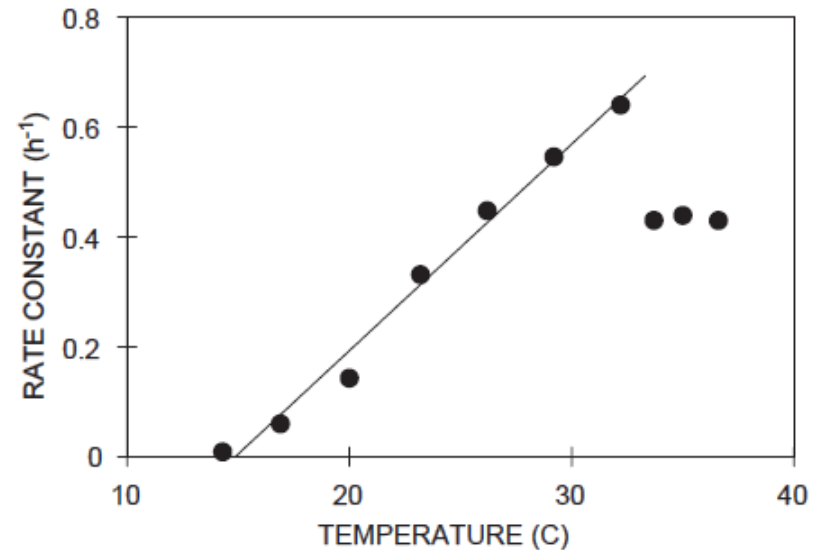
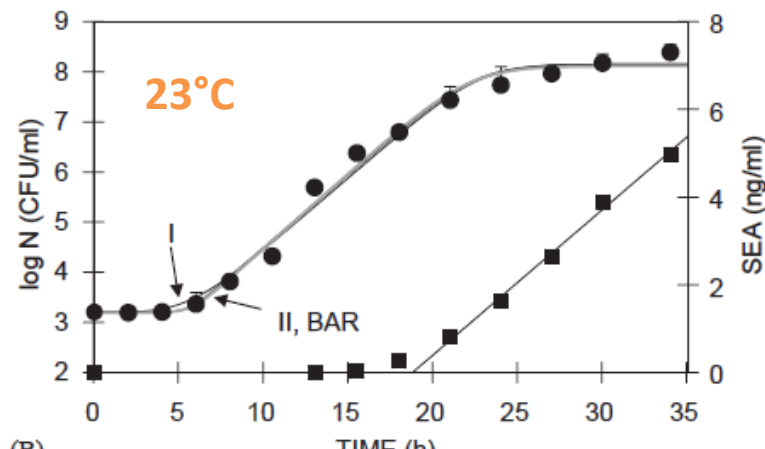
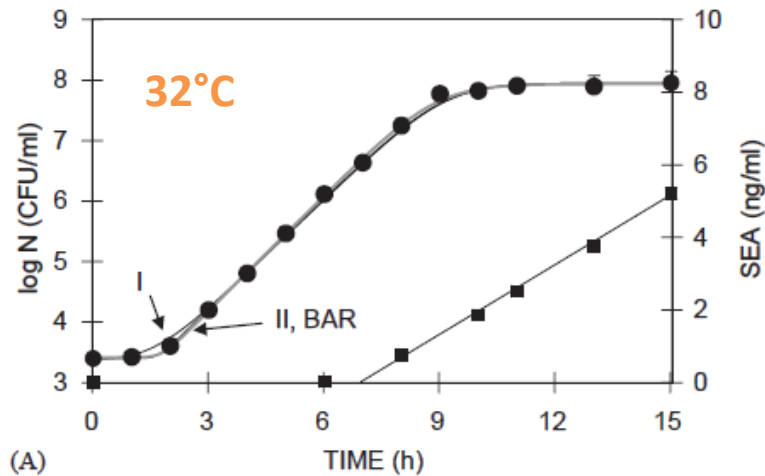
- Dewitte *et al.* Archives pédiatrie 2015 Lille
 - 2011-2012 : 10,8% des laits jetés pour bactério en pré-P
0,5% en post-P (aucun *Bacillus cereus*)
- Mullié *et al.* Archives pédiatrie 2018 Amiens
 - 25% de lait jeté pour bactério (*S. aureus* ou post-P)
 - Baird-Parker et Chapman donnent des résultats similaires (confirmation par coagulase)
 - Post-P : *Bacillus* et CoNS
- Lecointe *et al.* ABC 2016 CH Sud-Francilien
 - Accréditation COFRAC de l'activité de contrôle bactériologique du lait du lactarium, norme ISO17025

S. aureus et entérotoxines

- Rôle considéré mineur chez SCN (souches porteuses des gènes mais pas de cas)
- Heikkila *et al.* Journal of Applied Microbiology 2003
 - La flore commensale inhibe la croissance de *S. aureus* (staphylocoques commensaux, streptocoques oraux)
- Donnelly *et al.* Applied Microbiology 1968
 - Lait inoculé avec *S. aureus* :
 - 10^6 /mL : besoin d'au moins 6-9h à 35°C pour détecter entérotoxine A
 - 10^4 /mL : besoin de 12h à 35°C ; pas de détection à 10°C
 - Effet de compétition de la flore du lait

S. aureus et entérotoxines

- Fujikawa *et al.* Food Microbiology 2006
Production d'entérotoxine A à partir de 10^6 UFC/mL
Augmente proportionnellement à la température



Importance conservation du lait

S. aureus et entérotoxines

- Almutawif *et al.* Breastfeed Med 2019
 - Lait pasteurisé : croissance bactérienne si incubé à 37°C mais pas à +4°C
 - Entérotoxine A détectée seulement si incubé à 37°C, à partir de 9h
- Necidova *et al.* J Dairy Sci 2019
 - Traitement par la chaleur à 100, 110 ou 121°C réduit la quantité d'entérotoxines détectées dans le lait
 - Quantité la plus importante avec les souches seA+
 - L'inactivation des entérotoxines dépend de la quantité avant traitement
 - Importance de la **chaîne du froid** pour empêcher la contamination initiale par *S. aureus*
- Necidova *et al.* J Dairy Sci 2016
 - Laits chargés avec souches de *S. aureus* se+ et incubés 24h à 37°C puis chauffés 15s à 72, 85 et 92°C
 - Entérotoxines réduites par la pasteurisation : leur **inactivation** dépend de la **quantité avant traitement**

Faut-il rechercher *Bacillus* ?

- Infections potentiellement gravissimes chez les prématurés
- Decousser *et al.* American Journal of Infection Control, 2013
 - 2 cas d'infection intestinale sévère chez nouveau-nés
 - *B. cereus* présents que dans échantillons de lait de lactarium et chez nouveau-nés mais **souches différentes**
 - Lait pasteurisé stérile mais après 4h d'incubation dans la sonde d'alimentation, cultures positives à *B. cereus* : contamination via le lait, le matériel, l'environnement ?

Faut-il rechercher *Bacillus* ?

- Présence **variable** dans le lait maternel **avant et après pasteurisation**
 - Rechtman *et al.* Breastsfeeding medicine, 2006
Prévalence *B. cereus* dans HDM avant pasteurisation : 3%
 - Froh *et al.* JOGNN, 2018
Croissance post-pasteurisation : 5,8% (*B. cereus* ou autre *Bacillus*)
 - Landers *et al.* Breastfeeding Medicine, 2010
Après pasteurisation : 7% non stériles dont majoritairement *Bacillus*
 - Cohen *et al.* Breastfeeding Medicine, 2012
Culture de laits pasteurisés décongelés pour utilisation dans un service : 0/22 culture positive
- Si oui, avant/après pasteurisation ? Comment ?
- Lewin *et al.* Infection Control and Hospital Epidemiology, 2019
Aucun cas d'infection néonatale par *B. cereus* n'a pu être relié au lait de lactarium

Les questions qui restent en suspens

- Justification des seuils → Peu de données biblio...
Balance bénéfice-risque
- Ne plus imposer de milieux de culture ou en changer ?
- Quantité de lait à ensemer ?
- Techniques plus performantes ?
→ Techniques culturales, biologie moléculaire ne semble pas adaptée
- Post-pasteurisation :
 - Faut-il screener le *Bacillus cereus* ?
 - Exigence de stérilité ?