

Congrès de l' A.D.L.F.

05 juin 2009, Tours

**Que penser des Bacillus
isolés dans le lait humain
après pasteurisation**

**Dr. Olivia RAULIN,
Bactériologie, Hopital de la Croix Rousse, Lyon**

**Dr. Stéphane PICARD,
Lactarium de Marmande**

Analyses bactériologiques du lait humain

Rappel Réglementation Lactariums (Afssaps)

- **Qualification biologique du lait maternel**
 - **Sous-Lots**
 - numération Flore totale aérobie : G.S. + incubation 24h à 37°C
 - **Lots avant pasteurisation**
 - numération *Staph. aureus* ($>10^4$ UFC/ml) : Chapman, 48h à 37°C
 - numération Flore totale aérobie ($>10^6$ UFC/ml) : G.S., 48h à 37°C
- **Contrôles biologiques après pasteurisation**
 - 0,5 ml de lait :ensemencé sur G.S. incubée 48h à 37°C
 - tout résultat positif ➡ destruction du lot de lait
 - étude des causes de contaminations répétées

Analyses bactériologiques du lait humain

Rappel Réglementation Lactariums (Afssaps)

- **Changements pour la qualification biologique**
 - **Sous-Lots** ➡ **incubation 24h** au lieu de 48h
 - pas de numération *Staph. aureus* sur milieu sélectif de Chapman
... *Staph. aureus* demeure dénombré via la Flore totale aérobie
 - **Lots avant pasteurisé°** : milieux & seuils inchangés
- **Changements pour contrôles après pasteurisé°**
 - **0,5 ml** de laitensemencé : **c'est 5 X plus** que 0,1 ml ...
 - donc ➡ **5 X plus de chance** d'identifier 1 bactérie
ayant résisté à la pasteurisation !

Contrôles bactériologiques du lait après pasteurisation



parfois *Bacillus spp* isolé

KEZAKO ???

Bactéries du genre *Bacillus*

- **Rappels épidémiologiques**

- *Bacillus cereus* $\neq$ B. non-cereus (peu pathogènes)
- bactérie du milieu extérieur , hôte = animal ++
- réservoirs / sources  dont humains
 - sol , selles , eaux
 - aliments crus (dont lait) , aliments transformés (dont dérivés lait)
 - parfois présent sur matériel considéré comme stérile

- **Rappels physio-pathologiques**

- *B. cereus* : pathogène opportuniste  intox° alimentaires
- ingestion d'aliments contaminés ($> 10^5$ germes / g)
 -  forme émétique (1-6 h. après) ou diarrhéique (6-24 h. après)
 -  immunodéprimé : bactériémie, endocardite, méningite, pneumonie

Bactéries du genre *Bacillus*

- **Caractères biologiques**
 - bacille gram positif , aérobie , grande taille , sporulé
 - spores : résistant à chaleur ($< 100^{\circ}\text{C}$) , dessiccation
 - selon les espèces
 - croissance [4°C et 60°C] ; psychrophilie (*B. insolitus*, *B. psychrophilus*)
 - production d' 1 toxine thermostable (*B. cereus*)
- **Sensibilité aux agents chimiques et physiques**
 - inactivé par exposition prolongée à :
 - glutaraldéhyde 2% ou hypochlorite de sodium 5%
 - spores détruits par :
 - température $> 100^{\circ}\text{C}$ pendant plus de 10 minutes
 - rayonnement ionisant de 540 krad

Bactéries du genre *Bacillus*

➡ production possible de :

– Toxine THERMOSTABLE = Céréulide

- Responsable de la forme émétique
- Résiste plus de 30 minutes à 121°C
- Toxine préformée dans l'aliment ingéré

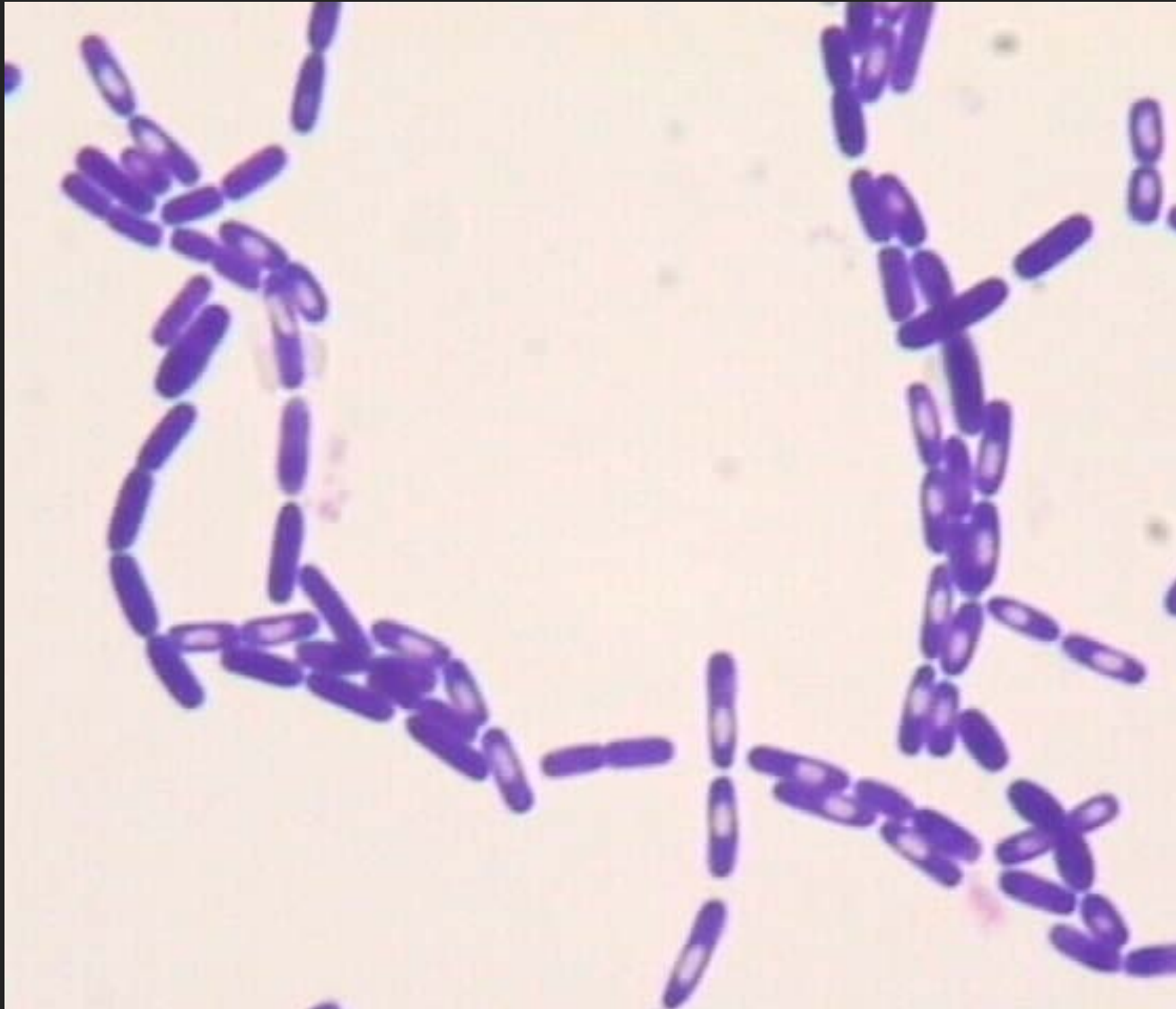
– Toxine THERMOLABILE

- Responsable de la forme diarrhéique
- Production dans le tube digestif à partir de bactéries présentes dans l'aliment

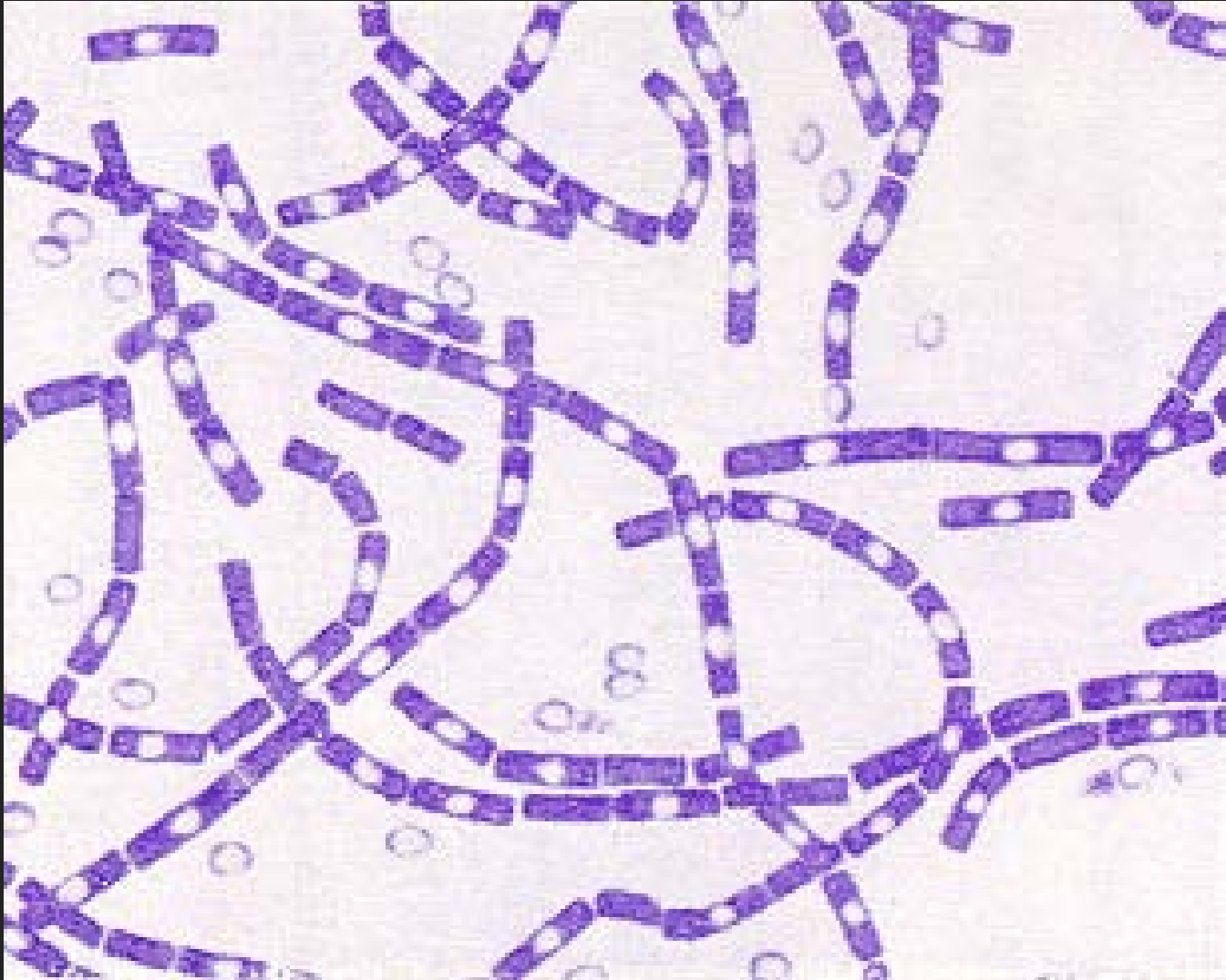
Toxines produites en taux significatif à partir de 10^5 UFC/g d'aliment

➡ = données adultes.... Quid des prématurés ???

***Bacillus cereus* – Coloration de Gram (M.O.)**



***Bacillus spp* – Coloration de Gram (M.O.)**



**Tableau I. Classification des espèces appartenant au genre
Bacillus selon Smith *et al* (70, 71)**

Groupe I : spore ovale non déformante

<i>B anthracis</i>	<i>B pumilus</i>	<i>B similibadius</i>
<i>B cereus</i>	<i>B subtilis</i>	<i>B firmus</i>
<i>B megaterium</i>	<i>B longisporus</i>	<i>B lentus</i>
<i>B coagulans</i>	<i>B thermodenitrificans</i>	<i>B nitrotollens</i>
<i>B licheniformis</i>	<i>B badius</i>	<i>B thuringiensis</i>

Groupe II : spore ovale déformante

<i>B polymyxa</i>	<i>B larvae</i>	<i>B racemilacticus</i>
<i>B macerans</i>	<i>B caldovelox</i>	<i>B alcalophilus</i>
<i>B circulans</i>	<i>B azotoformans</i>	<i>B caldolyticus</i>
<i>B brevis</i>	<i>B caldotenax</i>	<i>B fastidiosus</i>
<i>B laterosporus</i>	<i>B laevolacticus</i>	<i>B acidocaldarius</i>
<i>B alvei</i>	<i>B stearothermophilus</i>	

Groupe III : spore ronde déformante

<i>B sphaericus</i>
<i>B pasteurii</i>
<i>B pantothenicus</i>

Quelques caractères pour différencier *Bacillus cereus* des autres *Bacillus*

	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Aspect des colonies sur G.S. NON incubée sous CO2	Colonies en tête de méduse	Colonies blanches	Colonies rhizoïdes	Colonies blanches ou grisâtres
Hémolyse sur G.S. en 24 heures	-	+	faiblement positive	+
Mobilité	-	+	-	+
Sensibilité à la pénicilline	+	-	-	-
Acidification du glycérol	-	+	+	+

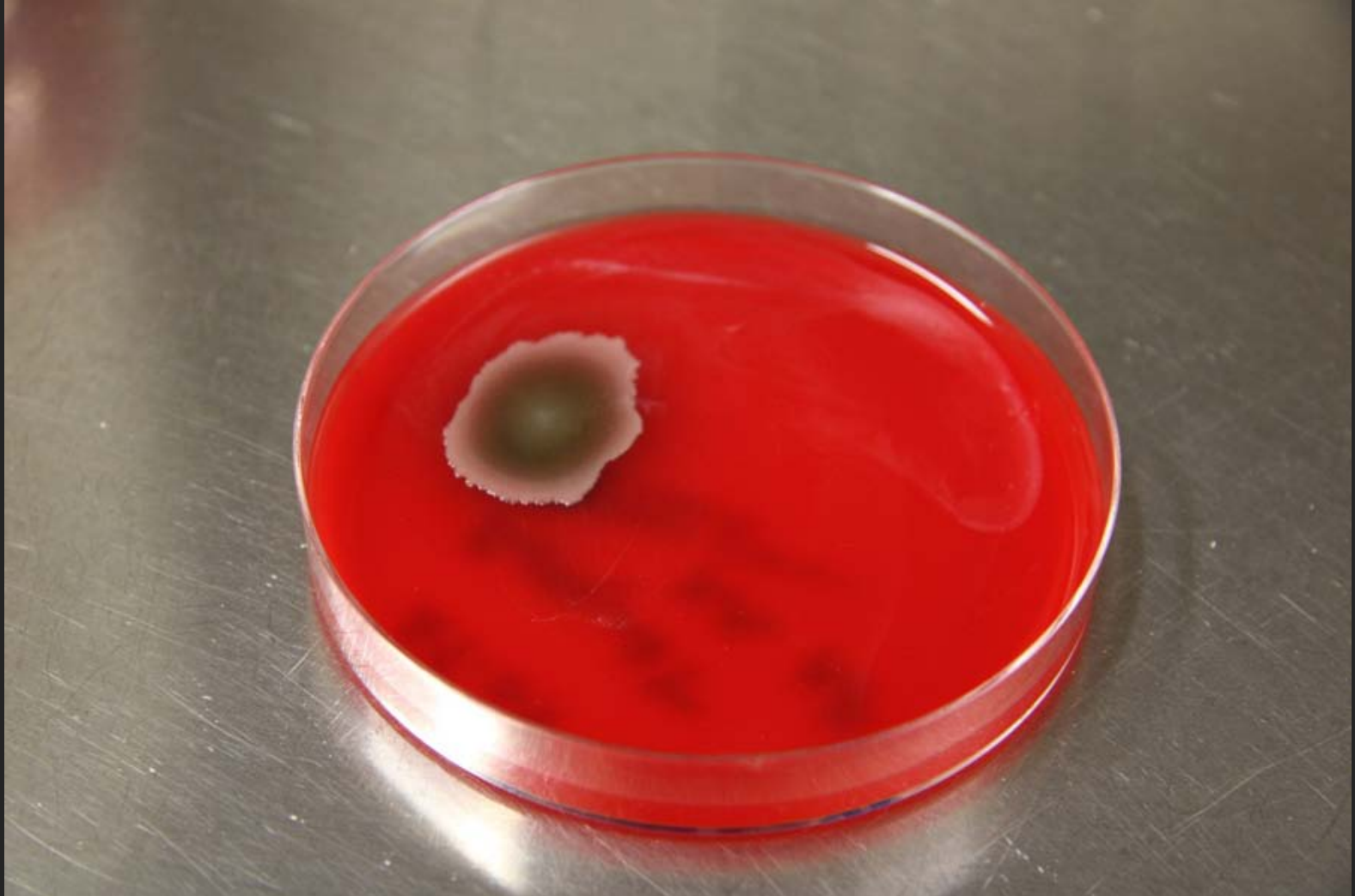
***Bacillus* isolés après pasteurisation**

- **Milieux d'isolement et identification**
 - culture et pousse facile sur gélose sang $\left\{ \begin{array}{l} - \text{aérobie} \\ - 37^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$
 - identification :
 - aspect microscopique : bacille gram + sporulé, croît en aérobiose
 - complété par le réisolement sur un milieu particulier :
 - ⇒ classique « gélose à l'œuf », milieu de Mossel ...
 - ⇒ nouveaux milieux sélectifs : BACARA® (AES-Chemunex)
 - éventuelle confirmation par galerie d'identification
(ex : galerie Api 50 CHB)
- ***Bacillus* et lait humain pasteurisé : possible ?**
 - Oui : isolement facile ⇒ destruction du lot de lait .
 - Non : jamais ?... conditions de culture & analyse ?...

***Bacillus* sur Gélose Sang**



***Bacillus* sur Gélose Sang**



***Bacillus* sur Gélose Sang**



Bacillus spp – Galerie Api 50CHB



Principe du milieu BACARA® (AES-Chemunex)

- ***Bacillus cereus* Rapid Agar (BACARA®)**
 - milieu sélectif pour identification & dénombrement des *Bacillus* du groupe *cereus*
 - réf : AFNOR NF EN ISO 7932 (Juillet 2005)
- **Principe technique de la Gélose BACARA®**
 - milieu chromogène : incubation 24h à 37°C
 - coloration rose–orangée / métabolisation du substrat chromogène
 - halo d'opacification entourant les colonies / activité phospholipase
 - milieu sélectif : mélange ATB & substances
 - mélange optimisé pour empêcher croissance d'autre flore
 - même pour matrices fortement contaminées en flore compétitive
- **Intérêt : sélectif + spécifique ➡ Ø test confirmation**

***Bacillus* sur milieu BACARA® (AES-Chemunex)**



Bactéries isolées après pasteurisation

Lots + après pasteurisation (2009)	Bacillus		Staph coag -	Entérobact	Autres
	cereus	non-cereus			
Marmande 7 % des lots (anonyme)	83 %	11 %	5 %	0 %	1 %
Lyon 3 % des lots (personnalisé)	53 % <i>Bacillus</i> (sans distinction)		37 %	0 %	10 %

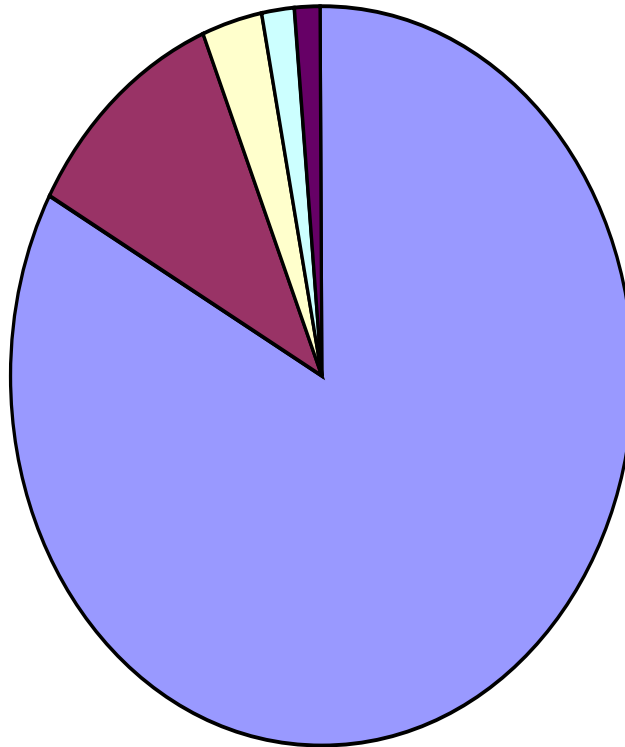
Conclusion

- **Contaminations répétées après pasteurisation**
 - **origine possible des bactéries**
 - à l'intérieur du lait avant collecte / transfert / traitement : lait cru ?
 - à l'extérieur du lait : environnement ?
 - **réaliser l'analyse détaillée des germes en cause**
 - **développer des mesures curatives & préventives**
visant à réduire et maîtriser ces contaminations
- **Attitude face aux *Bacillus* après pasteurisation**
 - **destruction du lot de lait**
 - y compris pour 1 colonie identifiée , même si...
...1 *Bacillus* / 0,5ml $\Rightarrow \approx 2$ *Bacillus* / g de lait $\Rightarrow \ll 10^5$ *Bacillus* / g
 - réglementation Afssaps + principe de précaution bébé prématuré !
 - **débat...**

Information quantitative sur les proportions de lait personnalisé (début 2009) :

- 500 à 700 Litres traités par mois soit 800 à 1000 lots par mois
- En moyenne 17% de lait jeté suite aux contrôles bactériologiques :
 - 11% pour *Staph. aureus* $\geq$ ou $= 10^4$ UFC/mL (60% du lait jeté)
 - 3% pour Flore totale aérobie $\geq$ ou $= 10^6$ UFC/mL (20% du lait jeté)
 - 3% pour contrôle + après pasteurisation (20% du lait jeté),
dont la moitié au moins par présence de *Bacillus* (10% du lait jeté)

Lait maternel personnalisé - Lyon 2009



□ LM délivré

■ jeté pour Staph aureus

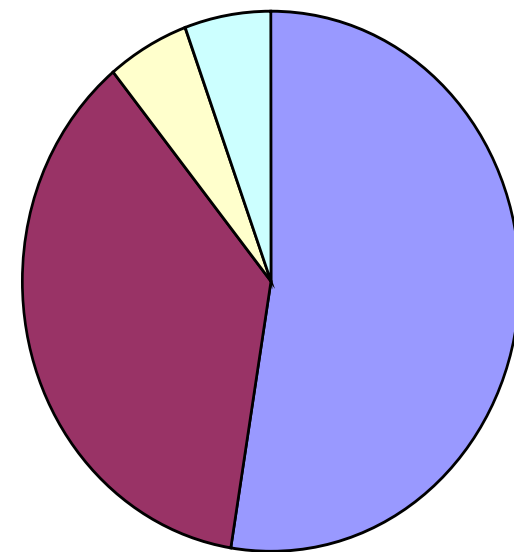
□ jeté pour flore totale
aérobie

□ jeté car positif après
pasteurisation hors
Bacillus

■ jeté car positif à Bacillus
après pasteurisation

Bactéries identifiées lors des contrôles positifs après pasteurisation (2007-2008) :

Bacillus spp		52.6%
Staphylocoques coagulase négative		36.6%
<i>Micrococcus spp.</i>	■	1.5%
<i>Corynebacterium spp.</i>	■	5.2%
<i>Leifsonia aquatica</i>	■	1%
<i>Streptococcus spp.</i>	■	1.5%
<i>Enterococcus spp.</i>	■	0.5%
<i>Pseudomonas spp.</i>	■	0.5%
<i>Microbacterium lacticum</i>	■	0.5%



**BACILLUS spp. =
Bactéries souvent
comme de simples contaminants ...**

PROBLEMATIQUE Bacillus spp.

MAIS

***Bacillus* du groupe *cereus* capable de produire
une TOXINE THERMOSTABLE (forme émétique)**

ET

**résistance à la pasteurisation (SPORES)
avec risque de production
d'une TOXIN THERMOLABILE (forme diarrhéique)**

SEUIL de bactérie à partir duquel
quantité de toxine produite considérée comme toxique ?????

10^4 UFC/g pour certains aliments*
... préma ????

