

ENTEROBACTER SAKAZAKII :

PRESENTATION DE L'ETUDE MENEES PAR L'AFSSA

(EVALUATION DU PROJET DE METHODE NORMALISEE FIL-ISO POUR LA DETECTION D'ENTEROBACTER SAKAZAKII DANS LES POUDRES DE LAIT ET PRODUITS DESHYDRATES POUR NOURRISSONS)

Résumé de l'intervention de Mme GNANOU-BESSE (AFSSA) lors de l'assemblée générale 2005

Enterobacter sakazakii est un bacille Gram-négatif, de la famille des Entérobactéries.

Il a été identifié comme agent pathogène dans de rares mais graves infections néonatales pouvant provoquer des méningites, septicémies ou entérocrites. C'est une maladie peu fréquente (quelques dizaines de cas depuis les années 60), mais avec un taux de létalité de 20 à 50%. Chez l'adulte, elle a très rarement provoqué des infections, même chez des individus présentant déjà des pathologies graves.

Dans la plupart des cas, la consommation de préparations lactées déshydratées pour nourrissons a été mise en cause. Un exemple assez récent en France est l'épisode de cas groupés d'infections néonatales dues à la contamination de produits déshydratés pour bébé en décembre 2004.

Largement répandue dans les environnements agroalimentaires et domestiques comme tous les coliformes, *E. sakazakii* est surtout recherchée dans les poudres de lait. Une étude canadienne montre que cette bactérie est présente dans 6,7% des poudres de lait, mais les taux de contamination sont en général très faibles, inférieurs à 1 UFC/100 g. La dose infectieuse étant supposée avoisiner les 1000 bactéries, un problème de préparation et de stockage des biberons peut sans doute être mis en cause dans les cas d'infections néonatales.

Un projet de norme pour la détection d'*E. sakazakii* dans les poudres de lait et produits déshydratés pour nourrissons a été proposé en 2004 à la FIL (voir figure 1). L'AFSSA LERQAP en tant que Laboratoire Communautaire de Référence pour le lait et les produits laitiers (Directive européenne 92/46) a décidé de tester cette méthode. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les performances de cette méthode et son applicabilité aux poudres de lait pour nourrissons, et de comparer différents milieux d'isolement disponibles. Les critères de performance suivants ont été étudiés : (i) inclusivité et exclusivité; (ii) limite de détection; (iii) performance de la méthode pour l'analyse de produits naturellement contaminés.

Pour l'étude d'inclusivité et d'exclusivité, 28 souches d'*E. sakazakii* et 16 souches d'Entérobactéries non-*E. sakazakii* ont été étudiées. Le protocole d'analyse complet a été suivi avec l'isolement sur 4 géloses: 3 milieux chromogènes, ESIATM (AES Laboratoires), DFITM (Oxoid, Dardilly, France), et ESIATM fabriqué dans notre laboratoire selon la formule précisée dans le projet de norme, et un milieu pour Entérobactéries, le VRBG.

Les résultats obtenus sont similaires pour tous les milieux chromogènes et identiques entre ESIATM prêt à l'emploi et préparé au laboratoire.

Concernant l'aspect des colonies obtenues sur ces milieux, la spécificité et la sensibilité sont bonnes, par contre la spécificité n'est que de 50% sur milieu VRBG. En effet, sur ce milieu toutes les colonies d'Entérobactéries apparaissent typiques.

Les performances de la méthode sont cependant altérées par l'étape de sélection des colonies par la production d'un pigment jaune après étalement et culture sur milieu non sélectif TSA. La sensibilité des 4 milieux testés diminue fortement après cette étape. En effet, certaines souches d'*E. sakazakii* (environ 20%) n'ont pas l'aspect typique de pigmentation jaune sur TSA.

Sur milieu chromogène, mais principalement sur DFITM, la définition de la couleur des colonies typiques devrait être élargie, car elle ne permet pas de détecter la totalité des souches d'*E. sakazakii* testées.

Afin d'évaluer la limite de détection, des échantillons de produits déshydratés pour bébé ont été testés à 3 niveaux de contamination allant de 5 UFC/100 g à 50 UFC/25 g, et en l'absence de contamination. Les analyses ont été répétées 6 fois par niveau, et 2 fois pour le blanc. La limite de détection a ainsi été déterminée pour 3 souches d'*E. sakazakii*.

Les résultats montrent des détections positives à tous les taux de contamination, sauf bien entendu pour les blancs, avec des résultats similaires pour les 4 milieux d'isolement testés.

Les limites de détection obtenues sont toutes inférieures à 10 UFC/100 g, la plus basse étant de 4 UFC/100 g.

Les analyses d'échantillons naturellement contaminés ont été réalisées à partir de 100 g sur 3 produits déshydratés pour nourrissons impliqués dans des infections néonatales, en suivant le protocole préconisé dans le projet de norme, et en testant les 4

milieux d'isolement incubés à 37°C et 44°C, températures préconisées respectivement pour DFITM et ESIATM. Dans tous les cas, *E. sakazakii* a été détecté. A noter, cependant, que sur milieu TSA des colonies pigmentées en jaune ou blanc ont été obtenues. Pour le milieu DFITM, une incubation à 44°C est moins performante, et la température préconisée par le fabricant reste préférable.

En conclusion, la méthode de détection d'*E. sakazakii* telle que décrite dans le projet de norme ISO/FIL, apparaît sensible et sélective, mais pourrait être améliorée moyennant quelques modifications :

- Elargir la définition des colonies typiques sur milieu chromogène
- Prendre en compte le problème posé par les souches non pigmentées qui sont apparues fréquemment dans notre étude. Une des solutions envisageables serait de repiquer la totalité des souches apparaissant typique sur milieu chromogène, et peut-être d'ajouter un test biochimique supplémentaire avant l'identification complète (activité Tween 80 estérase ?).

Dans cette méthode, la gélose DFITM pourrait être employée au même titre que la gélose ESIATM, ces deux milieux ayant montré des performances similaires. Le milieu VRBG a montré des performances relativement correctes du fait de la sélectivité de l'étape d'enrichissement liquide, et pourrait par conséquent être utilisé en complément d'un milieu chromogène.

Nous avons montré également dans cette étude que le milieu ESIATM préparé au laboratoire permettait d'obtenir des résultats équivalents à celui prêt à l'emploi.

Une étude complémentaire, basée sur l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons naturellement contaminés, est actuellement en cours de réalisation à l'AFSSA LERQAP.

Concernant l'évolution de la normalisation de cette méthode, un nouveau projet a été diffusé en août 2005 pour commentaires, avec comme modification principale une incubation du bouillon d'enrichissement à 44°C au lieu de 45°C dans la version précédente.

Figure: Projet de norme 2004 : ISO/DTS 22964 – FIL/DRM 210

