

**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON**

Année 2006 - Thèse n° 511.

**ENTEROBACTER SAKAZAKII :  
UN PATHOGENE EMERGENT EN SANTE  
PUBLIQUE ?**

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 29 Août 2006  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Marion GUST  
Née le 08 octobre 1983  
à Echirolles







**Directeur : Stéphane MARTINOT**

	PR EX	PR 1	PR 2	MC	Contractuel, Associé, IPAC et ISPV	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
<b>DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE</b>							
Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale	Y. RICHARD		A. KODJO	V. GUERIN-FAUBLEE D. GREZEL			
Pathologie infectieuse			A. LACHERETZ M. ARTOIS	J. VIALARD			
Parasitologie et Maladies Parasitaires	MC. CHAUVE	G. BOURDOISEAU		MP. CALLAIT CARDINAL L. ZENNER			
Qualité et Sécurité des Aliments		G. CHANTEGRELET	P. DEMONT C. VEROZY	A. GONTHIER S. COLARDELLE			
Législation et Jurisprudence			A. LACHERETZ				
Bio-Mathématiques				P. SABATIER ML. DELIGNETTE K. CHALVET-MONFRAY			
<b>DEPARTEMENT ANIMAUX DE COMPAGNIE</b>							
Anatomie		E. CHATELAIN	T. ROGER	S. SAWAYA			K. BENREDOUANE
Chirurgie et Anesthésiologie		JP. GENEVOIS	D. FAU E.VIGUIER D. REMY		G. CHANOIT (MCC) S. JUNOT (MCC) K. PORTIER (MCC) C. DECOSNE-JUNOT (MCC)	C.CAROZZO	N. GAY C. POUZOT
Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancérologie		JP. MAGNOL	C. FLEURY	T. MARCHAL	C. BOULOCHER (MCC)		
Hématologie		C. FOURNEL			D. WATRELOT-VIRIEUX (MCC) P. BELLI (MCA) D. PIN (MCA)		L. POUDEROUX
Médecine interne		JL. CADORE		L. CHABANNE F. PONCE	M. HUGONNARD (MCC)		I. BUBLOT C. ESCRIOU
Imagerie Médicale					J. SONET (MCC)		E. SEGARD
<b>DEPARTEMENT PRODUCTIONS ANIMALES</b>							
Zootchnie, Ethologie et Economie Rurale		M. FRANCK		L. MOUNIER			
Nutrition et Alimentation				D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON			
Biologie et Pathologie de Reproduction		F. BADINAND	M. RACHAIL-BRETIN	S. BUFF P. GUERIN	A. C. LEFRANC		
Pathologie Animaux de Production		P. BEZILLE	T. ALOGNINOVA	R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND			G. LESOBRE P. DEBARNOT D. LAURENT
<b>DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES</b>							
Physiologie/Thérapeutique				J.J. THIEBAULT J.M. BONNET-GARIN			
Biophysique/Biochimie		E. BENOIT F. GARNIER					
Génétique et Biologie moléculaire		G. KECK	F. GRAIN	V. LAMBERT			
Pharmacie/Toxicologie Législation du Médicament			P. JAUSSAUD P. BERNY	T. BURONFOSSE			
Langues					C. FARMER R. SULLIVAN		
<b>DEPARTEMENT HIPPIQUE</b>							
Pathologie équine		JL. CADORE		A. LEBLOND	M. GLANGL		E. MOREAU
Clinique équine		O. LEPAGE		A. BENAMOU-SMITH			
Expertise nécropsique			G. FLEURY				



---

## REMERCIEMENTS

---

A Monsieur le Professeur ETIENNE,  
De la faculté de médecine de Lyon,  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Hommages respectueux.

A Madame le Professeur VERNIZY,  
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,  
Qui nous a confié ce sujet,  
Qu'il trouve ici l'expression de la reconnaissance et du respect que nous lui portons.

A Monsieur le Docteur BURONFOSSE,  
Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,  
Qui a accepté de participer au jury,  
Nous a aidé et soutenu dans toutes les circonstances,  
Hommages respectueux.



---

## REMERCIEMENTS PERSONNELS

---

Exercice difficile, qui va forcément en laisser de côté. Toutes mes excuses d'avance, il n'y a aucune malice, que de la maladresse.  
A ceux que je vais oublier.

A mes parents qui m'ont permis de rentrer à l'École.

A mon Pépé et ma Mémé qui sont toujours là, quoi qu'il arrive. Merci à vous, je vous aime.

A Renaud et Lucile, pour notre enfance.

A mes amis véto : Charlotte, Jess, Pascal, Agnès, Marie, Aline...

A ceux de l'ENGREF avec qui j'ai redécouvert l'insouciance : Clément(s), Dju, Claire, Cat, Manue, les Affreux, Eléonore...

Aux PAGAY pour leur amitié, leur gentillesse.

A la famille DURAND, je n'ai pas de mots pour vous exprimer ma reconnaissance.

A Françoise, ma marraine.

A ceux de l'École vétérinaire qui m'ont soutenue et qui m'ont permis de trouver ma voie : Thierry BURONFOSSE, Sylvie COLARDELLE, Dominique PORTAL, Christine VERNOZY... et les autres.

A tous ceux qui ont été là dans les moments difficiles. Ils se reconnaîtront. Merci à vous, je vous dois une fière chandelle.

Je vous souhaite bien du bonheur à tous (et accessoirement, bonne lecture) !



## SOMMAIRE

<b>Sommaire</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>10</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>12</b>
<b>I - <i>Enterobacter sakazakii</i> : analyse bactériologique</b> .....	<b>13</b>
<b>A / découverte et taxonomie</b> .....	<b>13</b>
1. Découverte .....	13
2. Taxinomie .....	13
a Position au sein de la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	13
$\alpha$ Hybridation des ADN .....	13
$\beta$ Séquençage de l'ADN ribosomal 16S .....	14
$\chi$ Séquençage de gènes de ménage (hsp60, rpoB, hemB) .....	14
b Hétérogénéité taxinomique .....	14
3. Nom .....	15
<b>B / Principales caractéristiques</b> .....	<b>16</b>
1. Description .....	16
a Souche type .....	16
b Morphologie.....	16
c Production d'un pigment jaune.....	16
d Caractères biochimiques .....	16
$\alpha$ Fermentation de sucres et de polyalcools .....	16
$\beta$ Voie métabolique dans la fermentation des hexoses .....	17
$\chi$ Recherche d'un métabolite terminal.....	18
$\delta$ Recherche d'enzymes .....	19
$\epsilon$ Etude de la croissance en milieu minimal .....	22
$\phi$ Aptitude à cultiver en présence d'un inhibiteur.....	22
e Typage .....	22
$\alpha$ Biogroupes .....	22
$\beta$ Zymotype.....	23
$\chi$ Profils plasmidiques .....	24
$\delta$ Analyse de la restriction chromosomique par endonucléase.....	24
$\epsilon$ Ribotypage .....	24
$\phi$ Electrophorèse en champ pulsé (PFGE) .....	24
$\gamma$ Amplification aléatoire d'ADN polymorphique (RAPD).....	25
$\eta$ Analyse des espaces intergéniques tARN par PCR (tADN-PCR).....	25
2. Caractéristiques de croissance .....	26
a Milieu de croissance et morphologie .....	26
$\alpha$ Gélose de Tryptone de Soja.....	26
$\beta$ Gélose nutritive.....	26
$\chi$ Bouillon.....	26
b Température et croissance.....	26
$\alpha$ Températures limites de croissance.....	26
$\beta$ Température optimale de croissance .....	27
$\chi$ Vitesse de croissance.....	27
c Anaérobiose.....	29

3.	Différenciation d'avec les autres <i>Enterobacter</i> .....	29
<b>C /</b>	<b>Sensibilité.....</b>	<b>31</b>
1.	Sensibilité aux antibiotiques.....	31
a	Sensibilité aux antibiotiques d' <i>E. sakazakii</i> comparé à d'autres <i>Enterobacteriaceae</i> ....	31
b	Evolution des résistances aux antibiotiques dans le temps.....	33
α	Antibiogramme des souches isolée lors des crise .....	33
β	Mécanismes d'apparition des résistances .....	36
2.	Sensibilité aux désinfectants.....	36
3.	Inactivation par des moyens physiques .....	36
a	Traitement thermique.....	36
α	Thermotolérance relative.....	37
β	Valeurs D.....	37
χ	Valeur z .....	38
δ	Pasteurisation .....	39
b	Inactivation par les micro-ondes.....	40
c	Ionisation.....	40
d	Dessiccation .....	40
e	Stress osmotique.....	40
f	Monocaprylin.....	41
4.	Survie dans l'environnement et les aliments .....	41
<b>D /</b>	<b>Méthodes de détection.....</b>	<b>43</b>
1.	Techniques pour la détection d' <i>E. sakazakii</i> dans tous les milieux.....	43
a	Technique recommandée par la FDA (2002a).....	43
α	Pré-enrichissement : .....	43
β	Enrichissement : .....	44
χ	Sélection : .....	44
δ	Identification : .....	44
ε	Dénombrement : .....	45
φ	Limites.....	45
b	Isolement d' <i>E. sakazakii</i> par des milieux sélectifs.....	45
α	Marqueurs de l'α-glucosidase .....	45
β	Milieu OK (Oh et Kang, 2004) .....	46
χ	Milieu DFI (Iversen et al., 2004a).....	46
c	Méthode moléculaire .....	47
α	Conditions de réaction PCR.....	47
β	Validité de la méthode.....	48
2.	Dans l'environnement.....	48
a	Mise en évidence du pigment jaune et de l'α-glucosidase .....	48
α	Détection .....	48
β	Identification.....	48
χ	Validité de la méthode.....	49
b	Méthode basée sur l'enrichissement sélectif sur bouillon de tryptone au lauryl sulfate (Guillaume-Gentil <i>et al.</i> 2005).....	49
α	Principe .....	49
β	Résultats .....	50
3.	Dans les aliments.....	50
a	Méthode utilisée par Muytjens <i>et al.</i> (1988).....	50
b	Mise en évidence de l'α-glucosidase .....	50
α	Détection des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	50
β	Isolement d' <i>E. sakazakii</i> .....	51
χ	Confirmation de l'espèce bactérienne.....	51
c	Méthodes PCR.....	51
α	PCR et fluorescence (Direction Santé Canada).....	51
β	PCR en temps réel.....	52
4.	Evolutions des méthodes.....	55
5.	Comparaison de différentes méthodes pour la récupération de bactéries stressées.....	56

<b>II - Pathologie liée à <i>Enterobacter sakazakii</i></b> .....	<b>58</b>
<b>A / Physiopathologie</b> .....	<b>58</b>
1. Pathogénie.....	58
a Méningite .....	58
$\alpha$ Description du cas.....	58
$\beta$ Mise en évidence de la pathogénie.....	59
b Entérococolite nécrosante.....	59
2. Facteurs de virulence .....	59
a Capsule.....	59
b Facteurs d'adhésion .....	60
$\alpha$ Type d'adhésion.....	60
$\beta$ Matrice extra-cellulaire.....	60
$\chi$ Frimbriae .....	61
$\delta$ Formation de biofilm.....	61
c Entérotoxine .....	62
$\alpha$ Présence .....	62
$\beta$ Toxicité.....	62
d Molécules de signalment cellulaire.....	62
e Autres facteurs de virulence .....	62
f Régulation des facteurs de virulence .....	63
<b>B / Manifestations cliniques</b> .....	<b>64</b>
1. Symptômes.....	64
a Chez les nouveaux-nés et nourrissons : .....	64
$\alpha$ Infections confirmées .....	64
$\beta$ Infection suspectée.....	68
$\chi$ Colonisation digestive .....	69
$\delta$ Taux de mortalité et de morbidité.....	69
$\epsilon$ Séquelles .....	69
b Chez les enfants : .....	70
$\alpha$ Méningite .....	70
$\beta$ Appendicite.....	70
$\chi$ Ostéomyélite.....	70
$\delta$ Septicémie.....	70
$\epsilon$ Colonisation d'un cathéter .....	71
c Chez les adultes : .....	71
$\alpha$ Septicémie .....	71
$\beta$ Pneumonie .....	71
$\chi$ Plaies.....	72
$\delta$ Infection vaginale.....	72
2. Lésions.....	73
a Lésions macroscopiques:.....	73
b Lésions microscopiques: .....	73
<b>C / Diagnostic</b> .....	<b>77</b>
1. Epidémiologique.....	77
2. Clinique.....	77
3. Expérimental .....	77
a Biologique.....	77
b Imagerie médicale .....	77
<b>D / Premiers soins et traitement</b> .....	<b>78</b>
1. Réanimation .....	78
2. Traitement de l'infection.....	78
3. Traitement des convulsions.....	79
<b>E / Immunisation naturelle</b> .....	<b>79</b>
<b>F / Vaccination</b> .....	<b>79</b>

<b>G /</b>	<b>Utilisation de peptides naturels aux propriétés antibactérienne.....</b>	<b>79</b>
<b>III -</b>	<b><i>Epidémiologie des infections liées à Enterobacter sakazakii.....</i></b>	<b>80</b>
<b>A /</b>	<b>Statut épidémiologique.....</b>	<b>80</b>
1.	Fréquence.....	80
a	Fréquence mondiale.....	80
b	Fréquence à l'échelle de pays.....	80
2.	Répartition géographique.....	81
3.	Population concernée.....	81
<b>B /</b>	<b>Réservoir .....</b>	<b>82</b>
1.	<i>Anastrepha ludens</i> .....	82
2.	<i>Stomoxys calcitrans</i> .....	82
3.	<i>Musca domestica</i> .....	82
4.	Réservoir naturel.....	82
<b>C /</b>	<b>Source et mode de transmission.....</b>	<b>84</b>
1.	Sources d' <i>E. sakazakii</i> .....	84
a	Environnement .....	84
b	Aliments.....	84
α	Poudres de lait .....	84
β	Autre aliments.....	86
c	Clinique.....	87
2.	Mode de transmission .....	90
a	Aérosols .....	90
b	Passage dans la filière pelvienne .....	90
c	Infections croisées .....	91
d	Contact.....	91
e	Blessure.....	91
f	Alimentaire.....	91
α	Poudre de lait pour nourrissons.....	91
β	Contamination croisée d'aliments.....	95
<b>D /</b>	<b>Période d'incubation et dose infectieuse.....</b>	<b>97</b>
1.	Période d'incubation .....	97
2.	Dose infectieuse et dose réponse .....	97
a	Chez la souris .....	97
b	Chez les nourrissons.....	97
α	Dose infectieuse de 1000 bactéries .....	97
β	Limites du modèle.....	98
<b>E /</b>	<b>Dissémination .....</b>	<b>100</b>
1.	Contamination des préparation pour nourrissons en poudre.....	100
a	Contamination à l'usine .....	100
b	Site de contamination dans l'usine .....	100
2.	Manipulation et conservation des poudres de lait (Decisionalysis Risk Consultant Inc., 2004).....	100
a	Suppositions préliminaires .....	100
b	Conservation au froid.....	101
α	Risque relatif .....	101
β	Conclusion.....	101
c	Influence de la température du liquide de réhydratation lors de conservation réfrigérée ...	102
d	Conservation à température ambiante.....	103
<b>F /</b>	<b>Emergence et évaluation du risque .....</b>	<b>105</b>
1.	<i>E. sakazakii</i> : un pathogène émergent .....	105
a	Notion d'émergence.....	105
α	Définition .....	105

β	Commentaire.....	105
χ	Dans le cas d'E. sakazakii.....	105
b	Facteurs d'émergence .....	106
α	Méthodes de détection.....	107
β	Population sensible.....	107
χ	Utilisation de préparation en poudre pour nourrissons .....	108
2.	Evaluation du risque .....	109
a	Objectif .....	109
b	Considérations préliminaires.....	109
c	Eléments clé de l'évaluation du risque <i>E. sakazakii</i> .....	109
α	Concernant les préparations de poudre de lait .....	109
β	Facteurs de réduction du risque.....	109
χ	Contrôle de la contamination .....	109
δ	Nombre de mesures de contrôle .....	110
ε	Connaissance du pathogène .....	110

#### **IV - Prévention des infections à *Enterobacter sakazakii* .....112**

<b>A /</b>	<b>Mesures applicables par les industriels .....</b>	<b>112</b>
1.	Contrôle des étapes de fabrication .....	112
a	Etape de contamination.....	112
b	Présence dans l'environnement.....	112
α	Application de bonnes pratiques industrielles et hygiéniques.....	112
β	Séparation de l'usine en zones .....	113
χ	Contrôle de l'humidité.....	113
δ	Limites.....	113
2.	Matières premières.....	113
3.	Personnel.....	113
4.	Produits finis .....	113
5.	Contrôle de l'efficacité des mesures .....	114
<b>B /</b>	<b>Préparation et conservation des biberons.....</b>	<b>115</b>
1.	Réglementation portant sur l'hygiène, la préparation et la distribution des repas en collectivités.....	115
a	Dispositions relatives à l'hygiène générale des denrées.....	115
b	Dispositions relatives aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite, aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS) et aux substances ajoutées dans les biberons .....	116
c	Les principes HACCP.....	116
d	Les guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP.....	116
e	Les contraintes réglementaires .....	117
α	Autocontrôles .....	117
β	Dispositions relatives au personnel .....	117
χ	Echantillonnage des plats témoins.....	117
f	Recommandations de l'Afssa.....	117
2.	Locaux, équipements (infrastructures, nettoyage, désinfection) et personnels.....	117
a	Locaux et équipements.....	118
α	Biberonnerie : généralités.....	118
β	La biberonnerie : un secteur à adapter au type de structure .....	118
χ	Entretien du matériel .....	122
δ	Entretien des locaux (Coterehos, 1997) .....	124
b	Personnels.....	125
α	Qualification.....	125
β	Tenue vestimentaire (Turck et al., 2005).....	125
c	Cas particulier du domicile (Turck et al., 2005).....	126
α	Préparation du biberon .....	126
β	Conservation .....	126
χ	Nettoyage et désinfection .....	126

3.	Préparation des biberons .....	127
a	Conséquences nutritionnelles des traitements thermiques des préparations lactées.....	127
α	Introduction .....	127
β	Traitements thermiques des préparations lactées .....	127
χ	Effets des traitements thermiques (Turck et al., 2005) .....	128
δ	Recommandations .....	130
b	Laits de femme ou de mère .....	132
α	Risque d'infection à <i>E. sakazakii</i> .....	132
β	Devenir du lait .....	132
χ	Lait provenant du domicile (Turck et al., 2005).....	133
δ	Lait provenant de lactarium .....	136
ε	En cas de réchauffement .....	136
c	Eau.....	136
α	Recommandations au domicile.....	136
β	Recommandations dans les structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants) et en unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés) (C) .....	137
χ	Recommandations en établissements de santé, centres thérapeutiques, pouponnières, avec une unité centralisée de préparation des biberons (H).....	138
d	Reconstitution et traçabilité du biberon en dehors du domicile .....	139
α	Reconstitution.....	139
β	Traçabilité.....	142
e	Refroidissement, conservation et transport du biberon .....	142
α	Température du liquide de réhydratation.....	143
β	Conduite à tenir après la reconstitution du biberon .....	143
χ	Conservation.....	143
δ	Transport.....	144
f	Consommation du biberon.....	144
α	Conduite à tenir.....	144
β	En cas de réchauffement.....	144
χ	Technique de réchauffement.....	145
g	Alimentation entérale avec du lait de femme et/ou des préparations lactées (non conditionnées sous une forme prête à l'emploi).....	145
α	Définition de l'alimentation entérale.....	145
β	Recommandations sur le système nutritif .....	145
4.	Conduite à tenir en cas d'infections à <i>E. sakazakii</i> .....	146
a	En France .....	146
b	Aux Etats-Unis .....	147
<b>C/</b>	<b>axes de recherche.....</b>	<b>148</b>
1.	Typage et méthode de détection .....	148
2.	Pathogénie et facteurs de virulence.....	148
a	Pathogénie.....	148
b	Facteurs de virulence .....	148
3.	Contrôle de la contamination des poudres de lait .....	149
a	Elimination du pathogène des poudres.....	149
b	Condition de croissance et de survie.....	149
c	Mesures d'élimination chimique.....	149
4.	Maîtrise sanitaire .....	149
	<b>Conclusion .....</b>	<b>150</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>151</b>
	<b>Annexe A : Description des cas d'infection à <i>Enterobacter sakazakii</i> recensés</b>	<b>161</b>
	<b>Annexe B : Fiche de synthèse pour le domicile.....</b>	<b>206</b>
	<b>Annexe C : Avis de l'Afssa relatif à la fixation de qualité des eaux.....</b>	<b>208</b>
	<b>Annexe D : Références législatives utilisées ou citées .....</b>	<b>213</b>

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

ATCC : American Type Culture Collection

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

ECN : Entérocolite Nécosante

InVS : Institut de Veille Sanitaire

kb : kilobases

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed Gel Electrophoresis : électrophorèse en champ pulsé

PNN : PolyNucléaires Neutrophiles

RAPD : Amplification Aléatoire d'ADN Polymorphique

SDR : Syndrome de Détresse Respiratoire

VRBG : gélose Glucosée Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre

VRBL : gélose Lactosée Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Fermentation des sucres et des polyalcools par <i>E. sakazakii</i> d'après Farmer <i>et al.</i> (1980).....	17
Tableau 2: Caractéristiques biochimiques d' <i>E. sakazakii</i> concernant la production d'un métabolite terminal (d'après Farmer <i>et al.</i> , 1980).....	19
Tableau 3: Caractéristiques enzymatiques d' <i>E. sakazakii</i> .....	21
Tableau 4: croissance en milieu minimal d' <i>E. sakazakii</i> , d'après Farmer <i>et al.</i> (1980).....	22
Tableau 5: Caractérisation des 15 biogroupes reconnus dans les 57 souches étudiées par Farmer <i>et al.</i> (1980) .....	22
Tableau 6: Différenciation dans le genre <i>Enterobacter</i> d'après Farmer <i>et al.</i> (1980), Aldova <i>et al.</i> (1983), Muytjens <i>et al.</i> (1984), Farmer <i>et al.</i> (1985).....	29
Tableau 7: Sensibilité aux antibiotiques d' <i>E. sakazakii</i> comparé à d'autres <i>Enterobacter</i> d'après Muytjens et Van Der Ros-Van De Repe (1986).....	32
Tableau 8: Evolution des résistances aux antibiotiques d' <i>E. sakazakii</i> .....	34
Tableau 9: valeurs de D(min) ± écart-type pour <i>Enterobacter sakazakii</i> dans les formules en poudre reconstituées pour enfants, Nazarowec-White et Farber (1997a).....	37
Tableau 10: valeurs de D (minutes) ± écart-type pour <i>E. sakazakii</i> dans les formules en poudre reconstituées (Iversen <i>et al.</i> , 2004b).....	38
Tableau 11: Valeurs D (minutes) à 58°C et z données dans la littérature.....	39
Tableau 12: Amorces et sonde de la méthode PCR de Seo et Brackett (2005).....	52
Tableau 13: Amorces et sonde de la méthode de Liu <i>et al.</i> (2006a) utilisant la sonde TaqMan .....	54
Tableau 14: Amorces de la méthode au vert SYBR de Liu <i>et al.</i> (2006a) .....	54
Tableau 15: Récapitulatif de toutes le méthodes de détection.....	57
Tableau 16: Tableau récapitulatif de toutes les crises chez les enfants et nouveau-nés dues à <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	74
Tableau 17: Récapitulatif des infections chez les adultes dues à <i>Entrobacter sakazakii</i> .....	75
Tableau 18: Contamination des poudres de lait par <i>E. sakazakii</i> et les <i>Enterobacteriaceae</i> .....	86
Tableau 19: Sources d' <i>Enterobacter sakazakii</i> d'après la littérature .....	88
Tableau 20: Comparaison des durées nécessaires pour atteindre la dose infectieuse de Iversen et Forsythe (2003) et Havelaar et Zwietering (2004).....	99
Tableau 21: Risque relatif d'infection par <i>E. sakazakii</i> suivant la durée et la température de réfrigération .....	101
Tableau 22: Risque relatif d'une infection par <i>E. Sakazakii</i> résultant d'une conservation à 6°C pour différentes durées, avec une température du liquide de réhydratation variable.....	102
Tableau 23: Durées pendant lesquelles les préparations reconstituées seront à des températures données .....	103
Tableau 24: Risque relatif lors de conservation à température ambiante pour 1 à 10 heures .....	103
Tableau 25: Traitement thermique des laits en poudres et laits liquides pour nourrissons d'après Turck <i>et al.</i> (2005) .....	128

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Courbe de croissance d' <i>E. sakazakii</i> d'après Iversen <i>et al.</i> (2004b).....	27
Figure 2: Erlenmeyer de gauche non mixé, de droite mixé (FDA, 2002) .....	43
Figure 3 : Gélose VRBG, les colonies typiques sont violettes, entourées par un halo violet d'acides biliaires précipités (FDA, 2002).....	44
Figure 4: Gélose de Tryptone de Soja, les colonies typiques sont pigmentées en jaune après 48-72 heures d'incubation à 25°C (FDA, 2002) .....	45
Figure 5 : Adhésion étroite entre <i>E. sakazakii</i> et la membrane d'une cellule de mammifère (microscopie électronique issue de Mange <i>et al.</i> , 2006).....	60
Figure 6 : Adhésion d' <i>E. sakazakii</i> aux cellules HBMEC sous forme d'agglomérats (microscopie optique, d'après Mange <i>et al.</i> (2006).....	61
Figure 7 : Suspicion d'infarctus cérébral du à <i>E. sakazakii</i> (Willis et Robinson, 1988).....	65
Figure 8 : Evolution d'une suspicion d'infarctus cérébral du à <i>E. sakazakii</i> (Gallagher et Ball, 1991). La partie 1 correspond au scanner montrant l'atténuation à droite et surtout à gauche, et la partie 2 montre le renforcement autour de la lésion .....	66
Figure 9 : Abscess cérébral causé par <i>E. sakazakii</i> (Burdette et Santos, 2000). Les parties 1a et 1b sont des scanners sans et avec produits de contraste, et la partie 2 est un IRM.....	67
Figure 10 : Ostéomyélite due à <i>E. sakazakii</i> et <i>Serratia liquefaciens</i> (Murray <i>et al.</i> , 1990).....	70
Figure 11: Nombre d'infections néonatales à <i>E. sakazakii</i> par an depuis 1958.....	106

---

## INTRODUCTION

---

Les premiers cas d'infections néonatales causées par *Enterobacter sakazakii* ont eu lieu en 1958, en Angleterre (Urmenyi et Franklin, 1961). La bactérie en cause était alors inconnue et fut décrite comme étant une souche atypique d'*Enterobacter cloacae* pigmentée en jaune. Les deux nouveaux-nés ont souffert de méningite et sont décédés. En 1965, Joker *et al.* ont décrit un autre cas de méningite causé par cette même bactérie atypique. Le nourrisson a survécu, mais a souffert de retards mentaux et locomoteurs importants.

En 1980, Farmer *et al.* identifient et nomment cette bactérie pour la première fois. *E. sakazakii* est une espèce à part entière et se différencie d'*E. cloacae*.

Les infections dues à *E. sakazakii* sont rares, mais très graves avec un taux de mortalité élevé et des séquelles importantes. Les symptômes principaux sont les méningites, les septicémies, les entérocolites nécrosantes, ou encore les cas de colonisation digestive.

Les causes les plus fréquentes de méningites néonatales sont *Escherichia coli* et les Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques du groupe B (*Streptococcus agalactiae*), puisque ces bactéries sont isolées dans 50 à 75% des cas. Dans le reste des cas, beaucoup de bactéries peuvent être mises en cause, notamment les *Enterobacteriaceae* (Muytjens *et al.*, 1983).

Les infections touchent principalement les nouveaux-nés prématurés de faible poids à la naissance. En effet, les *Enterobacter* sont responsables d'environ 50% des infections nosocomiales, la plupart chez des individus déjà malades (Leclerc *et al.*, 2001).

Pendant longtemps, la source et le mode de transmission d'*E. sakazakii* sont restés inconnus. A partir du milieu des années quatre-vingt, la bactérie a été isolée dans des poudres de lait. Par la suite, un mode de transmission alimentaire par les préparations en poudre de lait pour nourrissons a été suspecté puis mis en évidence à plusieurs reprises. En effet ces préparations ne sont pas stériles.

Les microorganismes et les toxines microbiennes d'intérêt médical dans les préparations de poudre de lait pour nourrissons, et l'évidence de la relation causale entre leur présence dans la poudre de lait et les maladies causées ont été classés en trois catégories par la FAO. Ainsi, *E. sakazakii* est dans la catégorie A (lien de causalité avéré), qui comprend également *Salmonella enterica*. C'est donc un pathogène majeur chez les nourrissons (FAO, 2005).

L'écologie, les facteurs de virulence, la pathogénie des infections, les sources de contamination, et encore beaucoup d'autres éléments restent inconnus chez cette bactérie nouvellement apparue.

## I - ENTEROBACTER SAKAZAKII : ANALYSE BACTERIOLOGIQUE

### A / DECOUVERTE ET TAXONOMIE

#### 1. Découverte

En 1961, Urmenyi et Franklin ont décrit pour la première fois deux cas de méningites néonatales dues à une souche pigmentée en jaune d'*Enterobacter cloacae*, isolée sur gélose nutritive à 30°C. En 1965, Joker *et al.*, décrivent un nouveau cas de méningite néonatale due à cette même bactérie. En 1980, Farmer *et al.* nomment cette nouvelle bactérie *Enterobacter sakazakii*. Ils décident de relier ce micro-organisme à la famille des *Enterobacteriaceae* en se basant sur le pourcentage d'homologie en hybridation ADN-ADN, et secondairement sur la ressemblance phénotypique.

#### 2. Taxinomie

##### a Position au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* se définissent comme étant des bacilles à Gram négatif, mobiles, au moyen d'une ciliature péritriche, ou immobiles, non sporulés. Ces bacilles sont aérobies ou anaérobies facultatifs, se cultivent sur des milieux ordinaires à base d'extrait de viande, dégradent le glucose par un métabolisme fermentatif, avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites (sauf exception). Les bactéries sont oxydase négative et possèdent une catalase.

Il y a actuellement plus de 30 genres et 100 espèces connus dans cette famille (Le Minor et Richard, 1993).

Parmi ces 30 genres, on trouve notamment le genre *Enterobacter*, dont dépend l'espèce *Enterobacter sakazakii*. La taxinomie est actuellement essentiellement basée sur des techniques de biologie moléculaire.

##### $\alpha$ Hybridation des ADN

Farmer *et al.* (1980) ont étudié 57 souches de variants colorés en jaune d'*E. cloacae* pour déterminer à quelle espèce elles appartiennent, ou si elles forment une espèce à part entière.

La souche type d'*E. sakazakii* (ATCC 29544) est apparentée, par hybridation des ADN, entre 83 et 89% aux 56 autres souches de l'espèce. Il est admis qu'au sein d'une même espèce le l'homologie ADN/ADN est de 70% au minimum (voire 60%), et que l'on a à faire à deux espèces distinctes lorsque l'homologie entre les deux germes est inférieure 70%. Cependant, en se basant exclusivement sur cette méthode, il est difficile d'apparenter ces souches à *Enterobacter* ou à *Citrobacter*. En effet, les 57 souches de Farmer *et al.* (1980) sont apparentées respectivement à 53 et 54% à *C. freundii* et *E. cloacae*. En prenant la souche type d'*E. sakazakii*, on obtient *E. cloacae* (51%) plus apparenté que *C. freundii* (41%).

Cette différence d'hybridation ADN-ADN, ainsi que les différences phénotypiques décrites ultérieurement, sont à la base de la création d'une nouvelle espèce d'*Enterobacter*, plutôt qu'un sous-groupe phénotypiquement distinct au sein de l'espèce *E. cloacae*.

Cette technique d'hybridation des ADN a été la première utilisée et est à l'origine de la création de la nouvelle espèce. Depuis, d'autres méthodes moléculaires ont été utilisées pour déterminer les degrés d'apparenté existants entre les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae*.

### $\beta$ Séquençage de l'ADN ribosomal 16S

En se basant sur la comparaison des séquences du gène codant l'ARN ribosomal 16S, la souche type d'*E. sakazakii* est plus proche de *Citrobacter koseri* (97,8% de similitude) que de toute autre espèce des *Enterobacteriaceae*. *E. cloacae* est apparenté à 97,0% et *C. freundii* à 96,0% par cette méthode (Iversen *et al.*, 2004c).

### $\chi$ Séquençage de gènes de ménage (*hsp60*, *rpoB*, *hemB*)

Hoffmann et Roggenkamp (2003) ont réalisé une étude phylogénique d'*E. cloacae*, et ont déterminé que l'utilisation du séquençage des gènes *hsp60*, *rpoB* et *hemB* permet une analyse phylogénique précise. Toutefois, ils n'ont pas appliqué cette analyse à *E. sakazakii*.

## **b Hétérogénéité taxinomique**

Des hétérogénéités taxinomiques ont été mises en évidence lors de différentes études.

Ainsi, certains ont trouvé que deux lignées phylogéniques d'*E. sakazakii* existaient, lors de la mise au point d'une méthode de diagnostic PCR par amplification du gène codant l'ARN 16S. L'impact de la seconde lignée au sein des espèces d'*E. sakazakii* sur les aspects cliniques et de sécurité alimentaires ne sont pas connus et nécessiteraient d'être évalués (Lehner *et al.*, 2004a).

Iversen *et al.* (2004c) ont mis en évidence une forte hétérogénéité taxinomique au sein de l'espèce. Ils ont comparé 126 souches d'*E. sakazakii* en se basant sur la séquence du gène codant l'ARN ribosomal 16S à celles des souches types d'espèces d'*Enterobacter* et de *Citrobacter freundii*.

L'analyse basée sur l'ARN 16S a divisé les souches d'*E. sakazakii* en quatre groupes. La majorité des souches (110) sont dans le groupe 1, avec 0,1 à 1,2% de différence avec la souche type. Neuf souches présentent 1,6 à 1,9% de différence avec la souche type et forment le groupe 2. Le groupe 3 contient 5 souches, qui, bien qu'elles soient identifiées biochimiquement par les galeries API 20E et 1D 32E comme étant *E. sakazakii*, sont plus proches (de 97,5 à 97,8% de similitude) du taxon englobant *Enterobacter pyrinus*, *Enterobacter hormaechei* et *C. koseri*. Le dernier groupe est constitué de deux souches, étant biochimiquement identifiées comme *E. sakazakii*, mais leurs séquences rARN 16S présentent une similitude de seulement 96,5% à la souche type.

L'analyse de la séquence de l'ADN codant l'ARN 16S a confirmé que plusieurs souches identifiées biochimiquement comme appartenant à l'espèce *E. sakazakii*, appartenaient en réalité à d'autres espèces (Iversen *et al.*, 2004c).

La séquence du gène *hsp60* a été obtenue chez 41 souches d'*E. sakazakii* provenant des 4 groupes identifiés. Les groupes ont été retrouvés par cette méthode, mais les groupes 2 et 4 étaient alors plus éloignés de la souche type que précédemment (respectivement 89,2 à 90,4% et 88,8% de similitude). Par contre, le groupe 3 présentait 95,2% d'homologie de séquence, et les souches le formant ont alors été classées comme étant *E. sakazakii* (Iversen *et al.*, 2004c).

Il semble que les groupes 2, 3 et 4 seraient des nouvelles espèces, proches d'*E. sakazakii*. Des études complémentaires doivent être réalisées pour confirmer leur position taxinomique (Iversen *et al.*, 2004c).

Iversen *et al.* (2006) ont appliqué une méthode d'intelligence artificielle (Artificial Neural Networks) aux caractéristiques biochimiques et 16S d'*E. sakazakii* pour identifier des caractéristiques phénotypiques clés et des séquences nucléotidiques qui permettraient une amélioration de l'identification de la bactérie.

Le modèle utilisé a identifié abusivement deux germes (sur 282) comme étant *E. sakazakii*. Il semble qu'il n'y ait pas une base ou série de bases qui sont typiques de la bactérie, et chez certaines

souches (notamment les deux pré-citées), l'existence d'éléments communs entre *E. sakazakii* et d'autres souches. Il est certain qu'il faut faire grandement attention à l'identification d'*E. sakazakii*, et qu'il faut continuer à étudier sa taxinomie de manière approfondie.

### 3. Nom

Le nom d'*Enterobacter sakazakii* a été donné en honneur au bactériologiste japonais Riichi Sakazaki pour ses multiples contributions à la compréhension des *Enterobacteriaceae*, des *Vibrionaceae* et de la bactériologie entérique. Ce nom a été utilisé pour la première fois en mai 1977 aux Rencontres Annuelles de la Société Américaine de Microbiologie (Farmer *et al.*, 1980).

- ✘ *Enterobacter sakazakii* est un organisme qui a été décrit pour la première fois en 1958, lors de l'analyse de deux cas de méningite néonatale par Urmenyi et Franklin (1961). Ils ont décrit la bactérie comme une souche d'*Enterobacter cloacae* pigmentée en jaune.
- ✘ En 1980, la bactérie est identifiée comme une espèce à part entière, nommée d'après la bactériologiste Riichi Sakazaki.
- ✘ *E. sakazakii* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, genre *Enterobacter*. Des études récentes mettent en évidence une hétérogénéité génétique laissant suggérer que certaines souches étiquetées *E. sakazakii* seraient en fait des espèces nouvelles.

## **B / PRINCIPALES CARACTERISTIQUES**

### **I. Description**

#### **a Souche type**

La souche halotype est la souche ATCC (American Type Culture Collection) 29544, et a été isolée de la gorge d'un patient en 1970 souffrant d'une coqueluche. Cette souche a deux colonies types, qui sont identiques dans leurs propriétés phénotypiques, excepté qu'une est négative et l'autre positive pour le test standard du rouge de méthyle (mais les deux sont négatives par une autre méthode ; Farmer *et al.*, 1980).

#### **b Morphologie**

*E. sakazakii* est un bacille gram négatif de 3 µm de long et de 1 µm de large, mobile et avec une ciliature de type péritriche, non sporulé (Farmer *et al.*, 1980).

La mobilité aussi bien à 36°C qu'à 22°C est un élément important de différenciation des autres *Enterobacteriaceae*.

#### **c Production d'un pigment jaune**

A température ambiante les colonies produisent un pigment jaune doré qui ne diffuse pas, et à 37°C, un pigment faiblement jaune. Ce pigment est insoluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme et l'éther (Urmenyi et Franklin, 1961).

La mise en évidence de la coloration jaune des colonies est un élément très caractéristique d'*E. sakazakii*, qui se met en évidence par la culture sur gélose de Tryptone de Soja, à 25°C pendant 2 à 5 jours (Farmer *et al.*, 1980).

#### **d Caractères biochimiques**

Il faut au minimum 90% des réactions biochimiques regroupées dans la galerie API 20E compatibles pour que l'identification de la bactérie comme *E. sakazakii* soit certaine (Kandhai *et al.*, 2004b).

De plus, il semble que la galerie API 20E pourrait donner des résultats faux négatifs concernant *E. sakazakii*. Le nombre limité de tests effectué donne, par exemple, un pourcentage d'homologie supérieur pour *Pantoea* spp. comme étant *E. sakazakii*, avec la galerie API 20E, qu'en utilisant le système ID 32E (Iversen *et al.*, 2004a).

Enfin, les analyses génétiques de l'ADN codant l'ARN ribosomal 16S tendent à montrer que l'identification biochimique est parfois erronée (Iversen *et al.*, 2004c).

La première caractérisation biochimique d'*E. sakazakii* a été réalisée par Farmer *et al.* (1980) sur 57 souches différentes. Leur étude s'est étalée de 1972 à 1977.

##### ***α Fermentation de sucres et de polyalcools***

La fermentation des sucres et alcools se fait en eau peptonée additionnée d'un indicateur de pH. La fermentation produit des acides qui font virer l'indicateur coloré (Le Minor et Richard, 1993).

Les réactions des 57 souches de Farmer *et al.* (1980) sont résumées dans le tableau 1.

Les propriétés biochimiques des 73 souches d'*E. sakazakii* étudiées par Aldova *et al.* (1983) sont assez semblables à celles trouvées par Farmer *et al.* (1980). Cependant, une souche était lactose négative à 20 jours, et 14 souches fermentaient le lactose avec un délai de 14 jours.

**Tableau 1: Fermentation des sucres et des polyalcools par *E. sakazakii* d'après Farmer *et al.* (1980)**

Test	Réaction de la souche de référence d' <i>E. sakazakii</i> <sup>a</sup>
<b>Fermentation du D-Adonitol</b>	-
Fermentation du L-Arabinose	+ (100)
<b>Fermentation du D-Arabitol</b>	-
<b>Fermentation du Cellobiose</b>	+ (100)
Fermentation du Dulcitol	- (5)
Fermentation de l'Erythritol	-
Fermentation du Glycérol	-
Fermentation de l'i-Inositol	+ (75)
Fermentation du Lactose	+ (100)
Fermentation du Maltose	+ (100)
<b>Fermentation du D-Mannitol</b>	+ (100)
Fermentation du D-Mannose	+ (100)
Fermentation du Mélibiose	+ (100)
Fermentation de l' $\alpha$ -Méthyl-D-glucoside	+ (96)
Fermentation du Raffinose	+ (100)
Fermentation du L-Rhamnose	+ (100)
Fermentation du Salicin	+ (100)
<b>Fermentation du D-Sorbitol</b>	-
Fermentation du Sucrose	+ (100)
Fermentation du Tréhalose	+ (100)
Fermentation du D-Xylose	+ (100)
<b>Production d'acide à partir de Mucate</b>	-
Production d'acide à partir de L-Tartrate	-
<b>Production d'acide sur D-glucose</b>	+ (100)

Il faut remarquer, que bien que l'absence de fermentation du sorbitol par *E. sakazakii* soit considérée comme un caractère distinctif, certaines souches le fermentent (Heuvelink *et al.*, 2001).

#### *$\beta$ Voie métabolique dans la fermentation des hexoses*

La réaction colorée de Voges-Proskauer a pour but de mettre en évidence la production de l'acétoïne et du 2-3 butylène-glycol à partir de l'acide pyruvique, comme produits intermédiaires de la fermentation butane diolique (Le Minor et Richard, 1993).

<sup>a</sup> Entre parenthèse le pourcentage des 57 souches testées pour lesquelles la réaction est positive à 48 heures

Dans leur étude, Farmer *et al.* (1980) ont trouvé que le test de Voges-Proskauer était positif pour 56 souches (98%), mais négatif pour une souche quelles que soient les conditions de manipulation. Les auteurs ont conclu que la souche avait perdu génétiquement la voie de l'acétoïne, ou qu'elle n'est plus exprimée.

Les 73 souches d'*E. sakazakii* étudiées par Aldova *et al.* (1983) étaient positives au test de Voges-Proskauer.

### *χ* Recherche d'un métabolite terminal

Cela correspond à la mise en évidence d'un métabolite d'une réaction enzymatique, identifié au moyen d'une réaction spécifique (Le Minor et Richard, 1993).

#### ☞ Nitrites obtenus par réduction des nitrates

Les 57 souches de Farmer *et al.* (1980) donnent des nitrites par réduction des nitrates. Cette propriété caractérise toutes les Entérobactéries. Il convient cependant de noter que Block *et al.* (2002) ont décrit des infections néonatales dues à un variant nitrate négatif d'*E. sakazakii*.

#### ☞ Indole à partir du L-tryptophane

Seules 11% des souches étudiées par Farmer *et al.* (1980) produisaient de l'indole à partir du tryptophane. Le résultat de ce test est généralement négatif.

Parmi les 73 souches d'*E. sakazakii* étudiées par Aldova *et al.* (1983), une seule produisait de l'indole.

#### ☞ H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate

Les 57 souches d'*E. sakazakii* étudiées ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate (Farmer *et al.*, 1980).

#### ☞ Gaz

La formation de gaz témoigne de la présence d'une hydrogène-lyase, qui scinde l'acide formique H-COOH, formé lors de la fermentation d'un sucre (glucose, lactose...) en CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> (Le Minor et Richard, 1993).

Toutes les souches, sauf une, parmi les 57 étudiées par Farmer *et al.* (1980), produisent une grande quantité de gaz en fermentant le D-glucose. Bien que toutes les souches produisent de l'acide à partir du lactose, trois ne ferment pas de gaz. Ces trois mêmes souches ne produisent pas de gaz dans un bouillon de Tryptone Laurylé (lauryl tryptone), et un bouillon Bilié Vert Brillant. Seulement 40 souches produisent du gaz dans un bouillon au Lactose. Ainsi, 70 à 95% des souches d'*E. sakazakii* seraient identifiées comme coliformes sur la base de la production de gaz à partir du lactose à 35°C, mais 58% à 44,5°C (Farmer *et al.*, 1980).

Dans l'étude d'Iversen *et al.* (2004b), la capacité d'*E. sakazakii* à fermenter le lactose a été déterminée sur 70 souches sur les bouillons pour coliformes (sulfate de lauryl et Bilié Vert Brillant), à 37 et 44°C après 48 heures. A 37°C, 80 et 76% des souches ont produit du gaz à partir du lactose sur le milieu au sulfate de lauryl et celui à la bile, respectivement, alors que les valeurs sont de 23 et 11% à 44°C. Trois souches ne se multiplient pas sur ces deux milieux, bien qu'elles soient viables.

Comme le métabolisme du glucide peut être sensible à des températures de 44°C et plus, l'organisme ne sera pas forcément détecté en utilisant des bouillons pour coliformes (Iversen *et al.*, 2004b).

Le tableau 2 récapitule les principales réactions biochimiques qui caractérisent *E. sakazakii*.

**Tableau 2: Caractéristiques biochimiques d'*E. sakazakii* concernant la production d'un métabolite terminal (d'après Farmer *et al.*, 1980)**

Test	Réaction de la souche de référence d' <i>E. sakazakii</i> <sup>a</sup>
Test de Voges-Proskauer	+ (98)
Réduction des Nitrates	+ (100)
<b>Production d'Indole</b>	<b>- (11)</b>
Production de H <sub>2</sub> S	-
<b>Production de gaz sur D-glucose</b>	<b>+ (98)</b>

### δ Recherche d'enzymes

Farmer *et al.* (1980) ont mis en évidence certaines réactions enzymatiques d'*E. sakazakii*.

Muytjens *et al.* (1984) ont comparé les profils enzymatiques de 129 souches d'*E. sakazakii*, 60 souches d'*E. cloacae*, 19 souches d'*E. aerogenes* et 18 souches d'*E. agglomerans*. Ils ont utilisé le système API ZYM, basé sur l'intensité des réactions colorimétriques. Chaque essai a été réalisé trois fois indépendantes à des jours différents par le même opérateur. Ceci a permis d'obtenir la reproductibilité du test. Il existe des variations quantitatives dans l'intensité des réactions colorimétriques entre les différentes espèces d'*Enterobacter* testées.

Goullet et Picard (1986) ont étudié 22 souches d'*E. sakazakii* par électrophorèse conventionnelle et focalisation isoélectrique, qui est moins sensible.

Les caractéristiques enzymatiques principales d'*E. sakazakii* est représenté dans le tableau 3.

### ⊕ DNase

Farmer *et al.* (1980) ont mis en évidence la présence d'une DNase caractéristique chez *E. sakazakii*, ce qui permet de différencier la bactérie des autres membres de son genre. Elle est mise en évidence sur gélose de Toluidine Bleue après 7 jours chez 100% des souches à 36°C, et 95% des souches à 25°C.

### ⊕ Décarboxylases

Les décarboxylases de la lysine (LDC ; formation de la cadavérine) et de l'ornithine (ODC ; formation de la putrescine) sont révélées par alcalinisation secondaire des milieux contenant ces substrats et du glucose. Le même type de milieu est utilisé avec de l'arginine comme substrat pour mettre en évidence une décarboxylase et une dihydrolase (ADH ; Le Minor et Richard, 1993).

Parmi les 57 souches d'*E. sakazakii* de Farmer *et al.* (1980), toutes sont négatives pour la LDC, 100% sont positives pour l'ADH, et 91% positives pour l'ODC. Ce sont des réactions importantes pour la caractérisation de la bactérie.

### ⊕ Désaminases

Les désaminases de la phénylalanine ou du tryptophane sont révélées par du perchlorure de fer (Le Minor et Richard, 1993).

Le test de désamination de la phénylalanine a été problématique, puisque que la réaction colorée semblait faiblement positive à certains examinateurs mais négative pour d'autres. Farmer *et al.* (1980) ont décidé arbitrairement que 50% des souches présentaient alors une réaction positive.

<sup>a</sup> Entre parenthèse le pourcentage des 57 souches testées dont la réaction est positive à 48 heures

### ☞ Uréase

Aucune souche n'est uréase positive (Farmer *et al.*, 1980)

### ☞ $\beta$ -galactosidase

La  $\beta$ -galactosidase est mise en évidence par le test à l'ONPG (*O*-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside). Ce test est positif pour 100% des souches testées par Farmer *et al.* (1980).

### ☞ $\beta$ -glucuronidase

L'étude de Muytjens *et al.* (1984) a mis en évidence qu'*E. sakazakii* donne un test négatif pour la  $\beta$ -glucuronidase.

### ☞ Gélatinase

Quarante-cinq pourcent des souches de Farmer *et al.* (1980) hydrolysent la gélatine après sept jours à 22°C.

### ☞ $\alpha$ -glucosidase

Toutes les souches d'*E. sakazakii* (129) produisent de l' $\alpha$ -glucosidase, alors que les autres souches (97) n'en produisent pas. C'est donc une enzyme spécifique de cette espèce. La reproductibilité de cette réaction a été estimée à 89% (Muytjens *et al.*, 1984). Farmer *et al.* (1985) ont trouvé 53 souches sur les 57 testées qui avaient une activité  $\alpha$ -glucosidase positive.

Muytjens *et al.* (1984) considèrent que la réaction de l' $\alpha$ -glucosidase est une réaction très importante et pourrait servir de méthode d'identification (ce qui a été fait par Kandhai *et al.*, 2004b). Il convient de remarquer que cette réaction est spécifique d'*E. sakazakii* uniquement si elle est lue précocement (4 heures), puisque, après 24 heures, d'autres bactéries du genre *Enterobacter* présentent une réaction positive, *Enterobacter nigrifluens* et *Pantoea* spp. notamment (Kandhai *et al.*, 2004b).

### ☞ Phosphoamidase

Aucune souche d'*E. sakazakii* ne produit une phosphoamidase, alors que cette enzyme est présente chez 72% d'*E. cloacae*, 100% d'*E. aerogenes* et 89% d'*E. agglomerans*. La reproductibilité de ces deux réactions a été estimée respectivement à 89% et 81% (Muytjens *et al.*, 1984).

### ☞ Tween-80-estérase

Aldova *et al.* (1983) ont mis en évidence que 97,3% des souches d'*E. sakazakii* (71 sur 73) qu'ils ont étudié possédaient une activité tween-80-estérase. Dix souches produisaient cette tween-80-estérase dans les 24 heures et les autres dans les 3 à 8 jours. Les souches négatives pour la tween-80-estérase hydrolysent également le tween 20. Aucune autre bactérie de l'étude n'hydrolyse le tween 80 (sauf trois souches d'*E. aerogenes anaerogenic* du biogroupe 1, mais elles n'appartenaient pas à l'étude). Les six souches isolées par Postupa et Aldova (1984) dans les poudres de lait possédaient une activité tween-80-estérase après 7 jours d'incubation à 25°C et 37°C.

### ☞ Autres enzymes à réactions négatives

L'étude de Muytjens *et al.* (1984) a permis de mettre en évidence que les *Enterobacteriaceae* testés ont des activités négatives pour la lipase myristate, l'arylamidase valine, l'arylamidase cystine, la trypsine, la chymotrypsine, l' $\alpha$ -mannosidase et l' $\alpha$ -fucosidase. Gouillet et

Picard (1986) ont trouvé une activité glutamate déshydrogénase négative et phosphatase acide négative (alors que Muytjens *et al.*, 1984 la trouvent positive).

☞ Autres enzymes à réactions positives

*E. sakazakii* présente une activité moyenne à importante des enzymes suivantes : la phosphatase alcaline, la butyrate estérase, la caprylate estérase-lipase, la leucine arylamidase, la phosphatase acide, la  $\beta$ -galactosidase et l' $\alpha$ -glucosidase. 30% des souches testées sont positives pour l' $\alpha$ -galactosidase, 83% pour la  $\beta$ -glucosidase et 79% pour la *N*-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase (Muytjens *et al.*, 1984).

**Tableau 3: Caractéristiques enzymatiques d'*E. sakazakii***

Enzyme	Réaction d' <i>Enterobacter sakazakii</i> <sup>a</sup>
<b>DNase à 25°C</b>	<b>+ (95% à 7 jours)</b>
<b>DNase à 36°C</b>	<b>+ (100)</b>
Oxydase	-
Catalase	+ (100)
<b>Lysine-décarboxylase</b>	-
<b>Arginine-dihydrolase</b>	<b>+ (100)</b>
<b>Ornithine-décarboxylase</b>	<b>+ (91)</b>
Désamination de la Phénylalanine	+/- <sup>c</sup>
Uréase	-
Gélatinase	- (à 48 heures)
Hydrolyse de l'Esculine	+ (100)
Hydrolyse du Pectate	-
Hydrolyse des Lipides (huile de blé)	-
Lipase myristate	-
Arylamidase valine	-
Arylamidase cystine	-
Trypsine	-
Chymotrypsine	-
$\beta$ -glucuronidase	-
$\alpha$ -mannosidase	-
$\alpha$ -fucosidase	-
Phosphatase alcaline	+ (100)
Butyrate estérase	+ (100)
Caprylate estérase-lipase	+ (100)
Leucine arylamidase	+ (100)
Phosphatase acide <sup>b</sup>	+ (100)/-
$\beta$ -galactosidase	+ (100)
<b><math>\alpha</math>-glucosidase.</b>	<b>+ (100)</b>
$\alpha$ -galactosidase	+ (30)
$\beta$ -glucosidase	+ (83)
<i>N</i> -acétyl- $\beta$ -glucosaminidase	+ (79)
<b>Phosphoamidase</b>	-
Glutamate déshydrogénase	-
Lactate déshydrogénase	+ (100)
Malate déshydrogénase	+ (100)
Estérase	+/-
<b>Tween-80-estérase</b>	<b>+ (97,3)</b>

<sup>a</sup> Réaction positive notée +, négative notée -, et entre parenthèse le nombre de souches testées positives

<sup>b</sup> Présence variable suivant les études : + pour Muytjens *et al.* (1984), - pour Gouillet et Picard (1986)

<sup>c</sup> Voir explication dans texte

*ε* *Etude de la croissance en milieu minimal*

Il s'agit de rechercher l'aptitude de la bactérie à cultiver en utilisant une source de carbone définie, par exemple le citrate de sodium (milieu de Simmons).

*E. sakazakii* croît sur du D-glucose (même après plusieurs transferts en série) et sur citrate sans autre source de carbone ou d'énergie ajoutée. Il n'y a donc pas de besoins évidents en vitamines, acides aminés ou autres facteurs de croissance organiques (Farmer *et al.*, 1980).

Le tableau 4 donne les caractéristiques d'*E. sakazakii* pour la croissance en milieu minimal.

**Tableau 4: croissance en milieu minimal d'*E. sakazakii*, d'après Farmer *et al.* (1980)**

Test	Réaction de la souche de référence d' <i>E. sakazakii</i> <sup>a</sup>
Citrate de Simmons	+ (100)
Citrate de Christensen	+ (100)
Acétate de Simmons	+ (100 à 7 jours)
Malonate	- (18)
Utilisation de la tyrosine	-
Croissance sur KCN	+ (100)

*φ* *Aptitude à cultiver en présence d'un inhibiteur*

*E. sakazakii* croît en présence de cyanure de potassium (Farmer *et al.*, 1980).

*e* *Typage**α* *Biogroupes*

Farmer *et al.* (1980) ont trouvé 15 biogroupes dans les 57 souches qu'ils ont testées. Ils ont utilisé la production d'indole, le test au rouge de méthyle, le test Voges-Proskauer, l'ornithine décarboxylase, la mobilité, l'utilisation du malonate, la production de gaz à partir du D-glucose à 48 heures, la production d'acide à partir d'*i*-inositol (48 heures), le ducitol, et l' $\alpha$ -méthylglucoside. La réponse à ces tests est variable suivant les souches, ce qui permet leur distinction. Le tableau 5 présente les caractéristiques des biogroupes.

**Tableau 5: Caractérisation des 15 biogroupes reconnus dans les 57 souches étudiées par Farmer *et al.* (1980)**

Désignation du biogroupe	Pourcentage de souches dans le biogroupe	Tests différents du type sauvage
1 (type sauvage)	42	Aucun
2	12	Inositol-
3	9	Mobilité-
4	7	Ornithine-
5	5	Malonate+
6	2	Indole+
7	2	Gas-

<sup>a</sup> Entre parenthèse le pourcentage des 57 souches testées dont la réaction est positive à 48 heures

8	2	Nitrite-
9	5	Inositol-, malonate+
10	4	Inositol-, indole+
11	2	Inositol-, dulcitol+
12	2	Indole+, malonate+
13	2	Rouge de méthyle+, Voges-proskauer-
14	2	Inositol-, malonate+, ornithine-
15	4	Indole+, malonate+, dulcitol+, $\alpha$ - méthylglucoside -

Le biogroupe 1 est le plus fréquent. Les auteurs suggèrent qu'une investigation approfondie pourrait amener à réorganiser l'espèce bactérienne en un nouveau genre, avec les biogroupes 1 à 14 étant des souches d'une espèce et le biogroupe 15 étant une espèce séparée (Farmer *et al.*, 1980).

Des méthodes de typage plus poussées existent actuellement (RAPD notamment). Les conclusions de Farmer *et al.* (1980) ne semblent plus valables, et d'autres questionnements sur la taxinomie d'*E. sakazakii* se posent (Iversen *et al.*, 2004c).

Nazarowec-White et Farber (1999) ont étudié 18 isolats d'*E. sakazakii*, et les ont classés en trois biotypes suivant leurs profils biochimiques. Le premier biotype comprend neuf isolats (dont la souche type). Le deuxième biotype comprend six isolats, et le dernier trois. Les isolats du deuxième biotype sont inositol négatifs, et ceux du troisième biotype sont positifs au test de Voges-Proskauer.

Les systèmes de typage phénotypiques, tels que le biotypage, ont un faible pouvoir de discrimination au sein de l'espèce *E. sakazakii* (Nazarowec-White et Farber, 1999).

### $\beta$ Zymotype

Deux zymotypes ont été identifiés pour *E. sakazakii* par Goulet et Picard (1986) à partir des 22 souches dont ils disposaient. Ils se sont basés sur l'étude, par électrophorèse, de la malate déshydrogénase, la lactate déshydrogénase et une estérase en caractérisant leur point isoélectrique et leur mobilité électrophorétique relative (représenté par le ratio des distances de migration de ces enzymes par rapport à la glutamate déshydrogénase sur celui de cette référence à celle de la bande de l'estérase restant le plus près de l'anode ; Goulet et Picard, 1986).

Le premier zymotype (regroupant 18 souches) est caractérisé par un point isoélectrique de 5,15 et une mobilité électrophorétique de 41 pour la malate déshydrogénase, de 34, 48 et 49 pour les isoformes de la lactate déshydrogénase, et des points isoélectriques allant de 4,85 à 5,35 pour les estérases.

Le deuxième zymotype (4 souches) est caractérisé par un point isoélectrique de 5,05 et une mobilité électrophorétique de 49 pour la malate déshydrogénase, de 42 pour la lactate déshydrogénase, et des points isoélectriques allant de 4,7 et 4,75 pour l'estérase.

Le degré élevé de polymorphisme enzymatique permet l'identification précise des souches. Les variations des schémas isoélectriques pourraient être (ou auraient pu être) des marqueurs épidémiologiques utiles (Goulet et Picard, 1986).

Clark *et al.* (1990) ont également utilisé l'électrophorèse d'enzymes pour typer les différents isolats qu'ils ont étudiés. En plus des enzymes qui avaient été utilisées par Goulet et Picard (1986), ils ont testé la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la glutamate déshydrogénase et l'hexokinase. Sur les 27 isolats testés, 14 types électrophorétiques ont ainsi été mis en évidence.

Clark *et al.* (1990) pensent que les estérases et la glucose-6-phosphate déshydrogénase pourraient être particulièrement utiles pour différencier les souches d'*E. sakazakii* entre elles.

### $\chi$ Profils plasmidiques

Clark *et al.* (1990) ont étudié 27 isolats provenant de la crise décrite par Biering *et al.* (1989 ; 3 provenant des patients et 24 de préparations de poudre de lait pour nourrissons) et 5 isolats provenant de la crise décrite par Simmons *et al.* (1989 ; 3 de patients, 1 de poudre de lait et 1 du mixeur), ainsi que deux souches de référence (dont la souche type ATCC 29544).

Les isolats sont cultivés pendant la nuit à 37°C dans un bouillon standard à pH alcalin, avec des extraits de levure, et une technique de lyse alcaline est utilisée pour obtenir les plasmides bactériens. Les ADN obtenus subissent ensuite une électrophorèse sur gel d'agarose et sont révélés avec du bromure d'éthidium.

Cette méthode est pratique et rapide, mais l'instabilité des plasmides au sein des lysats nécessitait parfois une confirmation par des méthodes électrophorétiques plus rigoureuses (Clark *et al.*, 1990).

### $\delta$ Analyse de la restriction chromosomique par endonucléase

Clark *et al.* (1990) ont digéré l'ADN chromosomique de leurs isolats par des endonucléases de restriction (*Hind*III et *Bam*HI), puis ont révélé par exposition aux UV les fragments de restriction après leur séparation sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium.

Les schémas obtenus étaient distinguables à l'œil nu et ne nécessitaient pas de scannage densitométrique.

Les 27 isolats de Biering *et al.* (1989) étaient tous semblables, sauf un, qui présentait également un biotype différent. Les autres isolats avaient tous le même schéma, également identique à celui de la souche type, mais qui différait du précédent (Clark *et al.*, 1990).

### $\varepsilon$ Ribotypage

Les fragments de restriction obtenus par digestion de l'ADN chromosomique par les mêmes endonucléases que précédemment ont été séparés sur gel, transférés sur membrane puis hybridés. La sonde utilisée est de l'ARN ribosomal (rRNA 16S + 23S) d'*E. coli* purifié, marqué au phosphore radioactif et dénaturés (Clark *et al.*, 1990).

Les schémas obtenus de ribotypage sont identiques au sein d'un même groupe d'isolats étudiés par Clark *et al.* (1990) mais différent entre les groupes.

Le ribotypage est une meilleure technique que le seul profil électrophorétique de l'ADN chromosomique digéré par des endonucléases, car les régions chromosomiques codant pour le rARN sont parmi les plus conservées et que le nombre de bandes électrophorétiques à interpréter est moindre. Les schémas de ribotypage obtenus avec *Hind*III sont plus discriminants que ceux obtenus par *Bam*HI (Clark *et al.*, 1990).

Nazarowec-White et Farber (1999) ont utilisé cette même méthode, mais en changeant d'endonucléase de restriction (*Eco*RI). Ils ont ainsi mis en évidence 10 ribotypes différents sur 18 souches testées.

C'est une méthode relativement discriminante, mais d'autres techniques, plus récentes sont plus performantes.

### $\phi$ Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

#### ☞ Méthode

L'ADN chromosomique des 18 isolats d'*E. sakazakii* étudiées par Nazarowec-White et Farber (1999) a été extrait, puis digéré par des endonucléases de restriction (*Xba*I et *Spe*I), à faible nombre de zones de coupure. Les fragments obtenus ont été séparés sur un gel d'agarose puis révélés sous illuminateur en présence de bromure d'éthidium.

### ☪ Résultats

L'endonucléase *XbaI* permet d'obtenir 18 profils différents dont la taille des fragments s'échelonne de 40 – 690 kb, indiquant un fort degré de diversité génomique dans les 18 isolats. Les trois isolats trouvés dans des poudres de lait pour nourrissons ont donné trois pulsovars différents, alors qu'ils n'étaient pas différenciables par ribotypage et que l'endonucléase *SpeI* ne permettait pas d'en différencier deux.

Cette méthode apparaît donc encore plus discriminante que le ribotypage et autant que l'amplification aléatoire d'ADN polymorphique (Nazarowec-White et Farber, 1999).

#### $\gamma$ Amplification aléatoire d'ADN polymorphique (RAPD)

### ☪ Méthode

Des sondes de dix paires de bases ont été mises au point par l'Université de Colombie Britannique (5'-cgc gtg cca g-3' et 5'-ggg aaa- gca g-3'). L'ADN des 18 souches d'*E. sakazakii* étudiées a été extrait, et la PCR a été réalisée. Les résultats d'amplification ont été comparés après migration sur gel et révélation en présence de bromure d'éthidium (Nazarowec-White et Farber, 1999).

### ☪ Résultats

La première amorce a permis d'obtenir 18 types pour 18 souches, et la seconde 17 types. Les deux amorces ont donné de 4 à 13 résultats d'amplification, allant de 0,3 à 2,5 kilobases (kb). L'analyse est reproductible (réalisée trois fois). Les isolats ayant donné des profils de ribotypage indiscernables étaient distinguables par RAPD (comme par PFGE ; Nazarowec-White et Farber, 1999).

Cette méthode est aussi discriminante que la précédente, mais elle présente l'avantage supplémentaire d'être plus facile et plus rapide à réaliser, une fois que les amorces ont été trouvées. L'équipement est moins spécialisé, et l'expertise pour le protocole est moins grande.

Drudy *et al.* (2006b) ont caractérisé de nombreux isolats aussi bien environnementaux qu'alimentaire d'*E. sakazakii*. Ils ont conclu que la RAPD était la méthode la plus discriminante. Elle peut servir de marqueur épidémiologique

Nazarowec-White et Farber (1999) conseillent d'utiliser le biotypage comme méthode de dépistage et d'utiliser ensuite la PFGE ou la RAPD comme méthode de confirmation.

#### $\eta$ Analyse des espaces intergéniques tARN par PCR (tADN-PCR)

Les gènes tARN sont des séquences répétitives qui sont dispersées au sein du génome de la plupart des espèces. La présence d'une séquence partagée au sein de ces gènes implique que l'utilisation d'une amorce contenant cette séquence consensus va permettre d'obtenir des fragments PCR caractéristiques (Clementino *et al.*, 2001).

Lors d'une étude portant sur *E. cloacae*, Clementino *et al.* (2001) ont mis en évidence un profil caractéristique d'*E. sakazakii* par cette méthode, qui permet de la différencier des espèces *E. cloacae* et *E. aerogenes*.

## 2. Caractéristiques de croissance

### a Milieu de croissance et morphologie

*E. sakazakii* pousse sur des milieux utilisés pour les bactéries entériques, tels que le milieu de MacConkey, Bleu de Méthylène Eosine et géloses au Désochoxycholate (Iversen et Forsythe, 2003).

#### *α* Gélose de Tryptone de Soja

Les 57 souches de Farmer *et al.* (1980) croissent rapidement sur gélose au Tryptone de Soja à 36°C, et forment des colonies de 2 à 3 mm de diamètre en 24 heures. A 25°C les colonies sont de 1 à 1,5 mm en 24 heures et de 2 à 3 mm en 48 heures.

Deux types de colonies sont identifiés. Le type A est soit sec, soit mucoïde, de contour irrégulier (présence d'encoches ou en coquille), et élastique quand il est touché avec l'œse. Le type B est lisse et facilement détachable.

Des colonies obtenues par culture de souches de type A (colonies typiques) se sont rapidement dissociées en type B (atypique ; Farmer *et al.*, 1980).

Le type de morphologie B est du à la production de cellulose, et correspond à la morphologie adoptée lors des infections (Zogaj *et al.*, 2003).

Iversen et Forsythe (2003) décrivent ces colonies comme étant brillantes ou mates.

#### *β* Gélose nutritive

*E. sakazakii* forme aussi deux types de colonies, qui sont soit des colonies lisses, plates et brillantes soit, moins souvent, des colonies rugueuses, sèches dont le diamètre varie de 0,2 à 1 mm, friables ou élastiques. Elles ressemblent plus à des colonies d'*E. agglomerans* qu'à des colonies d'*E. cloacae* (Aldova *et al.*, 1983).

#### *χ* Bouillon

Le croissance est rapide dans un bouillon de Tryptone de Soja (passage de 10<sup>4</sup> à 10<sup>9</sup> bactéries par mL en une nuit à 36°C), avec la production en grande quantité de sédiment contenant des amas de cellules et des masses amorphes (Farmer *et al.*, 1980).

### b Température et croissance

#### *α* Températures limites de croissance

##### ☞ Température minimale de croissance

Les 57 souches de Farmer *et al.* (1980) ne se multiplient pas à 4°C.

Selon une autre étude de Nazarowec-White et Farber (1997b), les températures minimales de croissance en milieu de culture varient de 5,5 à 8°C. Aucune croissance n'est observée à 5,5°C. *E. sakazakii* est donc un germe mésophile. A 4°C, le nombre de bactéries ne varie pas, voire diminue. Cette étude a été faite avec 10 souches d'origine alimentaire et environnementale.

Six souches cliniques et alimentaires étudiées par Iversen *et al.* (2004b) avaient pour température minimale de croissance 6°C, dans des milieux non sélectifs (infusion Cerveau-Cœur, bouillon de Tryptone de Soja...) et du lait pour nourrissons reconstitué.

Ceci implique que même si *E. sakazakii* ne se multiplie pas aux températures normales de réfrigération (4°C), il peut se multiplier doucement à des températures très légèrement supérieures (5,5°C) ce qui est fréquent dans un réfrigérateur (Nazarowec-White et Farber, 1997b).

### ☞ Température maximale de croissance

Les 57 souches de Farmer *et al.* (1980) se multiplient à 25, 36 et 45°C. 50 souches se multipliaient encore à 47°C, mais aucune à 50°C.

Les 22 souches d'*E. sakazakii* étudiées par Breeuwer *et al.* (2003) se multipliaient jusqu'à 47°C dans une infusion cerveau et cœur. A 37°C, ces souches se multipliaient de pH 4,5 à 10, et dans une infusion cerveau-cœur ayant une Aw de 0,96 (1,2 mol/L de NaCl).

Les six souches citées précédemment étudiées par Iversen *et al.* (2004b) se multipliaient jusqu'à 45°C (cf. figure 1). Sur leur total de 70 souches, aucune croissance n'était observée à 47°C après 24 heures dans un bouillon de Tryptone de Soja, mais 34% de des souches avaient une croissance minimale après 48 heures. Une souche encapsulée étaient capable de se multiplier à 47°C dans de la poudre de lait pour nourrisson reconstituée. Les auteurs ont noté que l'exopolysaccharide produit par cette souche rendait le lait reconstitué visqueux.

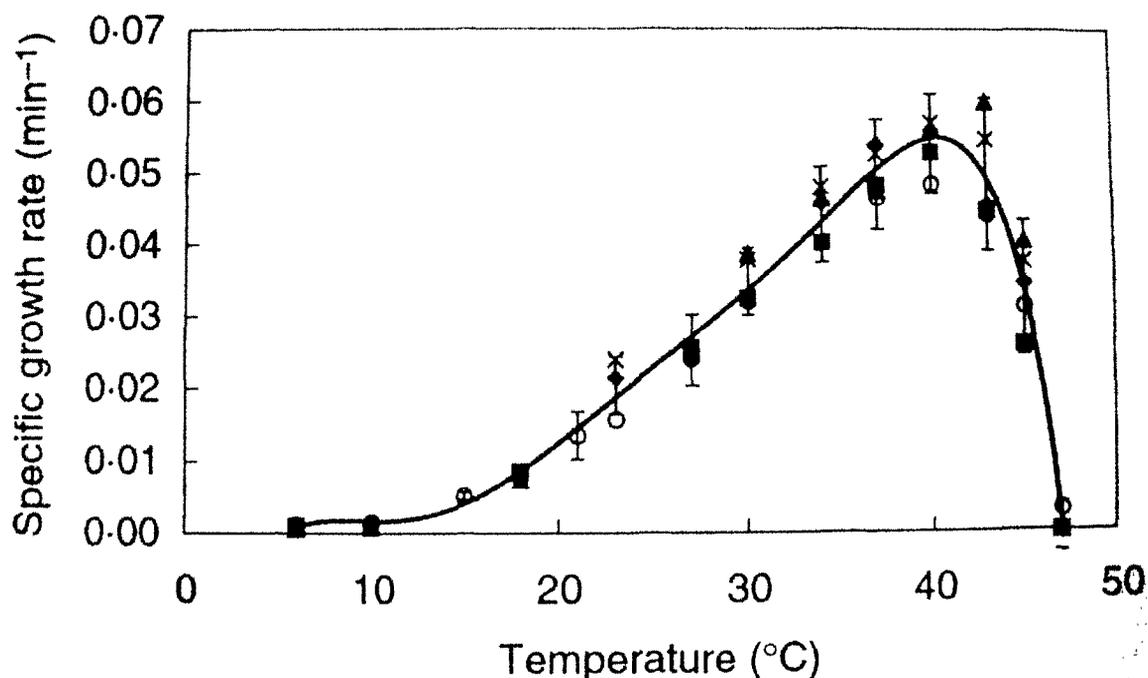


Figure 1 : Courbe de croissance d'*E. sakazakii* d'après Iversen *et al.* (2004b)

### β *Température optimale de croissance*

La croissance optimale d'*E. sakazakii* se fait de 37 à 43°C suivant le milieu de culture (Iversen *et al.*, 2004b).

### χ *Vitesse de croissance*

Dans l'étude de Kindle *et al.* (1996), *E. sakazakii* a un des taux de croissance dans le lait en poudre reconstitué les plus élevés comparés aux autres micro-organismes testés (*E. coli*, *P. aeruginosa*,

*S. aureus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium terrae* et *K. pneumoniae*). L'inoculum initial de 100 cfu/mL, incubé à température ambiante, augmente presque jusqu'à 3000 cfu/ml après 6 heures.

De plus, Simmons *et al.* (1989), ont démontré qu'une fois que le lait était reconstitué, *E. sakazakii* se multipliait et survivait mieux que les autres contaminants de la poudre (notamment *E. cloacae*).

#### ☞ Temps de doublement

Le temps de doublement d'*E. sakazakii* dans une formule pour nourrissons à 6°C est de 13,7 heures. Bien que la dose infectieuse ne soit pas connue, il est peu probable qu'une multiplication suffisante ait lieu lors de la réfrigération pour provoquer une infection (Iversen *et al.*, 2004b).

A 21°C et dans de la poudre de lait pour nourrissons reconstituée, le temps de doublement d'*E. sakazakii* est de 1,7 heures en moyenne (Iversen *et al.*, 2004b).

Le temps de doublement moyen des six souches d'Iversen *et al.* (2004b) est de 22 minutes en moyenne à 37°C, avec des extrêmes de 14 à 29 minutes.

Lors de l'utilisation de céréales de riz reconstituées avec de l'eau, du lait, ou bien des préparations de poudre de lait, les temps de dédoublement d'*E. sakazakii* sont identiques à ceux des poudres de lait reconstituées (Richards *et al.*, 2005). Les auteurs remarquent ainsi que des céréales reconstituées ne doivent pas être conservées à des températures trop élevées pendant trop longtemps.

#### ☞ Temps de génération

Le temps de génération à 10°C d'*E. sakazakii* varie de 4,18 à 5,52 heures (moyenne de 4,64 heures). A 23°C, il est de 40 minutes (0,67 heures). Ces temps de génération sont inférieurs à ceux d'*E. coli* et de *Salmonella* spp. (tous deux à 44,4 minutes à n23°C par exemple ; Nazarowec-White et Farber, 1997b).

A 37°C, le temps de génération est de 2,2 heures dans une infusion cœur-cervelle (Breeuwer *et al.*, 2003).

Ces durées peu élevées sont source d'inquiétude, dans la mesure où même si la contamination initiale est faible, un entreposage trop long à température ambiante de lait reconstitué peut permettre une multiplication importante de la bactérie (Nazarowec-White et Farber, 1997b).

Richards *et al.* (2005) trouvent, dans leur étude, que les temps de génération d'*E. sakazakii* dans des céréales au riz reconstituées avec de l'eau, du lait ou bien d'une préparation de poudre de lait, sont respectivement de 43, 48 et 57 minutes à 30°C. La population initiale était de 0,27 cfu/mL.

#### ☞ Temps de latence

Le temps de latence moyen à 10°C sur 10 souches (5 cliniques et 5 alimentaires) est de 32,8 heures (de 19 à 47 heures aux extrêmes), à 23°C de 2,7 heures. Ces temps sont généralement plus courts pour les souches alimentaires, mais la différence n'est pas significative ( $p > 0,05$ ). *E. coli* et *Salmonella* spp. ont des temps de latence plus élevés, avec une différence plus significative à 23°C qu'à 10°C (Nazarowec-White et Farber, 1997b).

Les temps de latences obtenus dans des préparations déshydratées de céréales reconstituées avec de l'eau, du lait ou des préparations de poudre de lait, diminuent lorsque la température diminue (12, 21 et 30°C). Le temps de latence lors de l'utilisation de lait est inférieur à celui obtenu lors d'utilisation d'eau (Richards *et al.*, 2005).

c Anaérobiose

*E. sakazakii* est anaérobique facultatif, puisque les 57 souches de Farmer *et al.* (1980) se multipliaient dans les conditions de culture avec et sans oxygène.

3. Différenciation d'avec les autres *Enterobacter*

*E. sakazakii* est différencié des autres *Enterobacteriaceae* par (cf. tableau 6) :

- ⌘ Son modèle de décarboxylase (lysine négatif, arginine positif, ornithine positif),
- ⌘ L'absence de fermentation du sorbitol et du mucate,
- ⌘ La réaction à la DNase positive, bien que différée (Farmer *et al.*, 1985),
- ⌘ La production d'un pigment jaune (Farmer *et al.*, 1980),
- ⌘ La possession d'enzymes spécifiques, l' $\alpha$ -glucosidase (Muytjens *et al.*, 1984) et la Tween-80-estérase (Aldova *et al.*, 1983).

**Tableau 6: Différenciation dans le genre *Enterobacter* d'après Farmer *et al.* (1980), Aldova *et al.* (1983), Muytjens *et al.* (1984), Farmer *et al.* (1985)**

Test <sup>a</sup>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>
<b>Lysine décarboxylase</b>	-	-	+	-	+
<b>Arginine dihydrolase</b>	+	+	-	-	-
<b>Ornithine décarboxylase</b>	+	+	+	-	+
Croissance sur KCN	+	+	+	v	-
Fermentation du :					
• Sucrose	+	+	+	(+)	+
• Dulcitol	-	(-)	-	(-)	-
• Adonitol	-	(-)	+	-	-
• <b>D-Sorbitol</b>	-	+	+	v	-
• Mucate	-	v	+	v	
• Raffinose	+	+	+	v	+
• A-Méthyl-D-glucoside	+	(+)	+	-	-
• D-Arabitol	-	(-)	+	v	+
<b>Pigment jaune</b>	+	-	-	(+)	-
<b>DNase (7 jours)</b>	+	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-glucosidase</b>	+	-	-	-	-
<b>Tween-80-estérase,</b>	+	-		+/-	
Présence dans des isolats cliniques humains	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Réaction positive notée + ; négative notée - ; variable suivant les souches notée v

- ☒ *Enterobacter sakazakii* est un bacille à Gram négatif, mobile et cilié.
- ☒ Cette bactérie produit un pigment jaune non diffusible à température ambiante en 48 heures.
- ☒ Elle est caractérisée biochimiquement par :
  - ☒ Son modèle de décarboxylase (Lysine négatif, arginine positif, ornithine positif) ;
  - ☒ L'oxydase négative, catalase positive ;
  - ☒ L'absence de fermentation du sorbitol et du mucate
  - ☒ Sa DNase (7 jours à 36°C) ;
  - ☒ Son  $\alpha$ -glucosidase (4 heures)
  - ☒ Sa Tween-80-estérase
- ☒ Le typage doit se faire avec le biotypage pour le dépistage, puis avec la PGGE (Electrophorèse en Gel Pulsé) ou la RAPD (Amplification aléatoire d'ADN Polymorphique) comme méthode de confirmation.
- ☒ *E. sakazakii* est anaérobie facultatif et forme deux types de colonies sur gélose.
- ☒ *E. sakazakii* se multiplie de 5°C environ à 45-47°C, avec une température optimale de croissance à 37-43°C.

## C / SENSIBILITE

### 1. Sensibilité aux antibiotiques

#### a Sensibilité aux antibiotiques d'*E. sakazakii* comparé à d'autres *Enterobacteriaceae*

En 1986, Muytjens et Van Der Ros-Van Der Repe, ont étudié la sensibilité d'*E. sakazakii* aux antibiotiques en comparaison avec huit autres espèces d'*Enterobacter* (*E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. amnigenus*, *E. gergoviae*, *E. intermedium* et *E. taylorae*). Ils ont étudié 195 isolats d'*E. sakazakii*, et 29 agents antimicrobiens. Les CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) ont été déterminées par la méthode de dilution en gélose.

La CMI est définie comme la plus petite concentration en antibiotique à laquelle il n'y a pas de croissance, une colonie discrète ou une fine et à peine visible brume après 16 à 20 heures d'incubation à 35°C.

Les CMI de 25 des agents testés pour inhiber 90% des souches sont au moins deux fois inférieures pour *E. sakazakii*, que pour *E. cloacae*. *E. sakazakii* est l'espèce la plus sensible aux antibiotiques de toutes celles qui sont testées.

Le tableau 7 présente la sensibilité d'*E. sakazakii* par rapport à d'autres *Enterobacteriaceae*.

Tableau 7: Sensibilité aux antibiotiques d'*E. sakazakii* comparé à d'autres *Enterobacter* d'après Muytjens et Van Der Ros-Van De Repe (1986)

	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. intermedium</i>	<i>E. taylorae</i>
Ampicilline	4	>128	>128	>128	8	16	128	>128
Céphalotine	128	>128	>128	>128	>128	128	>128	>128
Céphamandole	4	>128	>128	>128	16	8	32	64
Céfopérazone	2	16	128	128	2	1	4	0.5
Cefotaxime	0.125	8	0.5	32	0.5	0.25	0.5	0.25
Céfoxitime	16	>128	>128	>128	64	128	>128	>128
Cefsulodine	32	>128	>128	>128	128	128	128	>128
Ceftazidime	0.25	2	1	4	0.25	0.25	0.5	0.5
Ceftizoxime	<0.125	8	0.25	32	0.5	0.5	2	0.25
Ceftriaxone	0.125	8	0.5	32	0.5	0.125	0.5	0.25
Céfuroxime	8	>128	>128	>128	128	16	64	>128
Chloramphénicol	16	>128	>128	128	16	32	16	8
Ciprofloxacine	<0.065	0.125	<0.06	1	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06
Doxycycline	4	32	16	128	4	8	4	4
Gentamicine	0.5	8	32	1	0.5	2	0.5	0.5
Imipenem	0.25	1	2	0.5	1	0.5	2	2
Moxalactam	0.125	1	0.25	8	2	0.25	4	1
Ac. nalidixique	4	16	8	64	4	16	8	8
Néomycine	2	1	2	2	1	8	4	2
Norfloxacine	0.125	0.5	0.25	2	0.25	0.125	0.25	0.125
Polymyxine B	1	2	2	1	1	1	2	>128
Rifampine	8	32	64	64	32	16	32	32
Sulfaméthazole-triméthoprime	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

## **b Evolution des résistances aux antibiotiques dans le temps**

Une analyse rétrospective réalisée sur les isolats cliniques des différentes crises (Lai, 2001), a montré que les premiers isolats présentaient une sensibilité constante à l'ampicilline, tétracycline, chloramphénicol, gentamicine et les céphalosporines de troisième génération.

Depuis les années quatre-vingt, *E. sakazakii* est résistant à la céfoxitine (Arseni *et al.*, 1987). Des résistances émergent. Actuellement, des souches deviennent résistantes à l'ampicilline (Lai, 2001 ; Ongradi, 2002 ; Dennison et Morris, 2002), à la gentamicine (Dennison et Morris, 2002).

Il faut noter que Nazarowec-White et Farber (1999) ont trouvé une souche résistante au chloramphénicol.

### *α Antibiogramme des souches isolée lors des crise*

Une étude des résistances des souches isolées depuis 1958 est faite (cf tableau). Nous ne repreneons en détail que les profils de sensibilité aux antibiotiques les plus récents.

Les dix-huit isolats étudiés par Nazarowec-White et Farber (1999) présentaient le même profil de résistance antibiotique. Ils étaient sensibles à l'ampicilline, la céfotaxime, le chloramphénicol, la gentamicine, la kanamycine, la polymyxine B, le sulfaméthazole-triméthoprim, la tétracycline et la streptomycine, et résistantes à la céphalothine et le sulphisoxazole. Une souche était résistante à l'ampicilline et le chloramphénicol en plus. C'est le début des résistances à ces deux antibiotiques.

Les souches examinées lors de l'étude rétrospective de Lai (2001) ont présenté une résistance constante à l'ampicilline, céfazoline, pénicillines à spectre étendu, des résistances variables aux céphalosporines de troisième génération et aux quinolones. Une souche était résistante à tous les antibiotiques testés sauf les aminosides et le triméthoprim-sulfaméthoxazole. A cette date, toutes les souches sont restées sensibles aux aminosides et au triméthoprim-sulfaméthoxazole, et les souches deviennent résistantes ou moyennement sensibles à l'ampicilline.

En 1999 et 2000, lors de la crise décrite par Bar-Oz *et al.* (2001) et Block *et al.* (2002), les souches isolées étaient sensibles aux pénicillines récentes, céphalosporines, carbapénems, fluoroquinolones, aminosides, tétracyclines, sulfaméthoxazole-triméthoprim et chloramphénicol. Elles étaient moyennement sensibles à l'ampicilline et résistante à la céfazoline.

A partir de 2002, des souches résistantes à l'ampicilline et à la gentamicine apparaissent.

La souche isolée par Ongradi (2002) dans le vagin d'une patiente de 26 ans était sensible à la carbenicilline, la netilmycine, la céfazoline, l'ofloxacine, les tétracyclines et la gentamicine. Elle était moyennement sensible à l'érythromycine et résistante à l'ampicilline, la clindamycine, l'acide nalidique et la furadantine.

Une souche résistante à l'ampicilline, la gentamicine et la céfoxatime a été isolée de plaies d'un patient de 64 ans par Dennison et Morris (2002). Un traitement antibiotique de long terme a été nécessaire, avec des agents de large spectre (gentamicine, vancomycine et imipenem).

Il est intéressant de constater l'apparition de résistance, notamment à la céfotaxime. En effet, Naqvi *et al.*, (1985) avait conseillé cet antibiotique dans le traitement des méningites à bacille gram-négatif.

Stoll *et al.* (2004) décrivent une souche résistante aux céphalosporines.

Tableau 8: Evolution des résistances aux antibiotiques d'*E. sakazakii*

	Urmenyi et Franklin (1961)	Joker <i>et al.</i> (1965)	Monroe <i>et al.</i> (1979)	Farmer <i>et al.</i> (1980)	Kleiman <i>et al.</i> (1981)	Jimenez et Gimenez (1982)	Muyjens <i>et al.</i> (1983)	Arseni <i>et al.</i> (1987)	Willis et Robinson (1988)	Reina <i>et al.</i> (1989)
Ampicilline		S	S	MS	S	S	S		S	R
Amikacine			S		S	S		MS		S
Carbenicilline			S	S	S					S
Céphalothine			MS	R	MS	R				R
Céphamandole					S					S
Céfoxitine					S	R		R		R
Ceftazidime										
Céfuroxime										
Chloramphénicol	S	S	S	MS (R) <sup>a</sup>	S		S		S	S
Colistine				S		S				
Gentamicine			S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem										
Kanamycine		S	S	S (R)	S		S			
Moxalactam										
Ac. nalidixique				S		S			S	
Pipéracilline										
Streptomycine	S	S		S (R)						
Sulfaméthazole					S					
Sulfaméthazole-										
Tétracycline		S	S	S (R)	S	S			S	S
Tobramycine			S		S	S				S

<sup>a</sup> Lorsqu'une indication est mise entre parenthèse c'est que les résultats des auteurs ne sont pas homogènes

	Biering <i>et al.</i> (1989)	Simmons <i>et al.</i> (1989)	Murray <i>et al.</i> (1990)	Hawkins <i>et al.</i> (1991)	Nazarowec -White <i>et al.</i> Farber (1999)	Kuzina <i>et al.</i> (2001)	Lai (2001)	Block <i>et al.</i> (2002)	Ongradi (2002)	Dennison <i>et al.</i> Morris (2002)
Ampicilline	S	S		S	S (R)	R	R	MS	R	R
Amikacine	S	S		S			S			
Carbenicilline	S	S							S	
Céphalothine	R	R		R	R	R				
Céphamandole	S	S								
Céfoxitine	MS	R		S						
Ceftazidime	S	S		S			S (R)			
Céfuroxime	S	S		S						
Chloramphénicol	S	S			S (R)	S	S			
Colistine	S	S								
Gentamicine	S	S	S	S	S		S (R)	S	R	R
Imipenem	S	S		S			S			
Kanamycine					S	S				
Moxalactam	S	S						MS		
Ac. nalidixique										
Pipéracilline	S	S		S			R (S)			
Streptomycine					S	S				
Sulfaméthazole										
Sulfaméthazole-	S	S	S	S	S		S			
Tétracycline	MS	MS		S	S	S	S			
Tobramycine	S	S	S	S						

### *β Mécanismes d'apparition des résistances*

L'ensemble de ces résistances est attribuable à l'augmentation constante de l'antibiorésistance globale observée chez tous les représentants de l'espèce *Enterobacter* (Lai, 2001).

Plusieurs facteurs favorisant l'apparition de l'antibiorésistance peuvent être mis en cause. Une fois la résistance apparue, c'est la pression de sélection qui va permettre sa dissémination.

#### ☞ Rôle des mutations

Les premiers cas de bacilles à Gram négatif résistants à de multiples antibiotiques étaient véhiculés par des plasmides. Un exemple de mutation fréquent est la production de  $\beta$ -lactamases (Tenover, 2001).

Les espèces du genre *Enterobacter* sont parmi celles qui ont le plus de chance de produire des  $\beta$ -lactamases capables d'inactiver les pénicillines à spectre étendu et les céphalosporines (Lai, 2001).

#### ☞ Echange génétique

Cette capacité est connue depuis plus de quarante ans. Chez les bactéries à Gram négatif, l'échange de matériel génétique se fait par conjugaison. Ceci est à l'origine de souches multirésistantes, notamment dans les hôpitaux (Tenover, 2001).

#### ☞ Pressions sélectives

La résistance est probablement accrue par la pression de sélection imposée chez les patients en soins intensifs, d'autant plus que des souches d'*Enterobacter* ont été isolées à partir d'infections de voies urinaires ou des sites de veino-ponction (Dennison et Morris, 2002), ou encore dans des hôpitaux de formation (Lai, 2001).

La résistance aux antibiotiques peut également être d'origine agricole, puisque Lehner et Stephan (2004) rapportent l'identification de nombreux isolats d'*Enterobacter sakazakii* identifiés à partir de prélèvement de sol d'élevage possédant de nombreux opérons de résistance à de nombreux antibiotiques.

## 2. Sensibilité aux désinfectants

*E. sakazakii* est sensible à de nombreux désinfectants, comme l'hypochlorite de sodium à 1%, l'éthanol à 70%, le glutaraldéhyde à 2%, l'iode, les composés phénolés et le formaldéhyde (Agence de santé publique du Canada, 2001).

## 3. Inactivation par des moyens physiques

### a Traitement thermique

Le très grand nombre d'espèces d'*Enterobacter* dans les préparations en poudre pour nourrissons a été expliqué par certains comme consécutifs de la résistance thermique élevée de certaines espèces du genre (Nazarowec-White et Farber, 1997a, Van Acker *et al.*, 2001).

**$\alpha$  Thermotolérance relative**

Certaines souches d'*E.sakazakii* sont parmi les plus thermotolérantes des *Enterobacteriaceae* dans les produits laitiers (Nazarowec-White *et al.*, 1999).

Breeuwer *et al.* (2003) remettent en cause cette affirmation. De même, Iversen *et al.* (2004b) trouvent dans leur étude, portant sur six souches d'*E. sakazakii* d'origine clinique ou alimentaire, que la bactérie présente un profil de thermotolérance semblable aux autres entérobactéries.

En comparant les valeurs D qu'ils avaient obtenues lors d'inactivation d'*E. sakazakii* avec une pasteurisation à haute température et faible durée, à celles obtenues par Piyasena *et al.* (1998) chez *Listeria monocytogenes*, Nazarowec-White *et al.* (1999) ont conclu que *Listeria monocytogenes* est plus thermorésistant à 68°C qu'*E. sakazakii*.

**$\beta$  Valeurs D**

Le temps de réduction décimal D est le temps nécessaire pour détruire 90% de la population bactérienne. Ce temps dépend de la température.

**☞ Etude de Nazarowec-White et Farber (1997a)**

Ainsi, Nazarowec-White et Farber (1997a) ont étudié les résistances à 52, 54, 56, 58 et 60°C, de 10 souches canadiennes (5 souches cliniques, 5 isolées d'aliments), dans des préparations en poudre reconstituées pour enfants.

Ils ont utilisé la formule de poudre de lait pour nourrissons la plus vendue au Canada (38% des parts de marché), et comportant le plus de graisses (3,8 g/100mL) pour leur expérience. La concentration initiale en bactérie était de 10<sup>7</sup>/mL. Les expériences ont été réalisées trois fois, trois jours différents.

Des valeurs de D de 54,8 ; 23,7 ; 10,3 ; 4,2 et 2,5 min ont ainsi été respectivement obtenues pour chaque température (cf tableau 9).

**Tableau 9: valeurs de D(min) ± écart-type pour *Enterobacter sakazakii* dans les formules en poudre reconstituées pour enfants, Nazarowec-White et Farber (1997a)**

Souches	Valeur D (minutes)				
	52°C	54°C	56°C	58°C	60°C
Cliniques	54,8 ± 5,7	36,7 ± 6,1	10,9 ± 1,5	5,5 ± 0,5	3,1 ± 0,1
Isolées d'aliment	54,8 ± 7,2	18,6 ± 1,1	9,8 ± 0,5	3,4 ± 0,3	2,2 ± 0,1
Pool	54,8 ± 4,7	23,7 ± 2,5	10,3 ± 0,7	4,2 ± 0,6	2,5 ± 0,2

Les valeurs D des souches cliniques sont plus élevées que celles des souches isolées d'aliments, mais la différence n'est pas significative (p>0,05).

**☞ Etude de Breeuwer *et al.* (2003)**

Il faut noter que Breeuwer *et al.* (2003) trouvent une valeur D allant de 0,39 à 0,60 minutes (moyenne de 0,48 minutes) à 58°C dans leur étude portant sur 22 souches d'*E. sakazakii*.

Cependant, ils n'ont pas fait leur expérience en utilisant une formule de poudre de lait comme milieu mais dans un tampon phosphate. Cette différence de composition du milieu peut être responsable des divergences de valeurs. La quantité supérieure de lipides, protéines et carbohydrates dans la préparation pour nourrisson pourrait être protecteur pour *E. sakazakii*. Les taux d'inactivation thermique sont peut-être aussi affectés par le lait en poudre, la caséine, ou les protéines du petit lait ( $\beta$ -lactoglobulines,  $\alpha$ -lactalbumines, immunoglobulines...). Le choc froid après le traitement thermique

aurait aussi une influence (Gutler *et al.*, 2005). De plus, ils estiment qu'il y avait une souche particulièrement thermotolérante dans celles testées par Nazarowec-White et Farber (1997a).

#### ☞ Etude d'Edelson-Mammel et Buchanan (2004)

Une autre étude d'Edelson-Mammel et Buchanan (2004), met en évidence l'existence de deux phénotypes distincts concernant la résistance à la chaleur. Leur expérience porte sur 12 souches d'*E. sakazakii* provenant aussi bien d'aliments, de l'environnement que de patients. Le milieu de culture utilisé est une formule de poudre de lait du commerce.

Le différentiel entre les souches peut être jusqu'à vingt fois la valeur entre les plus thermotolérantes et les plus thermosensibles. La distribution de la thermotolérance est bimodale, avec la moitié des souches ayant des valeurs D de moins de 0,83 minutes, et l'autre moitié ayant des valeurs de D de plus de 5 minutes.

#### ☞ Etude d'Iversen *et al.* (2004b)

Iversen *et al.* (2004b) ont également fait une étude sur six souches pour déterminer les valeurs D. Ils ont étudié des souches capsulées ou non, dans de la poudre de lait reconstituée et dans un bouillon de Tryptone de Soja. Ils ont fait leurs expériences de 54 à 62°C. Leurs valeurs de D sont dans les limites des publications précédentes (tableau 10).

**Tableau 10: valeurs de D (minutes) ± écart-type pour *E. sakazakii* dans les formules en poudre reconstituées (Iversen *et al.*, 2004b)**

Milieu	Souches	Valeur D (minutes)				
		54°C	56°C	58°C	60°C	62°C
Bouillon	Type	14,9 ± 0,65	2,7 ± 0,08	1,3 ± 0,28	0,9 ± 0,17	0,4 ± 0,08
	Capsulée	10,2 ± 3,56	1,2 ± 0,01	1,7 ± 0,38	0,2 ± 0,06	0,2 ± 0,13
Lait	Type	16,4 ± 0,67	5,1 ± 0,27	2,6 ± 0,48	1,1 ± 0,11	0,3 ± 0,12
	Capsulée	11,7 ± 5,80	3,9 ± 0,06	3,8 ± 1,95	1,8 ± 0,82	0,2 ± 0,11

Etant donné les variations d'écart type importantes, il n'y a pas de différence significative entre les souches capsulées ou non, et la poudre de lait reconstituée et le bouillon de culture (Iversen *et al.*, 2004b).

En effectuant une moyenne des valeurs obtenues dans les différentes études, *E. sakazakii* à une valeur D à 58°C de 2,57 minutes.

#### χ Valeur z

La valeur z est l'augmentation de température qui permet de détruire d'un coefficient dix la valeur de D.

La valeur de z totale calculée de l'étude de Nazarowec-White et Farber (1997a) était de 5,82°C. De même que précédemment, la valeur z des souches cliniques est plus élevée que celle des souches isolées d'aliments, mais la différence n'est pas significative (p>0,05).

Breeuwer *et al.* (2003) trouvent une valeur z de 3,3°C en moyenne.

Edelson-Mammel et Buchanan (2004) n'ont déterminé la valeur z que pour la souche la plus résistante de leur cohorte. Celle-ci était de 5,6°C.

Iversen *et al.* (2004b) trouvent une valeur z de 5,7°C.

### ☞ Valeurs D et z de la littérature

Le tableau 11 présente u récapitulatif des valeur D et z qui ont été trouvées dans la littérature.

**Tableau 11: Valeurs D (minutes) à 58°C et z données dans la littérature**

	Nazarowec-White et Farber (1997a)	Breeuwer <i>et al.</i> (2003)	Edelson-Mammel et Buchanan (2004)	Iversen <i>et al.</i> (2004b)
D (min) à 58°C	4,2 ± 0,6	0,48	0,83 5	2,35
z (°C)	5,8	3,3	5,6	5,7

### δ Pasteurisation

#### ☞ Pasteurisation classique

En utilisant les résultats de l'étude de Nazarowec-White et Farber (1997a), (D60°C : 2,5 min), il faudrait chauffer à 60°C pendant 15 ou 17,5 minutes, pour obtenir respectivement une réduction du nombre d'*E. sakazakii* de 6 et 7 log. *E. sakazakii* ne survivrait pas au procédé de pasteurisation (15 secondes à 71,7°C), dans une poudre de lait (Plus de 11D).

Iversen *et al.* (2004b) font le même type de simulation pour trouver que le temps de réduction décimal prédictible est de 0,7 secondes à 71,2°C. Ainsi, une réduction de 21 log serait obtenue en pasteurisation à haute température (71,2°C) et temps court (15 secondes).

La souche la plus résistante isolée par Edelson-Mammel et Buchanan (2004) est totalement inactivée lorsqu'elle est exposée à une température de 70°C ou plus. Ceci a été déterminé en réhydratant de la poudre de lait avec de l'eau à différentes températures. A partir de 70°C, l'inactivation est de 4 D ou plus.

#### ☞ Pasteurisation à haute température et temps court

Les résultats des simulations en pasteurisation à haute température et temps court, de Nazarowec-White *et al.* (1999), ont permis de confirmer qu'un traitement de 16 secondes à 68°C permet (au premier percentile) une réduction de 5 log d'*E. sakazakii*.

Les percentiles correspondent au pourcentage de résultats générés qui sont inférieurs ou égaux à la réduction logarithmique associée. Les percentiles les plus bas sont associés à des estimations inférieures et plus conservatives de réductions logarithmiques pour des conditions de traitement données. Ainsi, l'utilisation du modèle conservatif permet de donner des prédictions sûres, mais la validation complète du modèle pour *E. sakazakii* nécessitera des essais supplémentaires.

Un modèle linéaire a été mis au point pour décrire l'inactivation d'*E. sakazakii* par la chaleur dans du lait entier de vache dans un pasteurisateur à haute température et temps d'exposition court. L'Effet Pasteurisateur (EP ; effet léthal intégré) a été obtenu en convertissant les temps à différentes températures dans différentes sections du pasteurisateur en temps équivalent à la température de référence de 72°C. L'EP a ensuite été exprimé suivant une fonction linéaire de logarithme du pourcentage de bactéries vivantes. La corrélation ( $r^2$ ) entre les trois essais variait de 0,941 et 0,959. Les variations inter-essais ont été intégrées grâce à un modèle mathématique (Nazarowec-White *et al.*, 1999).

Il est clair qu'*E. sakazakii* ne survivrait pas à la pasteurisation, dès lors, les contaminations des poudres de laits pour nourrissons se font donc lors de manquements à l'hygiène après la pasteurisation (Iversen *et al.*, 2004b).

## **b** Inactivation par les micro-ondes

Le mécanisme exact d'inactivation par les micro-ondes reste inconnu. Ce procédé est simple, économique et permet de réduire la charge bactérienne, et peut être utilisé sur les poudres de lait pour nourrissons, par exemple. Il faut veiller à refroidir correctement les solutions après (Kindle *et al.*, 1996).

Kindle *et al.* (1996) ont étudié la survie de bactéries, dont *E. sakazakii* dans cinq échantillons différents de lait reconstitué à partir de poudre de lait (Pré-Aptamil®, Milumil®, Aptamil®, Prematil® et Prematil LIP 43®). Les échantillons font 150 mL et la concentration initiale est de  $10^5$  cfu/mL. La puissance du micro-onde est de 600 W, et la fréquence de 2450 Hz. Les échantillons sont chauffés jusqu'à ébullition (température interne moyenne de 82°C à 93°C). Les tests sont répétés quinze fois.

Le taux d'inactivation des bactéries dépend des espèces d'entérobactéries. Concernant *E. sakazakii*, l'inactivation est totale (0 cfu/mL cultivés) pour quatre des cinq échantillons. Le cinquième échantillon (Milumil®) contient encore 20 cfu/mL après inactivation, mais cela constitue un risque minime. Ces différences peuvent s'expliquer par les compositions différentes des préparations en poudre pour nourrissons.

## **c** Ionisation

Aucune publication scientifique ne mentionne la sensibilité d'*E. sakazakii* à l'ionisation. La stérilisation des préparations en poudre pour nourrissons en paquets ou sachets semble possible seulement par ionisation. Toutefois, aux doses requises pour permettre l'inactivation d'*E. sakazakii* à l'état sec, la technologie ne paraît pas réalisable compte tenu des altérations organoleptiques du produit (Agence de santé publique du Canada, 2001).

## **d** Dessiccation

Breeuwer *et al.* (2003) ont montré qu'*E. sakazakii* est très résistant à la dessiccation comparé aux autres *Enterobacteriaceae*. Ils ont testé 22 souches d'*E. sakazakii*, dont la concentration initiale était de  $10^7$  bactéries par ml, et les ont mises dans un incubateur à 25°C, puis 45°C, pendant 46 jours. Le taux d'humidité relative de l'air était de 20,7%, et dans ces conditions, les échantillons étaient secs en une heure.

Les bactéries en phase stationnaire de croissance sont plus résistantes que celles en phase exponentielle de croissance. En effet, à 25°C, le nombre de bactéries a diminué de 1 à 1,5 log et un peu plus à 45°C (phase stationnaire de croissance).

L'ajout de tréhalose améliore la survie des bactéries en phase exponentielles de croissance. Ce disaccharide jouerait un rôle de stabilisant membranaire (phospholipides et protéines ; Welsh et Herbert, 1999).

La concentration en tréhalose est cinq fois supérieure ( $0,23\mu\text{mol/L}$ ) chez les bactéries en phase de croissance stationnaire et soumises à la dessiccation, que chez les bactéries non soumises à la dessiccation ( $0,04\mu\text{mol/L}$ ). Le tréhalose n'est détectable, ni chez les bactéries en phase exponentielle de croissance, ni chez *E. coli* (Breeuwer *et al.*, 2003).

## **e** Stress osmotique

L'étude de Breeuwer *et al.* (2003) a permis de mettre en évidence que *E. sakazakii*, en phase de croissance stationnaire, est résistante au stress osmotique, comparée aux autres *Enterobacteriaceae*.

Ainsi, dans une bouillon cœur-cerveau avec 40% de sorbitol ( $A_w$  0,934), les souches les plus résistantes d'*E. sakazakii* ne diminuent que d'un log décimal en deux mois (les moins résistantes diminuent de 4 log, avec une charge initiale de  $10^7$  bactéries par ml). Avec *E. agglomerans*, *E. sakazakii* est une des espèces les plus résistantes des *Enterobacteriaceae*.

Lorsque la concentration de sorbitol atteint 75% ( $A_w$  0,811), deux des 22 souches d'*E. sakazakii* sont encore retrouvées après 4 semaines.

L'ajout de bétaine de glycine augmente les capacités de croissance de la bactérie en situation de stress osmotique important.

Les souches d'*E. sakazakii* en phase exponentielle de croissance sont, elles, très sensibles au stress osmotique.

La bonne résistance d'*E. sakazakii* à la dessiccation et au stress osmotique, ainsi que sa capacité à se multiplier à 45°C, montre que dans les environnements secs et chauds, tels qu'autour des équipements de séchage des usines de poudre de lait, elle a un avantage de croissance compétitif comparé aux autres membres des *Enterobacteriaceae*.

## f Monocaprylin

L'acide caprylique est un acide gras naturel présent dans le lait humain et de vache, qui est reconnu comme sain par la FDA. Ce constituant semble être un agent antimicrobien naturel intéressant (effet significatif avec  $p < 0,05$ ), qui pourrait être incorporé dans les poudres de lait (Nair *et al.*, 2004).

Cinq souches d'*E. sakazakii* sont étudiées dans du lait reconstitué à partir de poudre de lait commerciale. La concentration initiale est de  $10^6$  cfu/mL, et l'inactivation par du monocaprylin (25 mmol/L et 50 mmol/L) est étudiée à différentes températures (4, 8, 23 et 37°C) pendant des durées variables (1, 6 et 24 heures).

L'effet inhibiteur du monocaprylin est surtout marqué à 23 et 37°C. Par exemple, une diminution de 4 logarithmes décimaux est notée en 1 heure à 23 et 37°C avec une concentration de 25 mmol/L, tandis qu'à 4 et 8°C, la réduction du nombre de bactérie est de 1 à 1,5 log après 6 heures. De même, avec une concentration en monocaprylin de 50 mmol/L, la population d'*E. sakazakii* diminue de log en 1 heure d'incubation à 23 et 37°C, alors qu'il faut 24 heures pour obtenir le même niveau à 4 et 8°C.

L'effet significativement inférieur d'inactivation par le monocaprylin à basse température peut s'expliquer par sa solubilité inférieure dans le lait reconstitué à ces températures, ou par une modification de la conformation des acides gras et de la fluidité de la membrane bactérienne.

Il faut noter, que si le monocaprylin à 25 mmol/L permet la diminution de la charge bactérienne en une heure à 23°C, *E. sakazakii* recommence à se multiplier après 6 heures. Le stockage à température ambiante de lait reconstitué avec du monocaprylin à cette concentration peut s'avérer être risqué.

En conclusion, le monocaprylin est un agent inhibiteur d'*E. sakazakii*, à la concentration de 50 mmol/L, et à des températures supérieures à 23°C (Nair *et al.*, 2004).

## 4. Survie dans l'environnement et les aliments

*E. sakazakii* survit 10 jours dans du lait de beurre et 7 à 21 jours dans le fromage. La bactérie survit facilement dans les réservoirs d'eau des appareils médicaux (oxygénateurs, nébuliseurs, incubateurs ; Agence de santé publique du Canada, 2001).

Il apparaît qu'*E. sakazakii* ne soit pas capable de croître dans une préparation de céréale au riz déshydratée pour nourrissons reconstituée avec du jus de fruit (Richards *et al.*, 2005).

- ☠ *Enterobacter sakazakii* est plus sensible aux antibiotiques que les autres bactéries du genre *Enterobacter*.
- ☠ Des antibiorésistances apparaissent, notamment à l'ampicilline, les céphalosporines et la gentamicine (chloramphénicol et tétracycline).
- ☠ *E. sakazakii* est sensible aux désinfectants usuels.
- ☠ *E. sakazakii* est thermotolérant
  - ☠ La valeur D moyenne est de 2,51 minutes à 58°C ;
  - ☠ La valeur z est d'environ 5°C ;
  - ☠ La bactérie ne survivrait pas à la pasteurisation, si le lait est contaminé, il s'agit de recontaminations après le traitement thermique.
- ☠ *E. sakazakii* est inactivé par les micro-ondes.
- ☠ *E. sakazakii* est sensible à l'ionisation, mais le procédé n'est pas réalisable.
- ☠ *E. sakazakii* est très résistant à la dessiccation et au stress osmotique.
- ☠ Le monocaprylin à 50 mmol/L inactive *E. sakazakii* à des températures supérieures à 23°C.

## **D / METHODES DE DETECTION**

A ce jour, il n'existe pas de méthode standardisée pour *E. sakazakii* au niveau du CEN ou de l'ISO, à l'exception d'un projet EN/ISO applicable d'abord aux préparations en poudre pour nourrisson et, par la suite aux aliments (fiche AFSSA).

### **1. Techniques pour la détection d'*E. sakazakii* dans tous les milieux**

#### **a Technique recommandée par la FDA (2002a)**

Une méthode d'isolement et de dénombrement est recommandée par la FDA depuis 2002. Cette méthode prend cinq jours et est basée sur l'approche du NPP (Nombre le Plus Probable).

Cette méthode est utilisée pour déterminer la présence ou l'absence d'*E. sakazakii* dans les matières premières. La quantification n'est réalisée que dans les produits finis (FDA, 2002b).

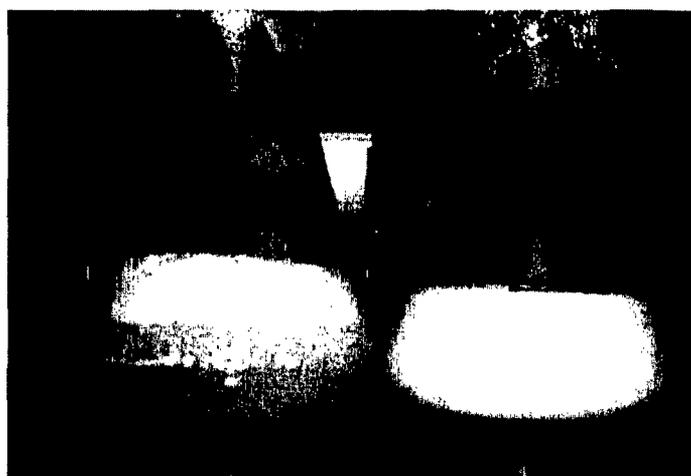
Elle est basée sur un enrichissement à trois tubes, pour que le faible niveau de contamination du micro-organisme dans le produit testé puisse être détecté et quantifié. L'échantillon doit faire au minimum 333 g (3x100 g ; 3x10 g ; 3x1 g).

Avant de retirer les échantillons de leur pot de transport, il faut stériliser les bords du couvercle, ainsi que la cuillère servant à les prendre. Il convient de peser aseptiquement trois fois 100 g, 10 g et 1 g de la poudre de lait, et de les transvaser respectivement dans des Erlenmeyer de 2 litres, 250 ml et 125 ml.

#### ***α* Pré-enrichissement :**

Il faut diluer au dixième avec de l'eau stérilisée chauffée à 45°C, et remuer doucement avec la main, jusqu'à ce que la poudre soit totalement dissoute, puis laisser incuber durant la nuit à 36°C.

Cette étape est la même dans les méthode de Muytens *et al.* (1988) et de Nazarowec-White et Farber (1997b), sauf qu'ils réhydrataient la poudre avec de l'eau peptonée tamponnée, et non pas avec de l'eau distillée.



**Figure 2: Erlenmeyer de gauche non mixé, de droite mixé (FDA, 2002)**

$\beta$  *Enrichissement :*

Il convient de récupérer 10 ml de chaque suspension et les ajouter à 90 ml de bouillon d'enrichissement pour *Enterobacteriaceae*, dans un récipient stérile, puis de laisser incuber une nuit à 36°C.

$\chi$  *Sélection :*

Après avoir mélangé doucement chaque récipient, on procède à différentes sélections sur gélose.

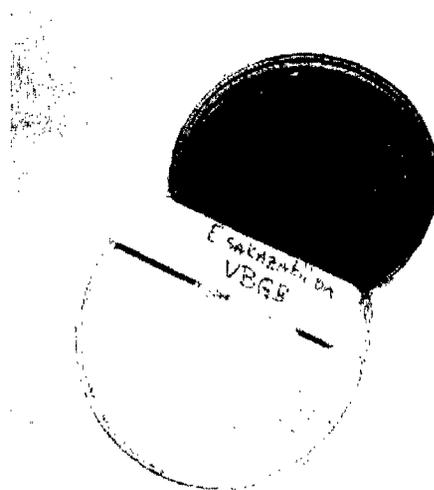
☞ Méthode d'étalement direct :

Cela consiste à inoculer deux géloses VRGB (Bile Glucosée Violette et Rouge), en étalant 0,1 ml de chaque enrichissement régulièrement.

☞ Méthode de d'ensemencement direct :

Cela consiste à inoculer deux géloses VRGB avec chaque enrichissement, en striant des boucles de 3 mm (10  $\mu$ l) sur au moins trois quadrants de la plaque, pour isoler des colonies individuelles.

Il faut ensuite laisser incuber les boîtes de pétri à 36°C pendant la nuit, et les observer pour voir s'il y a des colonies de morphologie typique d'*E. sakazakii*.



**Figure 3 : Gélose VRBG, les colonies typiques sont violettes, entourées par un halo violet d'acides biliaries précipités (FDA, 2002)**

$\delta$  *Identification :*

Cette méthode ne permet la sélection que des *Enterobacteriaceae* et est non spécifique d'*E. sakazakii*. Il faut donc prendre cinq colonies supposées être d'*E. sakazakii* et les cultiver en les étalant sur une gélose au Tryptone de Soja et incuber à 25°C pendant 48-72 heures, pour mettre en évidence la production de pigment jaune.

Ensuite il faut sélectionner uniquement les colonies pigmentées en jaune, et les identifier en utilisant la méthode biochimique de galerie API 20E. Pour avoir une identification positive d'*E. sakazakii*, le test à l'oxydase doit être inclus.



Figure 4: Gélose de Tryptone de Soja, les colonies typiques sont pigmentées en jeune après 48-72 heures d'incubation à 25°C (FDA, 2002)

#### $\varepsilon$ *Dénombrement :*

Pour calculer le NPP d'*E. sakazakii* par gramme d'échantillon, il convient de se baser sur le nombre de tubes de chaque dilution dans lequel sa présence a été confirmée.

Insérer schéma résumant technique

#### $\phi$ *Limites*

Cette méthode n'est pas sélective pour *E. sakazakii* et l'utilisation combinée du bouillon d'enrichissement en *Enterobacteriaceae* et de la gélose VRBG pourrait permettre à d'autres *Enterobacteriaceae* de supplanter *E. sakazakii* et donc induire des résultats faux négatifs (Iversen *et al.*, 2004a).

De plus, il semble que la galerie API 20E pourrait donner des résultats faux négatifs concernant *E. sakazakii*. Le nombre limité de tests effectués donne, par exemple, un pourcentage d'homologie supérieur pour *Pantoea* spp. comme étant *E. sakazakii*, avec la galerie API 20E, qu'en utilisant le système ID 32E (Iversen *et al.*, 2004a).

#### **b** Isolément d'*E. sakazakii* par des milieux sélectifs

Ces méthodes se basent sur les caractéristiques de croissance d'*E. sakazakii* et la présence d' $\alpha$ -glucosidase. D'autres *Enterobacteriaceae* possèdent cette même enzyme, mais beaucoup produisent du H<sub>2</sub>S (*Citrobacter*, *Salmonella*, *Edwardsiella* et *Proteus*).

#### $\alpha$ *Marqueurs de l' $\alpha$ -glucosidase*

Le 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside est un marqueur possible (Muytjens *et al.*, 1984). Cependant, il diffuse aisément sur gélose ce qui gêne pour la mise en évidence de son pigment jaune une fois hydrolysé (Oh et Kang, 2004).

Oh et Kang (2004) ont donc choisi le 4-méthyl-ombelliféryl- $\alpha$ -D-glucoside, qui produit des colonies très brillantes fluorescentes à la lampe UV (365 nm), et qui ne diffuse pas facilement.

Iversen *et al.* (2004a) ont choisi d'utiliser le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ ,D-glucopyranoside (X $\alpha$ Glc), qui est hydrolysé par l' $\alpha$ -glucosidase et donne du 5-bromo-4-chloro-indolol, qui se dimérise en présence d'oxygène pour former un pigment bromo-chloro-indigo, visible à l'œil nu.

### $\beta$ Milieu OK (Oh et Kang, 2004)

Comme *E. sakazakii* n'est pas la seule bactérie produisant de l' $\alpha$ -glucosidase, les auteurs ont associé un milieu sélectif. De plus, ils ont essayé de réduire au maximum le bruit de fond produit par les autres bactéries, pour réduire les faux positifs.

Le milieu mis au point est constitué de la façon suivante : 20 g de tryptone, 1,5 g de sels biliaires numéro 3, 15,0 g d'agar, 1,0 g de thiosulfate de sodium, 1 g de citrate ferrique, et 50 mg par litre de 4-méthyl-ombelliféryl- $\alpha$ -D-glucoside. Le thiosulfate de sodium et le citrate ferrique ont été ajoutés comme marqueurs sélectifs secondaires pour différencier les *Enterobacteriaceae* producteurs de H<sub>2</sub>S.

Le temps d'incubation et la température optimaux sont de 24 heures à 37°C.

Les colonies fluorescentes sont ensuite identifiées par une galerie API 20E et test oxydase.

Au total, 48 colonies fluorescentes ont été observées, et toutes ont été confirmées comme étant *E. sakazakii* (100%), tandis qu'aucune des 44 colonies non fluorescentes n'ont été identifiées comme étant *E. sakazakii*. Cette méthode semble donc à la fois sensible et spécifique.

### $\chi$ Milieu DFI (Iversen et al., 2004a)

En plus du X $\alpha$ Glc comme révélateur de l' $\alpha$ -glucosidase constitutive d'*E. sakazakii*, les auteurs ont ajouté un indicateur d' H<sub>2</sub>S (thiosulfate de sodium et citrate d'ammonium ferrique), pour différencier les organismes ayant une faible activité  $\alpha$ -glucosidase et H<sub>2</sub>S positifs (les mêmes que pour le milieu OK), d'*E. sakazakii*. Le déoxycholate de sodium est l'agent sélectif des *Enterobacteriaceae*.

#### ⌘ Préparation du milieu

Le déoxycholate de sodium (1 g/L), le X $\alpha$ Glc (0,1 g/L), le thiosulfate de sodium (1 g/L) et le citrate d'ammonium ferrique (1 g/L) sont dissous dans de l'eau distillée et ajoutés à la gélose de tryptone de soja (40 g/L). Le milieu complet (pH 7,3) est chauffé au bain-marie pour dissoudre tous les composants et mis dans l'autoclave 15 minutes à 121°C. La présence d'une  $\alpha$ -glucosidase inductible dans des bactéries sélectionnées n'étant pas *E. sakazakii*, est testée en ajoutant du maltose (1 g/L) au milieu

Les souches sont incubées à 37°C pendant 24 heures, et seules les colonies qui sont entièrement vert-bleu sont considérées comme positives présomptives.

#### ⌘ Sensibilité et spécificité du milieu

La sensibilité est testée en utilisant 95 souches connues d'*E. sakazakii*, d'origine variée (clinique, environnementale, alimentaire). Toutes ces colonies se sont révélées entièrement bleues après 24 heures. La sensibilité est de 100%.

La spécificité est testée en utilisant 148 souches d'autres *Enterobacteriaceae*. En général, ces colonies étaient blanches, mais certaines étaient roses (*Serratia* spp.), jaunes (*Escherichia hermannii*), ou noires (souches productrices d' H<sub>2</sub>S). Quatre isolats ont développé un centre de colonie bleu (*Leclercia adecarboxylata*, *Citrobacter koseri* et deux souches de *Proteus vulgaris*), et dix-neuf étaient faux positifs (16 souches sur 18 d'*Escherichia vulgaris*, 2 souches sur 3 de *Pantoea* spp. et une souche sur 8 de *C. koseri*).

L'ajout du maltose a provoqué des souches de *C. koseri*, *K. pneumoniae* et *E. areogenes* entièrement bleues, alors qu'elles étaient blanches sans maltose. Ces bactéries n'expriment pas de façon constitutive l' $\alpha$ -glucosidase, et ne seraient donc pas des faux positifs sur le milieu DFI.

La spécificité du milieu est de 87,2%.

### ⌘ Comparaison avec les autres méthodes

En parallèle, les souches utilisées ont été identifiées par la méthode standard de la FDA. De cette façon, 31 faux positifs ont été obtenus (contre 19 avec le milieu DFI ; Iversen *et al.*, 2004a).

Dans une autre étude d'Iversen et Forsythe (2004a) recherchant *E. sakazakii* et d'autres *Enterobacteriaceae* dans le lait en poudre et d'autres aliments, et utilisant le milieu DFI et la méthode standard en parallèle. Le milieu DFI a été plus sûr que la méthode recommandée par la FDA. Il y avait 72,9% de faux positifs en utilisant la méthode FDA, contre 38,5% avec le milieu DFI (sur 486 échantillons alimentaires).

Aucun échantillon positif par la méthode conventionnelle n'était négatif avec le milieu DFI. *E. sakazakii* a été isolé de trois poudres de lait (contre aucune avec la méthode FDA), deux aliments déshydratés pour nourrissons, 29 herbes et épices et 14 ingrédients secs (graines, fruits...) supplémentaires avec le milieu DFI, par rapport à la méthode traditionnelle.

De plus, ce milieu permet l'identification d'*E. sakazakii* deux jours plus tôt qu'avec la méthode de la FDA (Iversen *et al.*, 2004a ; Iversen et Forsythe, 2004a).

### c Méthode moléculaire

Lehner *et al.* (2004a), ont mis au point une méthode de PCR basée sur l'amplification du gène codant le rRNA 16S pour détecter et identifier *E. sakazakii* dans différentes sources.

#### α Conditions de réaction PCR

##### ⌘ Sondes

En étudiant 14 souches d'*E. sakazakii* de provenance variée (environnement, poudre de lait, patient, poudre de fruit...), les auteurs ont trouvé des amorces spécifiques positionnées dans les régions les plus conservées du gène soit 88-107 (Esakf : 5' aga gtt tga tym tgg gtc 3') et 1017-998 (Esakr : 5' cak aaa gga ggt gat cc 3') générant un amplicon de 929 paires de bases (pb).

##### ⌘ Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel, d'un volume de 50 µl, est constitué des amorces à une concentration de 10 pmol/L, de 2 unités de *Taq* polymérase et de 200 µmol/L de dNTPs.

##### ⌘ Cycle thermique

Le cycle thermique comprend une phase initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, suivie de 29 cycles comprenant la dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, la température d'hybridation pendant une minute et l'élongation à 72°C pendant une minute et trente secondes. Le cycle est complété par une phase d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Les conditions d'amplification ont été optimisées (augmentation de la spécificité) en augmentant graduellement la température d'hybridation de 52°C à 64°C. Les produits de la réaction ont été révélés sur gel d'agarose (1,5%) par coloration au bromure d'éthidium et observation sous transilluminateur UV.

## $\beta$ Validité de la méthode

### ☞ Sensibilité et spécificité

Cette méthode permet d'identifier les souches d'*E. sakazakii* provenant des deux lignes phylogéniques.

La méthode a permis de détecter les 45 souches d'*E. sakazakii* testées toutes, tandis qu'elle a donné des résultats négatifs pour les 28 souches n'étant pas d'*E. sakazakii*. La sensibilité et la spécificité seraient de 100% chacune.

### ☞ Limite de détection

Les deux lignées d'*E. sakazakii* ont été correctement identifiées à une quantité minimale d'ADN de 10 pg.

Il n'y a pas d'influence significative sur les performances de la méthode (limite de détection et rendement) jusqu'à la présence de 200 ng d'ADN non cible dans le mélange réactionnel.

## 2. Dans l'environnement

### a Mise en évidence du pigment jaune et de l' $\alpha$ -glucosidase

Kandhai *et al.* (2004b) ont mis au point une méthode de détection rapide d'*E. sakazakii* (5 jours au total) dans les échantillons environnementaux d'usines de production de poudre de lait. Elle se base sur la mise en évidence conjointe de la coloration jaune des colonies cultivées sur un milieu au tryptone de soja, et de l' $\alpha$ -glucosidase constitutive, qui se fait par une méthode colorimétrique révélée en 4 heures.

#### $\alpha$ Détection

Dans leur étude, Kandhai *et al.* (2004b) ont étudié 152 échantillons environnementaux provenant de trois usines différentes productrices de poudre de lait.

Pour détecter les colonies suspectées, ils ont utilisé une méthode semblable à celle de la FDA.

Ainsi, 65% des échantillons ont été analysés sans pré-enrichissement préalable et 35% avec. Le pré-enrichissement a été réalisé en diluant au dixième les échantillons dans de l'eau peptonée tamponnée à pH 7,2, puis en laissant incuber 18 à 20 heures à 37°C. Dans les deux cas, *E. sakazakii* a été détecté, ce qui tend à prouver que la bactérie peut être isolée avec ou sans pré-enrichissement initial.

Les échantillons ont été ensemencés sur une gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL), après cette première étape, ou directement, et incubés à 37°C pendant 20-24 heures.

#### $\beta$ Identification

##### ☞ Coloration jaune

Les colonies poussant sur la gélose VRBL ont été repiquées sur une gélose Tryticase-soja, et incubées 48 heures à température ambiante pour mettre en évidence la coloration jaune. Les colonies pigmentées sont testées pour l'activité oxydase et seules les colonies oxydases négatives sont gardées.

### ☞ Mise en évidence de l' $\alpha$ -glucosidase

Les colonies sont mises en suspension dans 2 ml de NaCl à 0,85% et 2 ml d'une solution de paranitrophénol- $\alpha$ -D-glucopyranoside sont ajoutés (la concentration de cette solution est de 5 g/L de soluté, avec 1,15 mol/L de tampon phosphate pour un pH de 7,0). Le tout est incubé à 37°C dans un bain-marie. La mesure colorimétrique de la formation de paranitrophénol (PNP) jaune est effectuée après 4 heures avec un spectrophotomètre à 405 nm. Le seuil de positivité est fixé à une absorption de 0,3 ce qui est équivalent à 16  $\mu$ mol/L de PNP.

#### $\chi$ *Validité de la méthode*

Les auteurs (Kandhai *et al.*, 2004b) ont testé leur méthode sur 152 échantillons provenant de trois usines différentes. Ils ont procédé à plusieurs étapes avant de conclure que la recherche de ces seuls deux caractéristiques étaient une méthode de dépistage de routine utile.

Ils ont identifié toutes les colonies isolées sur la gélose VRBL avec la galerie API 20E. Certaines colonies n'ont pas pu être identifiées ainsi.

La mise en évidence de l' $\alpha$ -glucosidase n'est significative que précocement. En effet, après 24 heures, d'autres bactéries ont une activité  $\alpha$ -glucosidase. De plus, des bactéries identifiées par la galerie API 20E comme étant *E. sakazakii* avec un pourcentage d'homologie de 80% n'étaient pas productrices d' $\alpha$ -glucosidase. Ainsi, si la détection de l' $\alpha$ -glucosidase se fait dans les 4 heures, aucun résultat faux-positif n'est présent, la spécificité est de 100% dans ces conditions.

Une technique de ribotypage a été utilisée pour confirmer la nature des bactéries. Les trois isolats non producteurs d' $\alpha$ -glucosidase n'ont pas été identifiés comme étant *E. sakazakii*, alors qu'ils l'étaient par la galerie API. Aucun résultat faux négatif n'a été observé, puisque les souches non productrices d' $\alpha$ -glucosidase n'étaient par des souches d'*E. sakazakii*. La sensibilité semble être de 100%.

Les auteurs pensent donc que la mise en évidence conjointe du pigment jaune et de l' $\alpha$ -glucosidase sont deux critères spécifiques et sensibles.

### **b** Méthode basée sur l'enrichissement sélectif sur bouillon de tryptone au lauryl sulfate (Guillaume-Gentil *et al.* 2005)

#### $\alpha$ *Principe*

Le principe de la méthode d'enrichissement sélectif est d'augmenter la sélectivité du bouillon de tryptone au lauryl sulfate pour *E. sakazakii*, qui est communément utilisé comme bouillon semi-sélectif d'enrichissement pour coliformes. A cette fin, du NaCl à 0,5 mol/L est ajouté, comme *E. sakazakii* est particulièrement résistante au stress osmotique comparée aux autres membres des *Enterobacteriaceae*. La vancomycine (antibiotique) est ajoutée pour limiter la croissance de bactéries à Gram positif (en particulier *Bacillus* spp. et les lactobacilles). Enfin, une température d'incubation de 45  $\pm$  0,5°C est choisie, puisqu'*E. sakazakii* se multiplie encore à 47°C. Le temps d'incubation est de 24 heures.

Les colonies poussant sur ce milieu sont ensuite testées pour le pigment jaune, en utilisant une méthode de révélation plus rapide que la méthode standard. Les colonies sont replantées sur une gélose au Tryptone de Soja avec sels biliaires et exposées pendant 24 heures à 37°C à une lumière artificielle.

Enfin, les colonies jaunes sont testées pour l' $\alpha$ -glucosidase et leur nature est confirmée par la galerie API 20E et par ribotypage. La méthode prend 4 jours au total.

Un enrichissement d'une nuit dans de l'eau peptonée tamponnée peut être réalisé préalablement à 37°C, ce qui rallonge la méthode d'un jour.

## $\beta$ Résultats

### ☪ Cultures pures

Les auteurs ont testé 99 souches d'*E. sakazakii*, la plupart provenant d'usines de fabrication de poudre de lait pour nourrissons, et 39 souches d'autres Entérobactéries pouvant éventuellement poser un problème lors de l'identification.

Les 99 souches d'*E. sakazakii* ont poussé sur le milieu mis au point, tandis que 35 des autres *Enterobacteriaceae* n'ont pas poussé. Parmi les quatre souches poussant, *E. hermannii*, *E. cloacae*, *Klebsiella oxytoca* et *K. pneumoniae* sont retrouvées, mais aucune d'entre-elles ne produit de pigment jaune par la suite. La distinction d'avec *E. sakazakii* est donc aisée.

### ☪ Echantillons environnementaux

Les performances du bouillon créé ont ensuite été estimées par l'étude de 192 échantillons environnementaux provenant de quatre usines de fabrication de poudre de lait. Les auteurs ont réalisé leur méthode avec et sans l'enrichissement préalable, et l'ont comparé à la méthode décrite dans le chapitre précédent (développée par Khandai *et al.*, 2004b).

La méthode directe a permis d'isoler 75 souches d'*E. sakazakii*, la méthode avec enrichissement préalable 73 et la méthode de référence (c'est-à-dire celle de Kandhai *et al.*, 2004b) 51. Le nombre total d'échantillons positifs pour *E. sakazakii* était de 88. Cette différence considérable est certainement due à une distribution non homogène d'*E. sakazakii* dans les échantillons, qui avaient été fragmentés pour permettre leur analyse par toutes ces différentes méthodes. Cependant, les deux méthodes donnent des résultats faux négatifs, et une amélioration de la sensibilité doit être envisagée.

La sensibilité semble être de 85%.

Les auteurs conseillent de préférer la méthode avec enrichissement préalable, bien qu'elle soit un peu plus longue, car elle peut être combinée avec la recherche de salmonelles.

## 3. Dans les aliments

### a Méthode utilisée par Muyltjens *et al.* (1988)

Le principe est le même que dans la méthode de la FDA, sauf que le pré-enrichissement est fait dans de l'eau peptonée tamponnée, et que les échantillons de poudre de lait font 1, 10 et 100 g. L'identification se fait grâce à la galerie API 20E, la mise en évidence du pigment jaune, de la DNase extra-cellulaire et la réaction positive de l' $\alpha$ -glucosidase.

### b Mise en évidence de l' $\alpha$ -glucosidase

Leuschner *et al.* (2004) ont mis au point une méthode sélective d'isolement d'*E. sakazakii* dans les poudres de lait pour nourrissons. Elle est basée sur la mise en évidence de l' $\alpha$ -glucosidase spécifique de la bactérie. La durée de la méthode est de 4 jours.

### $\alpha$ Détection des *Enterobacteriaceae*

Un pré-enrichissement est fait en diluant au dixième l'échantillon dans l'eau peptonée tamponnée et en incubant 24 heures à 37°C. Cette solution est ensuite diluée au dixième dans le milieu d'enrichissement des *Enterobacteriaceae* et incubée 24 heures à 37°C.

### $\beta$ Isolement d'*E. sakazakii*

Après incubation, les bouillons sont ensemencés sur une gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG), incubée 24 heures à 37°C et une gélose nutritive standard à laquelle du 4-méthyl-ombelliféryl  $\alpha$ -D-glucoside ( $\alpha$ -MUG) a été ajouté, incubée 24 heures à 37°C, puis 24 heures à température ambiante.

Lorsque les colonies sur la gélose VRBG ont des caractéristiques morphologiques compatibles avec *E. sakazakii*, elles sont repiquées sur la gélose nutritive standard additionnée de l' $\alpha$ -MUG.

Les colonies cultivées sur la gélose standard additionnée d' $\alpha$ -MUG sont observées à la lumière du jour pour chercher une coloration jaune, et à la lumière UV pour rechercher une fluorescence, signant la présence de l' $\alpha$ -glucosidase.

### $\chi$ Confirmation de l'espèce bactérienne

Bien que parmi les espèces testées par Leuschner *et al.* (2004), aucune ne présente, à la fois, la pigmentation jaune et la fluorescence caractéristique de la présence de l' $\alpha$ -glucosidase, les auteurs conseillent de confirmer que les colonies sont bien *E. sakazakii*.

Les colonies sont testées pour être oxydase négative, catalase positive, puis elles sont testées biochimiquement avec un système API 20E et pour l'activité tween 80 esterase.

## c Méthodes PCR

### $\alpha$ PCR et fluorescence (Direction Santé Canada)

La méthode du système QUALICON BAX® pour la détection d'*E. sakazakii* dans les aliments sélectionnés (formules en poudre pour nourrissons, ingrédients laitiers et de soja en poudre et échantillons environnementaux de production alimentaire) a été récemment développée. Elle utilise une technique PCR avec une détection par fluorescence. Elle est rapide et peut être utilisée par les transformateurs d'aliments et les laboratoires associés. Si aucune confirmation biochimique ou génétique n'est réalisée ensuite, cette méthode permet la détection d'*E. sakazakii* en 2 jours, sinon en 5 jours.

### ☞ Pré-enrichissement

Le pré-enrichissement est assuré par un mélange de 25 g d'échantillon dans 225 mL de bouillon de tryptone au lauryl sulfate avec 1 mL de solution de vancomycine à 10 mg/mL. Le milieu mLST est composé de 20 g de tryptone, 5 g de lactose, 2,75 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,75 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 34,22 g de NaCl et 0,1 g de sulfate de lauryl dans un litre d'eau distillée et autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Il est également possible d'utiliser le bouillon mis au point par Guillaume-Gentil *et al.* (2005), décrit dans la partie recherche dans l'environnement.

Le pré-enrichissement se fait à 45°C pendant 20 à 22 heures.

### ☞ Enrichissement

Après avoir ajouté 10  $\mu$ L d'échantillon enrichi à 500  $\mu$ L de bouillon cœur-cerveille à la température de la pièce, il faut laisser incuber trois heures à 37°C.

### ☞ Identification

Les échantillons sont lysés avec une protéase, puis le lysat est transféré dans les tubes PCR avec l'ensemble des réactifs et la réaction d'amplification est lancée.

Lorsque des résultats positifs sont obtenus, il convient de les confirmer. Une culture sur gélose est effectuée à partir des enrichissements originaux, pendant 24 heures à 37°C, puis sous la lumière pendant 4 heures à température de la pièce.

Si des colonies jaunes sont obtenues, une épreuve de confirmation  $\alpha$ -glucosidase est réalisée sur au maximum cinq d'entre elles. Il est conseillé d'effectuer un contrôle positif *E. sakazakii* et un contrôle négatif sur solution saline saine.

Des résultats positifs à ce dernier test nécessitent une identification biochimique (API 20E) ou moléculaire (système RiboPrinter®) plus poussée.

### $\beta$ PCR en temps réel

#### ☞ Méthode développée par Seo et Brackett (2005)

La méthode de Seo et Brackett (2005) est une méthode de PCR en temps réel, développée par la FDA, qui permet la détection d'*E. sakazakii* dans les poudres de lait pour nourrissons en deux jours seulement. C'est une méthode rapide, extrêmement sensible, permettant certainement la quantification des bactéries lors de contamination à faible dose des poudres de lait pour nourrissons.

Les auteurs indiquent que des études complémentaires sont en cours pour permettre d'adapter cette méthode à la détection et la quantification d'*E. sakazakii* dans des échantillons environnementaux.

#### ☞ Amorces et sonde

Les sondes et amorces ont été définies en utilisant la séquence ADN de l'opéron MMS, contenant trois gènes (*rpsU*, *dnaG* et *rpoD*). L'ensemble des séquences est répertorié dans le tableau 12.

La séquence d'ADN amplifiée fait 78 paires de bases. La sonde est marquée avec de la 6-carboxy-fluorescéine (FAM), et de la 6-carboxy-tétra-méthyl-rhodamine (TAMRA).

Un enrichissement de 24 heures à 37°C sur une gélose nutritive est réalisé avant de faire la PCR.

**Tableau 12: Amorces et sonde de la méthode PCR de Seo et Brackett (2005)**

	Séquence (5' à 3')	Localisation dans le gène MMS
Amorces	gggatattgtcccctgaaacag	201-222
	cgagaataagccgcgcat	278-260
Sonde MMS	6FAM-agagtagtagttgtagaggccgtgctccgaaag-TAMRA	225-258

#### ☞ Méthode

Un aliquote de la culture est concentré par centrifugation, les bactéries sont suspendues dans un tampon de lyse (PrepMan Ultra, Applied Biosystems) et lysées par ébullition pendant 10 minutes. Le milieu réactionnel de 50  $\mu$ L est constitué de 5  $\mu$ L de la préparation de lysat dans un milieu TaqMan Universal PCR Master Mix® comprenant chaque primer, la sonde et l'ensemble des autres réactifs nécessaires à l'amplification.

Le temps total du cycle PCR est d'environ deux heures. La réaction est de 2 minutes à 50°C, puis 10 minutes à 95°C, suivie de 50 cycles (15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C).

Les mesures de fluorescence sont faites en temps réel au moment de l'appariement.

### ↳ Spécificité et sensibilité

La spécificité et la sensibilité sont déterminées en utilisant 58 souches d'*E. sakazakii*, 10 souches d'autres *Enterobacteriaceae* et 55 souches d'autres bactéries. Toutes les souches d'*E. sakazakii* ont produit des résultats positifs et aucun résultat faux positif n'a été obtenu. Elles sont donc toutes les deux de 100%.

### ↳ Limite de détection

*E. sakazakii* est retrouvé à une concentration de 100 CFU/mL, aussi bien dans les formules reconstituées pour nourrissons que dans le tampon phosphate.

Cette technique PCR permet ainsi de repérer jusqu'à 0,6 *E. sakazakii* par gramme de poudre de lait pour nourrissons.

### ↳ Quantification d'*E. sakazakii*

La détection et la quantification du gène MMS donne une réponse linéaire pour de l'ADN isolé à partir d'échantillons contenant 100 à 10<sup>8</sup> CFU/mL. Cela met en évidence l'avantage majeur de cette méthode, qui permet de quantifier directement la bactérie durant la phase exponentielle.

### ↳ Comparaison avec la méthode standard de la FDA

Sur dix souches suspectes par la méthode de culture recommandée par la FDA, une s'est révélée être *Serratia rubidaea* à l'identification biochimique. La méthode PCR développée était négative pour cette souche.

Sur les espèces isolées à partir des 50 poudres de lait testées, quatre isolats jaunes ont été identifiés comme n'étant pas *E. sakazakii* avec la galerie API 20E. Cependant, la méthode PCR en identifiait une comme étant *E. sakazakii*, et après une nouvelle identification biochimique, elle a été confirmée comme étant bien *E. sakazakii*.

### ☞ Méthode de Liu *et al.* (2006a)

La méthode de Liu *et al.* (2006a) est la méthode d'identification et de quantification d'*Enterobacter sakazakii* la plus récente. Elle permet de détecter *E. sakazakii* en deux jours, après un enrichissement sélectif dans un milieu mLST et un bouillon cœur-cerveille, par deux méthodes de PCR en temps réel.

Les auteurs ont décrit deux types de PCR : une PCR utilisant le système TaqMan et une autre avec l'intercalant SYBR Green.

### ↳ Principe

Pour identifier précisément le genre et l'espèce bactérienne, les auteurs ont mis au point cette méthode en synthétisant des amorces localisées dans la séquence de l'espace interne transcrit espaces internes transcrits (Internal Transcribed Spacers, ITR) de l'opéron rRNA composé du gène rRNA 16S, ITS, tRNA, gène rRNA 23S et du gène rRNA 5S.

### ⌘ Utilisation de sondes TaqMan

Le système TaqMan utilise des amorces spécifiques pour amplifier le gène cible au sein duquel s'intercale une sonde fluorescente également spécifique de la séquence amplifiée. Cette sonde possède un fluorochrome (FAM) à son extrémité 5' dont la fluorescence est inhibée par la présence du quencher (TAMRA) à l'extrémité 3'. Lors de l'amplification de la cible, la polymérase hydrolyse la sonde, éloignant le colorant fluorescent de son quencher.

Toutes les réactions sont réalisées trois fois.

### ➤ Amorces et sonde

Les amorces et la sonde sont données dans le tableau 13 et sont spécifiques d'*E. sakazakii*.

**Tableau 13: Amorces et sonde de la méthode de Liu *et al.* (2006a) utilisant la sonde TaqMan**

	Séquence (5' à 3')	Localisation
Amorces	ccggaacaagctgaaaattga	369-389 pb
	tcttcgtgctgcgagtttg	448-466 pb
Sonde	FAM-actctgacacaccgcgcttcctg-TAMRA	420-443 pb

La PCR en temps réel est standardisée par un contrôle interne positif (CIP) représenté par un plasmide clonant une ligation des deux amorces sur un fragment d'ADN.

### ➤ Composition du milieu

Le volume du milieu réactionnel est de 25 µL composé à partir de 12,5 µL de milieu contenant la *Taq* polymérase, 1 µL d'ADN bactérien purifié, 2 µL de chaque amorce (dosées à 10 µM), 1 µL de la solution contenant la sonde (dosée à 3 µM) et 1 µL du CIP (10<sup>3</sup> copies).

### ➤ Cycle PCR

La PCR est composée d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, de 45 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, et l'hybridation et l'élongation à 62°C pendant 20 secondes.

La fluorescence est mesurée en temps réel pendant toute la durée et à la fin de la réaction. La fluorescence du TAMRA est également utilisée comme référence.

## ⌘ Utilisation de la SYBR Green PCR

Le principe de la PCR en temps réel en utilisant le SYBR Green comme colorant repose sur une augmentation de la fluorescence liée à la propriété du colorant à s'intercaler dans le sillon mineur de l'ADN double brin. Plus d'amplicons sont générés et plus d'intercalant peut se fixer et plus le signal de fluorescence est élevé. Cette méthode est moins spécifique, dans son mécanisme, que la précédente. La spécificité peut être accrue par mesure de la température de fusion (T<sub>m</sub>) de l'amplicon à la fin de la réaction.

### ➤ Amorces

Des amorces spécifiques ont été définies pour amplifier la partie ITS et tRNA de l'opéron et un CIP a été obtenu selon le même procédé que celui décrit par la PCR en temps réel avec sonde TaqMan (Tableau 14).

**Tableau 14: Amorces de la méthode au vert SYBR de Liu *et al.* (2006a)**

	Séquence (5' à 3')
Amorces	
sens	tataggtgtctgcgaaagcg
antisens	gtcttcgtgctgcgagtttg

De même que précédemment, un contrôle interne positif (CIP) a été inclus dans la réaction. Sa température de dénaturation est différente de celle des fragments amplifiés, ce qui permet leur distinction.

#### ➤ Mélange réactionnel

Le volume du milieu réactionnel est de 25 µL contenant : 12,5 µL de milieu contenant la Taq polymérase et le colorant SYBR Green, 1 µL d'ADN bactérien purifié, 0,5 µL de chaque amorce (dosées à 10 µM), 1 µL de la solution contenant la sonde (dosée à 3 µM), 1 µL de CIP (10<sup>3</sup> copies) et de l'eau pour compléter.

#### ➤ Cycle PCR

La PCR est composée d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, de 45 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 5 secondes, et l'hybridation et l'élongation à 62°C pendant 20 secondes. Ainsi, à chaque cycle d'amplification, l'augmentation de la fluorescence est obtenue à une longueur d'onde de 495 nm.

Après l'amplification, une courbe de dénaturation de l'ADN amplifié est réalisée de 54 à 95°C.

#### ⌘ Sensibilité et Spécificité

La sensibilité est testée en utilisant 35 souches d'*E. sakazakii*, et la spécificité en utilisant 88 souches bactériennes autres qu'*E. sakazakii* (63 *Enterobacteriaceae* et 25 souches de bactéries appartenant à d'autres familles).

Avec les deux méthodes, toutes les souches d'*E. sakazakii* ont été détectées, et aucune de celles n'appartenant pas à cette espèce n'a été amplifiée. La sensibilité, comme la spécificité semblent être de 100%.

#### ⌘ Limite de détection

##### ⌘ *Dans une culture bactérienne pure*

Avec le système TaqMan, la limite de détection en culture bactérienne pure est de 18 CFU détectées en 36,5 cycles.

La limite de détection avec la méthode avec le SYBR Green est aussi de 18 CFU, mais il faut noter que des interférences sont produites par le CIP, et que cette limite n'est donc obtenue que dans un milieu sans CIP en environ 35 cycles.

Dans les deux cas, la détection s'échelonne de 10<sup>6</sup> à 10<sup>1</sup> CFU.

##### ⌘ *Dans de la poudre de lait*

Pour tester la limite de la sensibilité de la méthode PCR en temps réel, des poudres de lait ne contenant pas *E. sakazakii* ont été inoculées avec la bactérie à différentes concentrations.

Après enrichissement, la limite de détection est de 1,1 CFU dans 100 gramme de poudre de lait par les deux méthodes. Elles permettent également la détection de 10<sup>6</sup> CFU.

## 4. Evolutions des méthodes

Leuschner *et al.* (2004) pensent que des sondes spécifiques ou que des tests basés sur l'utilisation d'anticorps seraient utiles pour l'identification non ambiguë de la bactérie, avec ensuite des tests complémentaires faits par d'autres laboratoires pour vérifier la fiabilité de la méthode.

De plus, il semble que la galerie API 20E pourrait donner des résultats faux négatifs concernant *E. sakazakii*. Le nombre limité de tests effectué donne, par exemple, un pourcentage d'homologie supérieur pour *Pantoea* spp. comme étant *E. sakazakii*, avec la galerie API 20E, qu'en utilisant le système ID 32E (Iversen *et al.*, 2004a).

L'activité  $\alpha$ -glucosidase est une caractéristique biochimique très importante d'*E. sakazakii*. Elle est à la base de nombreuses méthodes de détection. L'élucidation des bases moléculaires responsables de cette caractéristique permettra une cible spécifique et directe pour le développement de nouvelles méthodes de détection de la bactérie.

Lehner *et al.* (2006b) ont identifié deux gènes codant pour l' $\alpha$ -glucosidase. Les protéines déduites de ces gènes appartiennent à un groupe supposé de gènes responsables du métabolisme du palatinose (6-O-a-D-glucopyranosyl-D-fructose). L'analyse des protéines a révélé leur appartenance à toutes deux à la fraction intracellulaire des protéines cellulaires. La présence du métabolisme du palatinose a également été vérifiée.

## 5. Comparaison de différentes méthodes pour la récupération de bactéries stressées

Une étude a été menée par Gurtler et Beuchat (2005) pour déterminer les performances de milieux sélectifs et différentiels en ce qui concerne leur capacité à ressusciter et permettre le développement de colonies de cellules d'*E. sakazakii* stressées. Des colonies de quatre souches de la bactérie ont été soumises à cinq type de stress : chaleur (55°C pendant 5 minutes), congélation (-20°C pendant 24 heures, dégel, 620°C pendant 2 heures, dégel), pH acide ( 3,54), pH alcalin (11,25) et dessiccation dans de la préparation en poudre pour nourrissons ( $A_w$  de 0,25 et 21°C pendant 31 jours).

Les milieux étudiés ont été : la gélose de tryptone de soja (TSA), la technique de Leuschner *et al.* (2004 ; LBDC), le milieu OK, le milieu DFI, la gélose VRGB, et la gélose d'enrichissement en *Enterobacteriaceae* (EE) .

Les performances des différents milieux sont les suivants. La récupération des bactéries soumises à la chaleur, la congélation, les pH acides et alcalins se fait par ordre décroissant de la manière suivant : TSA > LBDC > OK, VRGB > DFI > EE. Concernant la dessiccation, l'ordre est le suivant : TSA, LBDC, OK > DFI, VRGB, EE.

Les capacités à ressusciter et faire croître les colonies d'*E. sakazakii* ayant subi un stress, varie donc beaucoup suivant les milieux différentiels et sélectifs. La méthode d'ensemencement des gélose n'a pas d'influence sur les performances.

**Tableau 15: Récapitulatif de toutes le méthodes de détection**

	Type de méthode	Type d'échantillon	Durée (jours)	Sensibilité <sup>9</sup>	Spécificité <sup>a</sup>	Limite de détection	Limite / avantage
Méthode de culture FDA	Culture, identification, dénombrement (NPP)	Tous	5 (6-7)	90 <sup>10</sup>	79 <sup>11</sup> 90 <sup>12</sup>		Problème sélectivité
Milieu OK	Milieu sélectif et différentiel	Tous	3	100	100		
Milieu DFI	Milieu sélectif et différentiel	Tous	3	100	87,2		
PCR 16S rRNA (Lehner <i>et al.</i> , 2004)	PCR	Tous	1-2	100	100	10 pg	
Méthode de Kandhai <i>et al.</i> (2004b)	Culture	Environnement	5	100 58	100		α-glucosidase avant 4 heures
Méthode de Guillaume-Gentil <i>et al.</i> (2005)	Bouillon sélectif	Environnement	4	85	90		
Méthode de Muytjens <i>et al.</i> (1988)	Culture	Aliment	5 (6-7)				
Méthode élective et différentielle (Leuschner <i>et al.</i> , 2004)	Culture	Aliment	5				
QUALICON BAX®	PCR	Aliment	2				
PCR en temps réel (Seo et Brackett, 2005)	PCR	Aliment	2	100	100	100 CFU/ mL, 0,6 bactérie/g	Quantification possible
PCR en temps réel (Liu <i>et al.</i> , 2006a)	PCR	Aliment	2	100	100	18 CFU <sup>13</sup> 1,1 CFU/ 100g <sup>14</sup>	Rapide, limite de détection basse

<sup>9</sup> Résultats obtenus par d'autres auteurs que ceux ayant réalisé l'étude en italique

<sup>10</sup> Iversen et Forsythe (2004a)

<sup>11</sup> Iversen *et al.* (2004a)

<sup>12</sup> Seo et Brackett, 2005

<sup>13</sup> En culture bactérienne pure

<sup>14</sup> Dans les poudres de lait

---

## II - PATHOLOGIE LIEE A *ENTEROBACTER SAKAZAKII*

---

### A / PHYSIOPATHOLOGIE

Peu d'études portent sur la virulence et la pathogénie d'*E. sakazakii*, c'est pourquoi les données développées ici ne sont pas exhaustives, et sont évolutives, puisque beaucoup de recherches sont en cours dans ce domaine.

#### 1. Pathogénie

##### a Méningite

En 1981, Kleiman *et al.* ont établi la pathogénie d'*E. sakazakii* chez les nourrissons de plus d'un mois d'âge, L'infection a provoqué une encéphalite nécrosante, avec formation d'abcès et compartimentalisation des ventricules cérébraux.

Il est probable qu'*E. sakazakii* possède une dépendance dans son développement nécessitant l'accès au système nerveux central (Iversen et Forsythe, 2003).

Pour causer une méningite, la bactérie doit coloniser les surfaces digestives, passer dans le flux sanguin, éviter les mécanismes de défense de l'hôte, passer la barrière hémato-méningée et survivre dans le Liquide Céphalo-Rachidien (LCR ; Iversen et Forsythe, 2003).

##### *α Description du cas*

Leur patiente est une fille de cinq semaines souffrant d'une méningite nécrosante sévère. A l'admission, elle souffre de fièvre, présente une fontanelle bombée et des convulsions. Aucune anomalie congénitale de l'appareil urinaire, digestif et nerveux central n'ont été notées.

L'analyse de LCR confirme le diagnostic de méningite, et la patiente est traitée avec de l'ampicilline (400 mg/kg/j) et du chloramphénicol (100 mg/kg/j). *Enterobacter sakazakii* a été également isolé à partir de son LCR. Seule l'ampicilline a alors été continuée en intraveineuse.

Le sixième jour, des cultures faites à partir de ponctions subdurales bilatérales ont permis d'isoler *E. sakazakii*. De la gentamicine (7,5mg/kg/j) a alors été ajoutée.

Après quinze jours une dilatation importante des ventricules est notée par tomodensitométrie. Les cultures du liquide ventriculaire sont toujours positives après vingt et un jours de traitement, et des injections intra-ventriculaires de gentamicine (3mg/j dans chaque ventricule) sont entreprises pendant dix jours. Cela a permis de négativer les cultures en 24 heures et après l'arrêt des antibiotiques.

---

A l'arrêt du traitement, le scanner montrait une compartimentalisation des ventricules et des abcès. Deux mois après, le diamètre de la tête a rapidement augmenté, nécessitant la mise en place d'un shunt ventriculo-péritonéal.

La patiente a survécu, mais a souffert de retards mental et locomoteur importants (Kleiman *et al.*, 1981).

### *β Mise en évidence de la pathogénie*

La bactérie isolée a été caractérisée biochimiquement de manière précise. Les tests Voges-Prokauer, citrate, DNase (en 4 jours), arginine dihydrolase, ornithine décarboxylase, phénylalanine désaminase (faible), glucose, lactose, sucrose, mannitol, salicine, inositol, arabinose, raffinose, rhamnose, tréhalose et xylose. Les réactions suivantes sont négatives : indole, H<sub>2</sub>S, urée, lysine décarboxylase, malonate, dulcitol, adonitol et sorbitol (Kleiman *et al.*, 1981). L'isolat est confirmé être *E. sakazakii* de biogroupe 1 (d'après Farmer *et al.*, 1980) par le Centers for Disease Control d'Atlanta.

La pathogénie de la bactérie a été mise en évidence pour la première fois dans cet article, car la clinique a été liée avec certitude à *E. sakazakii*, avec une description biochimique détaillée (Kleiman *et al.*, 1981).

La manière d'entrer dans le liquide cérébro-rachidien par la plupart des pathogènes et d'induire des méningites n'est pas connue. Le plexus choroïde est la voie d'entrée la plus probable, ce qui implique des mécanismes paracellulaires et transcellulaires. Des facteurs de virulence microbiens circulants, comme des endotoxines, des protéases, collagénases ou des élastases provoquent des pertes d'imperméabilité de la barrière hémato-méningée (Iversen et Forsythe, 2003).

## **b Entérocolite nécrosante**

L'entérocolite nécrosante est la maladie gastro-intestinale la plus fréquente chez les nouveaux-nés, et a pour origine de nombreuses bactéries pathogènes. La pathogénie est associée à l'ischémie intestinale néonatale, la colonisation microbienne des intestins, et l'excès de substrat protéique dans la lumière intestinale.

Cette maladie a une incidence de 2 à 5% chez les enfants prématurés, et de 13% chez ceux pesant moins de 1,500 kg à la naissance. Elle est 6 à 10 fois plus fréquente chez les nourrissons nourris avec une préparation de lait en poudre par rapport à ceux qui sont allaités (Lucas et Cole, 1990).

## **2. Facteurs de virulence**

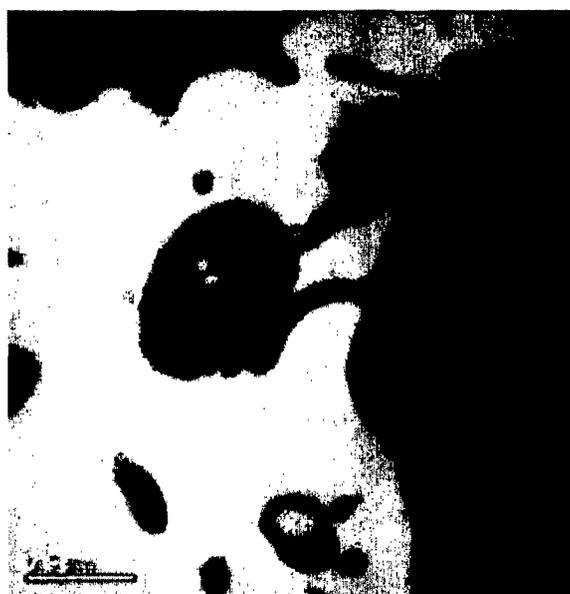
### **a Capsule**

*E. sakazakii* adhère au silicone, latex et polycarbonate et dans une moindre mesure à l'acier inoxydable (Iversen *et al.*, 2004b). L'attachement et l'adhésion sont certainement augmentés par l'exopolysaccharide capsulaire.

Vingt-quatre des cinquante-six souches testées par Lehner *et al.* (2005) ont produit une masse laiteuse et visqueuse qui a été considérée comme étant un polysaccharide extracellulaire. Une analyse chromatographique a révélé la présence de glucose, galactose, fucose et acide glucuronique.

## b Facteurs d'adhésion

L'expression de facteurs d'adhérence spécifique aux cellules de l'hôte est un trait commun des agents microbiens hautement pathogènes. Ces facteurs d'adhérence passent par la reconnaissance et la fixation à des récepteurs cellulaires spécifiques permettant ainsi à la bactérie d'échapper aux stratégies de défense de l'hôte et de démarrer une colonisation. La figure 5 suggère illustre une adhésion étroite entre la bactérie et la cellule de l'hôte suggérant l'existence de facteurs d'adhésion extrêmement spécifiques, à mettre en relation avec la pathogénicité de la bactérie (Mange *et al.*, 2006).



**Figure 5 : Adhésion étroite entre *E. sakazakii* et la membrane d'une cellule de mammifère (microscopie électronique issue de Mange *et al.*, 2006)**

De nombreuses molécules entrent en jeu pour permettre l'adhésion des bactéries entéropathogènes au mucus intestinal. C'est un phénomène multifactoriel (Collado *et al.*, 2005).

### *α* Type d'adhésion

Il a été mis en évidence une hétérogénéité de différentes souches d'*E. sakazakii* concernant leur capacité à adhérer aux cellules. Cinquante souches différentes ont été testées sur deux lignées de cellules épithéliales (HEp-2 et Caco-2) et une lignée de cellules endothéliales cérébrales (HBMEC). Deux schémas d'adhérence distincts ont été caractérisés, un de type adhésion diffuse, et un de type formation d'agglomérats de bactéries localisés sur les cellules (figure 6). Certaines souches utilisent les deux mécanismes d'adhésion et le profil d'adhésion varie suivant la pathogénicité des souches. Les souches les plus pathogènes présentent un schéma de type agrégats (Mange *et al.*, 2006).

Collado *et al.* (2005) ont montré que la capacité d'adhésion des souches d'*E. sakazakii* ATCC 29544 variait de 10 à 15%. Cette adhésion peut être partiellement inhibée par des souches de bifidobactéries. Cependant, leurs capacités sont très variables.

Sur les 56 souches d'*E. sakazakii* testées par Lehner *et al.* (2005), 23 (41%) exprimaient la capacité d'adhérer sur une surface en verre dans les cultures mélangées

### *β* Matrice extra-cellulaire

Zogaj *et al.* (2003) ont mis en évidence qu'*E. sakazakii* produisait de la cellulose de façon constitutive, mais pas de fimbriae, aussi bien à 28°C qu'à 37°C. La matrice extra-cellulaire de la bactérie ne serait donc composée que de cellulose.

Lenhner *et al.* (2005) trouvent également que la cellulose fait partie de la matrice extra-cellulaire.

#### $\chi$ *Fimbriae*

Les gènes codant pour les fimbriae sont présents dans le génome de la bactérie, bien qu'ils ne semblent pas être exprimés (Zogaj *et al.*, 2003).

Mange *et al.* (2006) n'ont pas mis en évidence de relation entre les capacités d'adhésion de la bactérie et la production d'un fimbriae spécifique. Un pré-traitement de la bactérie par de la trypsine ne permet pas de diminuer cette capacité. En revanche l'ajout de mannose dans le milieu de culture diminue l'adhésion diffuse, mais pas les agglomérats. Cette observation permet de rendre compte que les fimbriae de type 1 (communs à la plupart des souches d'entérobactéries) ne sont pas impliqués dans la formation des agglomérats. L'adhésion n'est vraisemblablement pas associée à un organelle aussi fragile que les fimbriae, mais passe par un facteur d'adhésion forte, dont la nature reste à caractériser (Mange *et al.*, 2006).

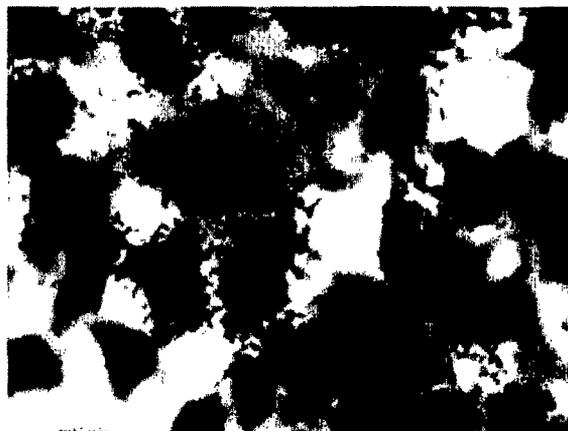


Figure 6 : Adhésion d'*E. sakazakii* aux cellules HBMEC sous forme d'agglomérats (microscopie optique, d'après Mange *et al.* (2006))

#### $\delta$ *Formation de biofilm*

L'expression de la capsule et de la matrice extra-cellulaire sont associées à la formation de biofilms (Zogaj *et al.*, 2003, Lehner *et al.*, 2005).

Zogaj *et al.* (2003) ont cherché les conditions optimales de formation du biofilm, pour mettre en évidence le schéma de régulation de ce dernier. *E. sakazakii* forme une couche après 24 heures à 28°C en milieu de culture solide (les souches de *Citrobacter* testées mettent 48 heures). Au microscope, des fibrilles de cellulose sont visibles.

L'analyse des gènes responsables de la formation de biofilms suggère que leur expression est dépendante des conditions environnementales (Zogaj *et al.*, 2003).

Lors de cultures dans de la poudre de lait reconstituée, *E. sakazakii* adhère au silicone, latex et polycarbonate et dans une moindre mesure à l'acier inoxydable. Ces matériaux sont souvent utilisés pour les équipements de nourrissage des bébés et dans les aires de préparation, ce qui constitue donc un risque (Iversen *et al.*, 2004b).

### c Entérotoxine

#### *α* Présence

Pagotto *et al.* (2003) ont étudié 18 souches d'*E. sakazakii* pour essayer de déterminer quels étaient les facteurs de virulence. 22% (4) des souches étudiées étaient positives pour la production d'entérotoxine *in vitro*. Trois étaient des isolats cliniques, provenant de trois hôpitaux différents, situés à trois endroits différents (Québec et deux dans l'Ontario). Une souche provenait de poudre de lait déshydratée. La souche type ne produit pas d'entérotoxine.

Le pH, l'aération et le stade de croissance n'ont pas été évalués et leurs effets sur la production d'entérotoxine *in vitro* n'est pas connu.

#### *β* Toxicité

La toxicité de l'entérotoxine a été déterminée sur différentes lignées cellulaires. Celle produite par la souche *E. sakazakii* LA a des effets plus marqués sur les lignées Y-1 et Vero, que sur les lignées CHO. Pour toutes les lignées, l'ébullition pendant 20 minutes des filtrats cellulaires d'*E. sakazakii* n'a pas eu d'effet, sauf sur les cellules Vero, chez qui l'effet cytopathique a diminué.

Il est intéressant de noter que la souche d'*E. sakazakii* MONT n'a pas d'effet cytopathique, alors qu'elle produit une entérotoxine. L'autre souche testée, non productrice de cytotoxine, n'a pas d'effet cytopathique.

La dose minimale létale de ces trois souches est cependant la même aussi bien par voie intra-péritonéale, que par voie orale.

Les auteurs pensent que les différences notées dans ces expériences indiquent des variations dans l'attachement récepteur-toxine ou un système de régulation complexe. Ils n'excluent pas la possibilité qu'*E. sakazakii* possède plus d'une cytotoxine, ou qu'un transfert de gène horizontal, concernant un gène codant pour une cytotoxine, ne soit intervenu que chez certaines souches (Pagotto *et al.*, 2003).

### d Molécules de signallement cellulaire

Lehner *et al.* (2005) ont analysé en chromatographie sur couche mince 56 souches d'*E. sakazakii*. Ils ont mis en évidence deux types de lactones acylés homosérine (3-oxo-C6-HSL et 3-oxo-C8-HSL). Cela illustre la capacité qu'a la bactérie de produire des molécules de signallement cellulaire.

### e Autres facteurs de virulence

Pagotto *et al.* (2003) suspectent l'existence d'autres facteurs de virulence. En effet, des variations existent entre les doses létales pour les souriceaux en intra-péritonéal. Deux souches ne sont même plus létales par voie orale, même à dose élevée. Les auteurs pensent que ceci est dû à l'absence d'un facteur de virulence accessoire, qui permettrait le passage à travers l'estomac et/ou la translocation au travers de l'intestin.

La capacité à survivre à l'acidité gastrique est aussi certainement sous la dépendance d'un facteur de virulence, qui expliquerait la possibilité de deux souches de l'étude d'être létales par cette voie.

## f Régulation des facteurs de virulence

Pagotto *et al.* (2003) pensent que les facteurs de virulence sont sous le contrôle de protéines régulatrices qui décèlent lorsqu'*E. sakazakii* est en présence de l'hôte (c'est-à-dire est attaché aux entérocytes, et non pas sur une gélose), et active alors les gènes de virulence. Ainsi, deux souches de leur étude étaient létales par voie orale, alors qu'aucune ne produisait d'entérotoxine, alors qu'elles étaient, manifestement plus virulentes que les autres.

- ☠ *Enterobacter sakazakii* est à l'origine de méningites et d'entérocolites nécrosantes chez des nourrissons
- ☠ Tous les facteurs de virulence de la bactérie ne sont pas connus. Des recherches sont en cours. Il y en a certainement plus que ceux que l'on connaît.
- ☠ Certaines souches d'*E. sakazakii* ont une capsule et un polysaccharide extracellulaire.
- ☠ *E. sakazakii* a la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales et endothéliales cérébrales. Cette adhésion est multifactorielle et reste à étudier.
- ☠ *E. sakazakii* forme des biofilms.
- ☠ Certaines souches d'*E. sakazakii* (22%) produisent une entérotoxine, mais cela ne semble pas avoir d'influence sur la dose létale de la bactérie.
- ☠ Il semble que des molécules de signallement cellulaire soient produites.
- ☠ Il existe certainement d'autres facteurs de virulence qui sont à étudier. Le mécanisme de régulation de l'expression des facteurs de virulence est inconnu.

## **B / MANIFESTATIONS CLINIQUES**

Le premier cas d'infection à *Enterobacter sakazakii* date de 1958 et a été décrit par Urmenyi et Franklin (1961). Depuis, environ 80 cas chez des nourrissons ou enfants ont été décrits, et 10 cas chez des adultes (cf les tableaux xx récapitulatifs des cas).

Ces cas sont décrits en annexe, mais ce n'est pas une revue exhaustive de la littérature. De plus, tous les cas de méningites néonatales dues à *E. sakazakii* ne sont pas publiés (Lehner et Stephan, 2004).

Quoiqu'il en soit, la fréquence de cette pathologie chez les nouveaux-nés et enfants est faible, mais sa gravité fait toute son importance.

### **I. Symptômes**

Les symptômes sont variés, et ne sont pas identiques si la maladie se déclare chez des nourrissons, enfants ou adultes.

#### **a Chez les nouveaux-nés et nourrissons :**

Il est considéré arbitrairement, que tous les patients de moins de un an entrent dans cette catégorie. Sur le centaine de cas que nous avons recensé dans la littérature, environ 80 appartiennent à la catégorie nouveaux-nés et nourrissons (les 4 cas décrits par Block *et al.*, 2002, lors de leur étude rétrospective ne sont pas considérés, car l'âge des patients n'est pas mentionnée), 5 cas concernent des enfants, et 11 des adultes.

Un cas est défini par un patient infecté, suspecté d'être infecté ou colonisé par *E. sakazakii*. Une infection confirmée correspond à une culture positive d'*E. sakazakii* d'un site normalement stérile (sang, LCR : Liquide Céphalo-Rachidien). Une infection suspectée correspond à une culture positive d'*E. sakazakii* d'un site non stérile associée à la détérioration documentée de l'état clinique du patient dans les 24 heures précédant le prélèvement. Enfin, une colonisation est une culture positive d'*E. sakazakii* d'un site non stérile non associée à une détérioration de l'état clinique dans les 24 heures précédant le prélèvement (Himmelright *et al.*, 2002).

#### ***α* Infections confirmées**

Les sites stériles dont *E. sakazakii* peut être cultivé correspondent au LCR, et au sang. On considère que lorsqu'*E. sakazakii* est cultivé à partir du LCR on a affaire à une méningite, et lorsqu'il est cultivé à partir du sang, c'est une septicémie.

#### **☞ Méningite**

Une méningite est une inflammation aiguë des membranes de l'encéphale (méninges) et de la moelle épinière. Les infections des méninges sont, en règle générale, associées avec une apparition soudaine et de forte intensité des symptômes, et évoluent spontanément vers la décès de l'individu (Nazarowec-White et Farber, 1997c).

#### **☞ Fréquence**

Vingt-trois méningites ont été décrites. Dix-neuf d'entre elles n'étaient pas associées à d'autres symptômes. Muyltjens *et al.* (1983), Biering *et al.* (1989) et Bar-Oz *et al.* (2001) ont décrit un

cas chacun de méningite associée à une septicémie. Muijtens *et al.* (1983) ont décrit un cas de méningite associé à une entérocolite nécrosante et à une septicémie.

La fréquence des méningites comme symptôme d'infection à *E. sakazakii* chez les nouveaux-nés est donc de 32,9%. Il semble que dans 83% des cas ce soit le seul symptôme, dans 13% des cas, elle soit associée à une septicémie et dans 4% des cas à une entérocolite nécrosante et une septicémie.

#### ☞ Description des symptômes de méningite

Les patients souffrant de méningite sont anorexiques, léthargiques ou irritables, ictériques, ont une diminution de l'état général, une fontanelle antérieure bombée, des pleurs monotones, des difficultés respiratoires, de la bradycardie. La fièvre n'est pas toujours présente (Urmenyi et Franklin, 1961 ; Joker *et al.*, 1965 ; Willis et Robinson, 1988 ; Gallagher et Ball, 1991 ; Burdette et Santos, 2000 ; Bar-Oz *et al.*, 2001). Les convulsions sont présentes dans un tiers des cas (Weir, 2002).

Kleiman *et al.* (1981) avaient une patiente qui a développé une méningite nécrosante sévère. Muijtens *et al.* (1983) décrivent le cas d'une patiente souffrant d'un ménongo-myélocoele au niveau du sacrum.

#### ☞ Lésions cérébrales visibles par imagerie médicale

Souvent, Le scanner permet de mettre en évidence des cavités liquidiennes dans l'encéphale (Biering *et al.*, 1989). Suivant les auteurs, ces cavités correspondent à des abcès ou à des infarctus cérébraux.

#### ⌘ Infarctus cérébral

Ainsi, devant les lésions bilatérales et frontales de faible densité siégeant dans le substance blanche et le cortex, visibles grâce au scanner, Willis et Robinson (1988) pensent que leur patient est atteint d'un infarctus cérébral massif. Quelques jours plus tard, une destruction des lobes frontaux avec des altérations kystiques adjacentes des ventricules latéraux sont visibles en tomodynamométrie (cf. figure 7).

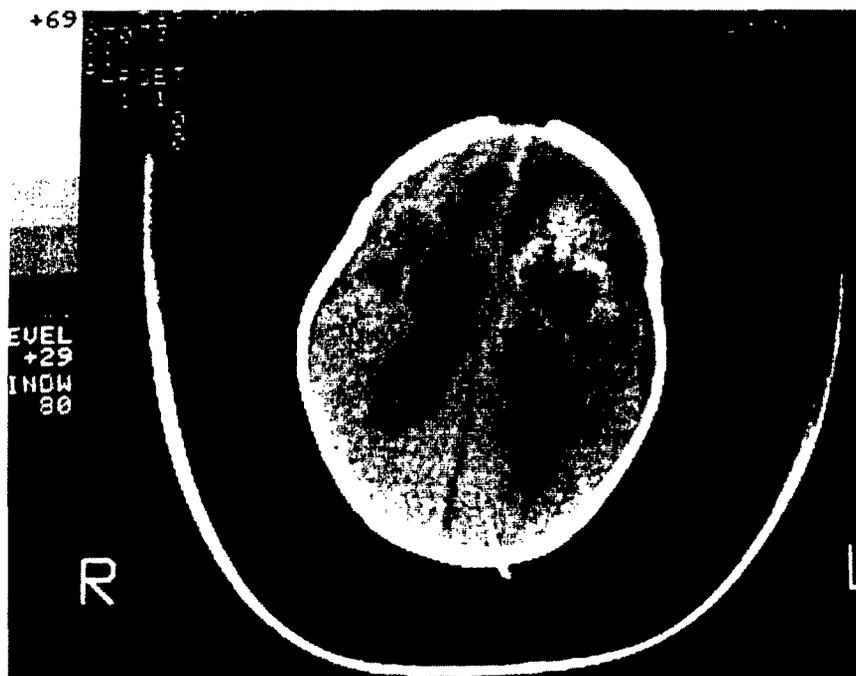


Figure 7 : Suspicion d'infarctus cérébral du à *E. sakazakii* (Willis et Robinson, 1988)

Gallagher et Ball (1991) pensent également que leur patient est atteint d'un infarctus cérébral. Une échographie crâniale réalisée lors de son sixième jour de vie montre une échogénicité augmentée bilatérale et pariéto-occipitale. Elle est plus importante à gauche et pourrait être consistante avec une hémorragie ou un infarctus cérébral.

Un scanner, fait deux jours plus tard, confirme la présence de cette lésion qui peut être soit un œdème ou un infarctus cérébral.

Un deuxième examen tomodensitométrique de la tête, réalisé une douzaine de jours plus tard, montre une aire de faible atténuation augmentée à droite, et une diminution supplémentaire de l'atténuation à gauche (cf. figure 8, partie 1).

Trois semaines et demi plus tard, un scanner montre une zone bien délimitée, située dans le lobe droit, dont les contours sont renforcés (cf. figure 8, partie 2).

L'aspiration et le drainage de ce kyste ont permis d'isoler un contaminant uniquement. Les auteurs pensent que la lésion cérébrale est un infarctus cérébral, en l'absence de modifications pathologiques et inflammatoires, et d'aires de nécrose périvasculaire ou de fragmentation axonale.



**Figure 8 : Evolution d'une suspicion d'infarctus cérébral du à *E. sakazakii* (Gallagher et Ball, 1991). La partie 1 correspond au scanner montrant l'atténuation à droite et surtout à gauche, et la partie 2 montre le renforcement autour de la lésion**

Bar-Oz *et al.* (2001) décrivent aussi des lésions visibles par imagerie médicale. Une échographie crâniale d'une des patientes dont ils décrivent le cas, met en évidence une large zone frontale hyperéchogène, pouvant être un infarctus ou une hémorragie. Plusieurs échographies crânielles, des examens tomodensitométriques et des IRM sont réalisés et sont consistants avec un infarctus évoluant en nécrose, liquéfaction et cavitation. Finalement, la lésion communique entre la corne frontale et le ventricule latéral droit. A l'âge de trois semaines, un renforcement annulaire autour de la lésion est noté, imitant un abcès. Le LCR aspiré de la lésion et le sang donnent des cultures négatives, ce qui ne permet pas de confirmer cette dernière hypothèse.

Dans le cas qu'ils décrivent, Ries *et al.* (1994) ont également un patient avec des hémorragies cérébrales multiples. Il semble que des abcès soit aussi présents.

## ⌘ *Abcès*

Des abcès cérébraux sont décrits. Joker *et al.* (1965) ont suivi une patiente qui a développé un abcès cérébral dans l'hémisphère cérébral gauche, qui communiquait avec le ventricule cérébral gauche (lui-même dilaté). Kleiman *et al.* (1981) en ont aussi décrit.

Burdette et Santos (2000) ont décrit la formation d'abcès cérébraux. Un examen tomodensitométrique de la tête est effectué. Une large zone de diminution de contraste est observée au niveau du lobe antérieur gauche, associée à un effet de masse et un renforcement gyriforme partiel (cf. figure 9, parties 1a et 1b). Ces éléments sont évocateurs d'une inflammation cérébrale. Les images obtenues par résonance magnétique le jours suivant montrent une lésion de quatre centimètres de diamètre dans le lobe frontal gauche, contenant du liquide et compatible avec un abcès dans le parenchyme (cf. figure 9, partie b).

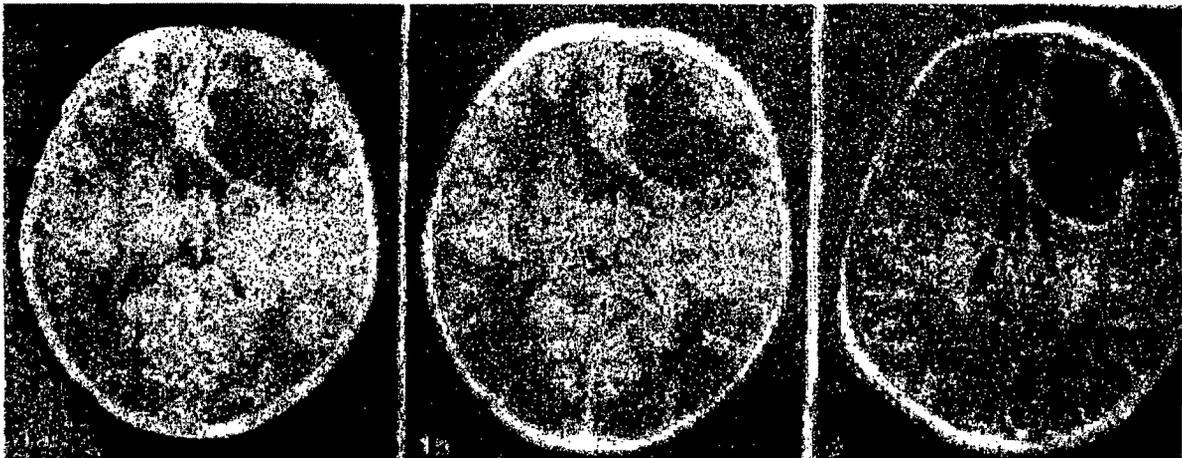


Figure 9 : Abcès cérébral causé par *E. sakazakii* (Burdette et Santos, 2000). Les parties 1a et 1b sont des scanners sans et avec produits de contraste, et la partie 2 est un IRM.

Deux jours après l'IRM, une craniotomie du lobe frontal gauche est entreprise. Elle permet l'évacuation de 20ml de liquide purulent de la cavité de l'abcès. Celle-ci est irriguée avec du liquide physiologique et de la bacitracine diluée, puis drainée. La culture du liquide purulent recueilli a révélé la présence d'*E. sakazakii*. C'est la première mise en évidence réelle du rôle d'*E. sakazakii* dans la formation d'abcès cérébraux (il a été isolé du liquide formant l'abcès).

En effet, jusqu'à présent, l'interprétation des éléments obtenus par l'imagerie médicale était variable suivant les auteurs. Willis et Robinson (1988) et Gallagher et Ball (1991) pensaient plutôt que les images tomodensitométriques représentaient les évolutions associées à l'infarctus cérébral, les biopsies à l'aiguille ne donnant pas de résultats.

## ⌘ *Dilatation des ventricules cérébraux*

La dilatation des ventricules cérébraux est relativement fréquente. En effet, Joker *et al.* (1965) l'ont décrit chez leur patiente, ainsi que Kleiman *et al.* (1981), Willis et Robinson (1988). Elle peut être due à une hypertension intracrânienne nécessitant un shunt ventriculo-péritonéal et des ponctions ventriculaires multiples (Bar-Oz *et al.*, 2001).

Le liquide dilatant les ventricules est parfois du pus (Muytjens *et al.*, 1983 ; Willis et Robinson, 1988).

## ⌘ *Compartmentalisation des ventricules*

Seuls Kleiman *et al.* (1981) ont été confronté à une compartimentalisation des ventricules cérébraux chez leur patiente.

### ☪ Septicémie

#### ☪ Fréquence

Au total, onze cas de septicémie ont été décrits. Des septicémies accompagnées d'aucun autre symptôme n'ont été décrites que dans six cas. Nous avons vu que lors de trois cas, une méningite était associée. Dans les deux derniers cas, des problèmes digestifs étaient également évoqués (Simmons *et al.*, 1989).

La septicémie est un élément présent dans 15,7% des cas d'infections à *E. sakazakii*. Dans 50% des cas, c'est le seul symptôme. Elle est associée à une méningite dans 20% des cas, et à des troubles digestifs dans 30% des cas.

Stoll *et al.* (2004) considèrent, chez leur patient, qu'étant donné la rareté d'*E. sakazakii* il serait plus probablement un contaminant qu'à l'origine de la clinique.

#### ☪ Symptômes

Monroe *et al.* (1979) ont été les premiers à décrire un cas d'infection à *E. sakazakii* ne s'exprimant que par une septicémie. Le nouveau-né ne présentait qu'une légère irritabilité. Noriega *et al.* (1990) rapportent une dégradation de l'état général de leur patiente, des vomissements et de la fièvre supplémentaires. Un patient, dont le cas est décrit par Bar-Oz *et al.* (2001), souffre de CIVD (Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée). A neuf jours d'âge, une tendance aux saignements est notée, avec une hémorragie du segment gastro-intestinal supérieur, ainsi que des temps de coagulation augmentés. Une thrombocytopenie est trouvée. Enfin, le patient dont le cas est rapporté par Stoll *et al.* (2004), présente des épisodes d'apnée et de bradychardie, nécessitant la mise sous ventilation assistée.

Simmons *et al.* (1989) avaient deux patients souffrant de septicémie accompagnée de distension abdominale, d'hémochésis, ou de diarrhée.

### β Infection suspectée

#### ☪ Entérocolite Nécrasante

#### ☪ Fréquence

Quatorze cas d'entérocolite nécrasante sont décrits dans la littérature. Un cas est associé à une méningite et une septicémie (Muytjens *et al.*, 1983), un autre est décrit par Simmons *et al.* (1989) chez un garçon de 13 jours, et les douze derniers, par Van Acker *et al.* (2001).

L'entérocolite nécrasante est un signe d'infection due à *E. sakazakii* dans 20% des cas décrits. En règle générale (92,9%), il n'est pas accompagné d'autres signes cliniques.

#### ☪ Signes cliniques

Les signes d'entérocolite nécrasante sont la distension abdominale, les vomissements (Van Acker *et al.*, 2001), la diarrhée sanglante (Simmons *et al.*, 1989) ou encore de l'ascite et de l'air visibles dans l'abdomen par radiographie abdominale (Muytjens *et al.*, 1983). Dans les cas les plus graves, une imperforation intestinale peut survenir (Van Acker *et al.*, 2001).

#### ☪ Conjonctivite

Deux cas de conjonctivites dues à *E. sakazakii* ont été décrits. Le premier est chez un garçon prématuré de dix jours (Reina *et al.*, 1989), le second est décrit par Block *et al.* (2002), et a eu lieu en 1995. L'âge de la patiente atteinte n'est pas précisé.

### *χ Colonisation digestive*

Arseni *et al.* (1987) ont décrit une crise dans laquelle onze nouveaux-nés de l'unité de soin intensifs ont présenté une colonisation par *E. sakazakii*. La bactérie a été isolée des fécès, ou d'écouvillons de la gorge des patients. Elle n'a pas été isolée sur le sang, LCR ou pus d'aucun des patients. Cependant, cinq patients avaient des signes de septicémie et quatre sont morts. De plus, les auteurs précisent que l'isolement d'*E. sakazakii* à partir du sang ou du LCR est rare.

Cinq cas de colonisation digestive par *E. sakazakii* ont eu lieu en France en décembre 2004 (InVS, 2004b).

Ainsi, les colonisations par *E. sakazakii* sont relativement fréquentes, puisque c'est un élément présent dans 22,9% des cas.

### *δ Taux de mortalité et de morbidité*

Le taux de mortalité est variable suivant les études, les symptômes, les antibiotiques utilisés, le poids des nourrissons à la naissance, la durée de la gestation (le taux est supérieur chez les prématurés)... (Lai, 2001)

L'étude bibliographique de Lai (2001) montre un taux de mortalité global de 33% chez les nouveau-nés et les enfants. En cas de méningite, ce taux monte à 45% de mortalité.

Weir (2002) rapporte un taux de mortalité de 50%, tandis que Muytjens *et al.* (1983) trouvent un taux de survie est de 80%.

Dans une étude, le taux de mortalité en cas d'entérocolite nécrosante est de 26% (Lucas et Cole, 1990).

Nous trouvons un taux de mortalité de 25% environ en reprenant la globalité des cas publiés que nous avons étudié. Si on enlève les cas de colonisation simple, alors le taux de mortalité reste identique.

En cas de méningite, le taux de mortalité est de 50%, en cas d'entérocolite nécrosante, de 21%.

### *ε Séquelles*

De nombreux patients ayant eu une méningite, et n'étant pas décédé ont eu de graves séquelles (Lai, 2001).

Les patients peuvent développer de l'hydrocéphalie (Joker *et al.*, 1965 ; Muytjens *et al.*, 1983 ; Willis et Robinson, 1988)

Des retards mentaux et locomoteurs plus ou moins importants sont souvent observés (Joker *et al.*, 1965 ; Kleiman *et al.*, 1981 ; Muytjens *et al.*, 1983 ; Biering *et al.*, 1989, Ries *et al.*, 1994)

Il arrive que les enfants deviennent tétraplégiques (Willis et Robinson, 1988 ; Biering *et al.*, 1989, Ries *et al.*, 1994), ou aient des hémiplésies faciales avec une déviation du regard, une audition et une vision diminuées (Willis et Robinson, 1988), de l'épilepsie (Biering *et al.*, 1989)

Gallagher et Ball (1991), Bar-Oz *et al.* (2001) ne précisent pas quelles sont les séquelles de leur patiente. De même, Burdette et Santos (2000), rapportent que leur patiente ne présente pas de séquelles à sa sortie d'hôpital. Comme aucun suivi n'est ensuite réalisé, il est difficile de savoir si elle en a eu ou non.

Il est probable que tous les patients ayant eu une méningite accompagnée de complication aient des séquelles neurologiques plus ou moins importantes.

**b** Chez les enfants :

Il y a assez peu de cas décrits chez les enfants. Lors de cas grave, une pathologie sous-jacente est fréquente. Aucun cas mortel n'a été évoqué.

*α Méningite*

Une fillette de 20 mois a présenté des signes cliniques de méningite. La tomодensitométrie a permis de diagnostiquer un abcès dermoïde localisé au niveau de la fosse postérieure. Les cultures du pus récupéré dans les abcès de l'hémisphère gauche ont permis d'isoler *Corynebacterium aquaticum*, *E. sakazakii* et *E. cloacae*. Il semble que l'enfant n'ait pas subi de séquelles particulières (Tekkök *et al.*, 1996).

*β Appendicite*

Une appendicite suppurée due à *E. sakazakii* chez un garçon de sept ans sans pathologie sous-jacente est rapportée dans la littérature (Reina *et al.*, 1989).

*χ Ostéomyélite*

Murray *et al.* (1990) décrivent un cas d'ostéomyélite due à *E. sakazakii* et *Serratia liquefaciens* chez un garçon de 16 ans après une plaie ponctiforme du pied. Le patient s'est blessé le pied avec une brindille de bois au travers de sa chaussure. Six semaines après la blessure, la plaie produit un liquide purulent jaunâtre, et de l'ostéolyse est visible à la radiographie (cf. figure 10).

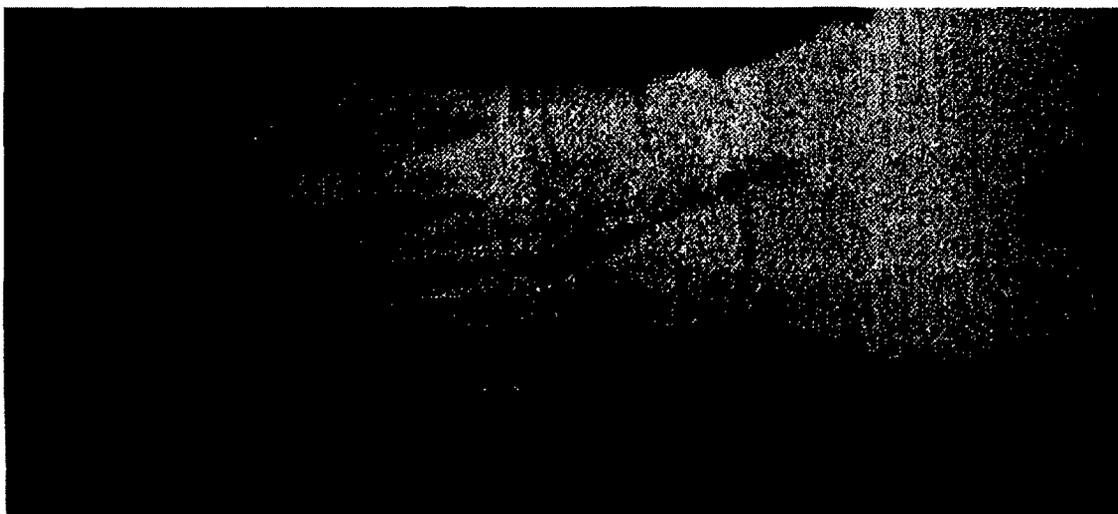


Figure 10 : Ostéomyélite due à *E. sakazakii* et *Serratia liquefaciens* (Murray *et al.*, 1990)

*δ Septicémie*

Lai (2001) décrit le cas d'un garçon de trois ans souffrant d'un rhabdomyosarcome embryonnaire de la prostate métastasant au lobe temporal. Il a subi une radiothérapie et six cycles de chimiothérapie pendant quatre mois au travers d'un cathéter. Suite à cela, il souffre d'une septicémie due à *E. sakazakii* et *Serratia marcescens*. Il guérit de sa pathologie.

### *ε Colonisation d'un cathéter*

En 1997 une culture pure d'*E. sakazakii* a été obtenue à partir d'un cathéter provenant d'un garçon de six ans. Il avait subi trois ans auparavant une transplantation de moelle osseuse à cause d'une leucémie aiguë (Block *et al.*, 2002).

### *c Chez les adultes :*

Plus de la moitié des patients adultes ont passé la soixantaine d'années. La plupart des cas sont d'origine nosocomiale. Il faut cependant noter que Reina *et al.* (1989) rapportent un cas de plaie chez un homme de vingt ans sans pathologie sous-jacente, et Ongradi (2002) une infection vaginale chez une femme de 26 ans.

### *α Septicémie*

Jimenez et Gimenez (1982) ont décrit le cas d'un patient âgé de 76 ans, qui a été admis en urgence pour un état de choc, avec une pression artérielle basse, et une alcalose respiratoire. *E. sakazakii* a été isolé de son urine et de son sang. Un traitement à base d'ampicilline et de gentamicine a été effectué, ce qui a permis la remissions clinique et microbiologique en quatre jours.

Hawkins *et al.* (1989) ont décrit un cas de septicémie chez une femme de 75 ans. Parmi ses antécédents médicaux, il est à noter de l'hypertension, de la fibrillation atriale chronique, des attaques d'apoplexie et une fracture de la hanche droite traitée chirurgicalement cinq ans auparavant. Elle est sous traitement à base de lisinopril, hydrochlorothiazide, nifédipine et coumadine. Après 36 heures d'antibiothérapie la température de la patiente est de nouveau dans les limites usuelles. Les cultures sanguines redeviennent négatives. Aucune source de la septicémie n'a pu être identifiée (échographie abdominale, cardiaque, scanner abdominal et osseux...). Au contrôle réalisé à un mois, tous les paramètres se sont révélés dans les normes

Lai (2001) décrit deux nouveaux cas de septicémie.

La patiente est une dame de 82 ans qui a subi une réparation d'anévrisme de l'aorte abdominale en urgence. L'évolution est compliquée par la formation d'un troisième secteur abdominal, avec un syndrome de détresse respiratoire, de la fièvre, de l'acidose métabolique et de l'oligurie. Neuf jours après l'opération, les cultures sanguines sont positives pour *E. sakazakii*. Elle est décédée le sixième jour.

La patiente est une dame de 73 ans admise pour l'évaluation d'une jaunisse. Une striction des canaux biliaires est mise en évidence et traitée. Une tumeur de Klatskin est mise en évidence sur le canal biliaire commun.

En post-opératoire, la patiente est en hypotension, hypoxémie et insuffisance rénale. *E. sakazakii* est isolé de la bile (avec *Serratia marcescens* et des entérocoques) et du sang. Un traitement est entamé mais la patiente décède.

### *β Pneumonie*

Lai (2001) décrit deux cas de pneumonie (mais l'auteur n'est pas sûr du rôle d'*E. sakazakii* dans l'affection car *S. aureus* a été isolé conjointement).

Le premier cas est celui d'un homme de 39 ans ayant subi une résection d'un carcinome amygdalien un an auparavant, et étant sous chimiothérapie pour les métastases.

Il est admis à l'hôpital pour une mise en place d'une sonde de gastrotomie, et a ensuite nécessité une trachéotomie d'urgence. La radiographie pulmonaire montre une bronchopneumonie probablement due à une fausse déglutition.

Ses expectorations sont purulentes et permettent l'isolement d'*E. sakazakii* et de *Staphylococcus aureus* (qui est plus vraisemblablement l'agent étiologique).

Le patient a guéri après traitement antibiotique.

La deuxième cas est celui d'une femme de 76 ans trouvée inconsciente et intubée d'urgence. Elle subit une chirurgie et développe une infection sanguine à *Candida albicans*. Trois semaines après l'opération, une radiographie pulmonaire met en évidence une infiltration et *E. sakazakii* est isolé des expectorations purulentes, ainsi que *S. aureus*. L'auteur pense qu'*E. sakazakii* n'est pas l'agent responsable de l'affection respiratoire.

Elle décède un mois après l'intervention chirurgicale.

Gosney *et al.* (2006), ont identifié *E. sakazakii* dans la bouche de plusieurs patients apoplectiques. Il semble que cet organisme puisse être responsable d'infection pulmonaire lors de déglutition défectueuse.

### χ Plaies

Deux cas de plaies contaminées par *E. sakazakii* sont décrits par Reina *et al.* (1989). Le premier est une plaie à l'aine dont l'exsudat permet la culture d'*E. sakazakii* en petite quantité. Le patient est un homme âgé de 20 ans, et ne souffre pas de pathologie intercurrente.

Le second est une plaie à un doigt, dont l'exsudat permet la culture abondante d'*E. cloacae*, et faible d'*E. sakazakii* et de *S. epidermidis*. La patiente est une femme de 32 ans souffrant de leucémie.

Dennison et Morris (2002) décrivent un cas de plaies surinfectées par *E. sakazakii* et *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*. La souche d'*E. sakazakii* était résistante à de nombreux antibiotiques. Le patient est un homme de 64 ans, souffrant d'une maladie vasculaire périphérique relativement grave. Il est transféré à l'hôpital pour complications post-opératoires.

Les antécédents pathologiques comprennent de l'athérosclérose, de l'hypertension, du diabète de l'hypercholestérolémie, et un infarctus du myocarde datant de 27 ans. Le patient fumait à cette époque et a arrêté depuis.

*E. sakazakii* et *S. aureus* sont isolés de la plaie d'amputation à gauche, et *E. sakazakii* et *Staphylococcus epidermidis* de la plaie de l'aine droite.

### δ Infection vaginale

Ongradi (2002) décrivent le cas d'une femme de 26 ans, qui souffre de vulvovaginite avec décharge muqueuse. *E. sakazakii* est isolé des écoulements.

Le seul facteur de risque trouvé est des baignades dans le lac de Baladon une semaine avant le début des symptômes, alors que l'eau était chaude (26-28°C).

---

## 2. Lésions

### a Lésions macroscopiques:

Les lésions principales se trouvent au niveau de l'encéphale. Les leptomeninges ne présentent pas d'exsudat visible. Les hémisphères cérébraux sont très oedémateux et les circonvulsions moins marquées. A la surface de coupe, quelques hémorragies pétéchiales sont présentes au niveau du cortex, et la substance blanche est transformée en une masse hémorragique molle. Le cervelet, le tronc cérébral (brainstem) et la moelle épinière apparaissent pâles, mais fermes (Urmenyi *et al.*, 1961).

L'encéphale est mou, oedémateux et avec des points de nécrose (Muytjens *et al.*, 1983), et certains notent la présence d'hémorragies ventriculaires (Biering *et al.*, 1989).

### b Lésions microscopiques:

L'encéphale comporte de l'inflammation hémorragique et nécrotique due à l'invasion par les bacilles à Gram négatif (Urmenyi *et al.*, 1961).

Les tableaux 16 et 17 résument les différents cas décrits.

Tableau 16: Tableau récapitulatif de toutes les crises chez les enfants et nouveau-nés dues à *Enterobacter sakazakii*

Année de la crise	Nombre de patients	Age	Nombre de décès	Symptômes	Source	Référence
1958	2	5 à 11 jours	2	Méningite	Inconnue	Urmenyi <i>et al.</i> (1961)
1965	1	6 jours	0	Méningite	Inconnue	Joker <i>et al.</i> (1965)
	1	7 jours	0	Septicémie	Inconnue	Monroe <i>et al.</i> , (1979)
	1	5 semaines	0	Méningite, abcès, compartimentalisation des ventricules	Inconnue	Kleiman <i>et al.</i> (1981)
1977-1981	8	3 à 9 jours	6	Méningite, septicémie, entérocolite nécrosante	Inconnue (poudre de lait ?)	Muytjens <i>et al.</i> (1983)
1984	11	?	4	Colonisation, SDR <sup>a</sup> , septicémie, méningite	Inconnue	Arseni <i>et al.</i> (1987)
1984	2	8 à 28 jours	0	Méningite, hydrocéphalie	NS	Willis et Robinson (1988)
1986-1987	3	5 jours	1	Méningite	Poudre de lait	Biering <i>et al.</i> (1989), Clark <i>et al.</i> (1990)
1988	4	13 à 52 jours	0	Septicémie, diarrhée sanglante	Poudre de lait, mixeur	Simmons <i>et al.</i> (1989), Clark <i>et al.</i> (1990)
1988 ?	2	10 jours et 7 ans	0	Appendicite, Conjonctivite	NS	Reina <i>et al.</i> (1989)
1990 ?	1	6 mois	0	Septicémie	Mixeur	Noriega <i>et al.</i> (1990)
1993 ?	1	8 jours	0	Méningite		Ries <i>et al.</i> (1994)
1993 ?	1	20 mois	0	Méningite		Tekkök <i>et al.</i> (1996)
1996	1	3 ans	0	Septicémie	NS	Lai (2001)
1998	12	5 à 55 jours	2	Entérocolite Nécrosante	Poudre de lait	Van Acker <i>et al.</i> (2001)
1993-1998	4	?	?	Septicémie, méningite, conjonctivite	NS	Block <i>et al.</i> (2002)
1999	1	5 jours	0	Méningite, septicémie	NS	Burdette et Santos (2000)
1998-2001	1	12 jours	0	Septicémie	NS	Stoll <i>et al.</i> (2004)
1999-2000	5	4 jours à 6 semaines	0	Méningite, septicémie, portage asymptomatique	Mixeur (poudre de lait ?)	Bar-Oz <i>et al.</i> (2001a), Block <i>et al.</i> (2002)
2001	10	11 jours	1	Méningite, colonisation, infection suspectée	Poudre de lait	Himelright <i>et al.</i> (2002)
2002	1	5 jours	1	Méningite	NS	IBFAN (2002)
2004	10		2	Infections et colonisation digestive	NS	InVS (2004c), Coignard <i>et al.</i> (2006)

<sup>a</sup> Syndrome de Détresse Respiratoire

**Tableau 17: Récapitulatif des infections chez les adultes dues à *Enterobacter sakazakii***

<i>Année de la crise</i>	<i>Nombre de patients</i>	<i>Age</i>	<i>Nombre de décès</i>	<i>Symptômes</i>	<i>Source</i>	<i>Référence</i>
1980	1	76 ans	0	Septicémie	NS <sup>a</sup>	Jimenez et Gimenez (1982)
1988 ?	2	20 et 32 ans	0	Plaie	NS	Reina <i>et al.</i> (1989)
1990	1	16 ans	0	Ostéomyélite	NS	Murray <i>et al.</i> (1990)
1991	1	75 ans	0	Septicémie	Inconnue	Hawkins <i>et al.</i> (1991)
1996	4	39 à 82 ans	3	Septicémie, pneumonie	NS	Lai (2001)
2001	1	26 ans	0	Vulvo-vaginite	Eau de surface ?	Ongradi (2002)
2002	1	64 ans	0	Infection de plaie	NS	Dennison et Morris (2002)

<sup>a</sup> Non signalé

- ☠ Environ 80 cas d'infections dues à *E. sakazakii* ont été décrits chez les nourrissons et enfants, et 10 chez des adultes. Dix cas groupés ont été décrits, pour onze cas sporadiques ; et les cas groupés comptent entre deux et douze patients.
- ☠ Chez les nourrissons :
  - ☛ Le symptôme le plus fréquent est la méningite (32,9%). Le taux de mortalité est d'environ 50%, et lorsque les patients survivent, les séquelles (hydrocéphalie, retards mentaux et locomoteurs) sont quasi-systématiques ;
  - ☛ Les colonisations (digestives, trachéales...) sont la deuxième manifestation (22,9%) ;
  - ☛ L'entérocolite nécrosante est fréquente également (20%), avec un taux de mortalité de 25% ;
  - ☛ Des septicémies sont possibles (15,7%) ;
  - ☛ D'autres symptômes sont décrits (conjonctivites...), et l'association de plusieurs éléments est possible.
- ☠ Chez les enfants, l'infection par *E. sakazakii* est moins fréquente, et provoque des maladies diverses (appendicite, ostéomyélite, septicémie).
- ☠ Les infections chez les adultes sont composées de septicémies (33,3%), pneumonies (23,4%), ou plaies (33,3%). En règle générale, les individus sont âgés de plus de 60 ans et souffrent de maladies intercurrentes.
- ☠ .Les lésions se situent au niveau de l'encéphale. Elles sont inflammatoires.

---

## C / DIAGNOSTIC

### 1. Epidémiologique

Les infections par *E. sakazakii* ne sont pas fréquentes. Himelright *et al.* (2002) estiment que le taux d'infection par *E. sakazakii* chez les enfants de moins de un an est de 1 pour 100 000, alors que ce taux est de 8,7 pour 100 000 chez les nouveaux-nés de faible poids à la naissance.

Il est donc impossible de penser à une infection par *E. sakazakii* sans confirmation expérimentale.

### 2. Clinique

Nous avons vu les différentes expressions cliniques possibles d'une infection par *E. sakazakii*. Sur les nourrissons, il faut surtout craindre les méningites, septicémies et entérocolites nécrosantes. Chez le reste de la population, seul un isolement de la bactérie dans un liquide biologique permet de poser un diagnostic.

### 3. Expérimental

#### a Biologique

L'isolement d'*E. sakazakii* dans le sang permet de suspecter une septicémie, dans le LCR, une méningite. Lorsque la bactérie est cultivée à partir d'un site non stérile en temps normal, elle peut être responsable d'une colonisation (pas de répercussion clinique) ou d'une infection (entérocolite nécrosante...).

#### b Imagerie médicale

Burdette et Santos (2000) conseillent d'effectuer systématiquement un scanner ou mieux une IRM pour mettre en évidence les abcès cérébraux aussitôt qu'*E. sakazakii* est isolé d'un patient.

- ✘ Le diagnostic est essentiellement biologique, avec la mise en évidence de la bactérie.
- ✘ Les méthodes d'imagerie médicale sont essentielles pour le suivi des lésions du système nerveux central.

## **D / PREMIERS SOINS ET TRAITEMENT**

### **1. Réanimation**

Si l'état du patient le nécessite, une réanimation d'urgence doit être réalisée. Les Unités de Soins Intensifs de néonatalogie, ou les services d'Urgences des hôpitaux s'en chargent.

### **2. Traitement de l'infection**

Une antibiothérapie doit être réalisée (Agence de santé publique du Canada, 2001).

Willis et Robinson (1988) considèrent que le traitement à base d'ampicilline et de gentamicine est le « Gold Standard » pour le traitement des affections dues à *E. sakazakii*. L'ajout du chloramphénicol à la place de la gentamicine est possible (Lai, 2001). Malheureusement, la bactérie a développé des résistances à ces antibiotiques (Lai, 2001, Dennison et Morris, 2002).

L'utilisation de l'association sulfaméthazole-triméthoprim est également possible, puisque la bactérie n'y est pas résistante (Lai, 2001).

Muytjens *et al.* (1983) conseillent l'utilisation des bêta-lactamines récentes (moxalactam ou cefotaxime) en première intention, plutôt que l'association commune ampicilline-gentamicine. En effet, les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des  $\beta$ -lactamines récentes sont bien plus basses que celle de l'ampicilline et elles pénètrent mieux dans le système nerveux central. Si aucune amélioration clinique n'est notée, une ponction ventriculaire est indiquée, pour exclure une ventriculite persistante.

Dans les cas qu'ils ont eu à traiter, Lecour *et al.* (1989) ont également montré que l'utilisation de cefotaxime était à favoriser. Il convient cependant de noter que Dennison et Morris (2002) ont trouvé une souche d'*E. sakazakii* résistante à cet antibiotique.

De la même façon, Lehner et Stephan (2004) pensent que la conduite thérapeutique à adopter chez les patients atteints de méningite à *E. sakazakii* repose sur l'utilisation de céphalosporines de troisième génération, en utilisant si possible les molécules les plus récentes, et en leur associant un aminoside. Cependant, la pénétration des aminosides dans le système nerveux central est faible, ce qui pourrait limiter leur utilisation aux voies intra-ventriculaires et intraveineuses (Lai, 2001).

Le taux de mortalité chez les patients souffrant de méningite avant l'utilisation des céphalosporines de troisième génération était de 62%. Il a chuté à 14% depuis leur utilisation (Lai, 2001).

Dennison et Morris (2002) conseillent l'utilisation de carbapénems, ou de céphalosporines récentes associées à un deuxième agent pour traiter les affections dues à *E. sakazakii*.

Block *et al.* (2002) ne pensent pas qu'un traitement de base doit être conseillé, mais que l'antibiothérapie doit être laissée à l'appréciation du clinicien et basée sur l'antibiogramme de la souche.

Quoiqu'il en soit, un antibiogramme doit être fait systématiquement (Dennison et Morris, 2002).

### 3. Traitement des convulsions

Fréquemment, les méningites dues à *E. sakazakii* sont associées à des convulsions. Il faut donc les contrôler.

Le phénobarbitone (Willis et Robinson, 1988) et la paraldéhyde (Urmenyi et Franklin, 1961) ont été utilisés.

#### E / IMMUNISATION NATURELLE

Aucune immunisation naturelle n'a été mise en évidence (Agence de santé publique du Canada, 2001).

#### F / VACCINATION

Aucune information spécifique concernant la vaccination contre *E. sakazakii* n'est disponible (Agence de santé publique du Canada, 2001).

#### G / UTILISATION DE PEPTIDES NATURELS AUX PROPRIETES ANTIBACTERIENNE

Des peptides naturels sont produits dans le cadre d'une réponse immunitaire innée. Ils sont de composition chimique variés et produits de manière naturelle en grande quantité et possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes non spécifiques. Certaines bactéries produisent également ces peptides bioactifs.

Trois peptides produits par *Lactobacillus acidophilus* semblent avoir des propriétés intéressantes, qui pourraient être utilisées pour prévenir les infections à *E. sakazakii* chez les nouveaux-nés, notamment en les ajoutant aux poudres de lait (Hayes *et al.*, 2006).

☠ Une réanimation doit être entreprise en premiers lieux.

☠ Le traitement antibiotique doit prendre en compte l'évolution des résistances au sein de l'espèce. L'antibiogramme est nécessaire.

☛ L'utilisation des céphalosporines de troisième génération, pour leur pénétration dans le système nerveux central, associées à un aminoside est conseillée ;

☛ L'association d'un carbapenem et d'un deuxième agent est efficace ;

☛ Le sulfaméthazole-triméthoprimine pourrait être une solution.

☠ Les convulsions doivent être maîtrisées par un traitement adapté.

---

### III - EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS LIEES A *ENTEROBACTER SAKAZAKII*

---

#### A / STATUT EPIDEMIOLOGIQUE

##### 1. Fréquence

###### a Fréquence mondiale

Les infections provoquées par *Enterobacter sakazakii* sont rares. Environ 80 cas d'infections confirmées ou suspectées, et de colonisations à *E. sakazakii*, chez des nouveaux-nés ont été rapportées. Une dizaine de cas chez les adultes seulement.

Ces chiffres sont certainement sous-estimés, pour plusieurs raisons. Premièrement, il se pourrait que de nombreuses crises soient passées inaperçues dans la mesure où avant l'identification d'*Enterobacter sakazakii* comme une espèce bactérienne à part entière, certaines bactéries mises en cause auraient pu être *E. sakazakii* (Farmer *et al.*, 1980). Ainsi, *Praschechia flavescens* a été identifié, à posteriori, comme étant en fait *E. sakazakii* (Farmer *et al.*, 1985).

Deuxièmement, il faut noter que tous les cas de méningites néonatales dues à *Enterobacter sakazakii* ne sont pas publiés (Lehner et Stephan, 2004).

Enfin, les moyens nécessaires au diagnostic relèvent de la spécialisation (Fiche de description du danger, 2005).

###### b Fréquence à l'échelle de pays

Aucune donnée épidémiologique n'est actuellement publiée en France (Afssa, 2005), mais il est possible d'en avoir dans d'autres pays.

Dans une analyse des données microbiologiques de 1994 à 1999, Lai (2001) a montré que 3,6% des infections sanguines de l'hôpital de Boston étaient dues à des espèces bactériennes du genre *Enterobacter*. *E. sakazakii* n'était l'agent étiologique que lors de l'année 1996, et représentait 0,4% des infections sanguines.

Himelright *et al.* (2002) estiment que le taux d'infection par *E. sakazakii* chez les enfants de moins de un an est de 1 pour 100 000, alors que ce taux est de 8,7 pour 100 000 chez les nouveaux-nés de faible poids à la naissance.

L'équipe de recherche du National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) aux Etats-Unis a mené une étude rétrospective sur les nouveaux-nés de faible poids à la naissance (entre 0,401 et 1,500 kg), de septembre 1998 à décembre 2001, pour déterminer le taux d'infection à *E. sakazakii*.

Sur les 10 660 enfants étudiés, 6 825 (64%) ont eu une ou plusieurs cultures de sang ou de LCR faite. Au total 31 777 cultures sanguines et 5 433 cultures de LCR ont été réalisées. 20% des cultures de sang (6 323) et 6% des cultures de LCR (314) étaient positives pour des agents bactériens ou fongiques. Deux pourcent des cultures (135) étaient positives pour *Enterobacter* (soit 1% de tous les nourrissons), et une seule culture positive pour *E. sakazakii* (75% des *Enterobacter* sont des *E. cloacae*, 15% des *E. aerogenes*).

En dehors des situations d'épidémie, les infections systémiques dues à *E. sakazakii* sont très rares chez les enfants prématurés (Stoll *et al.*, 2004).

## 2. Répartition géographique

Les cas d'infections à *Enterobacter sakazakii* ont eu lieu dans des pays développés principalement. Ils ont été rapportés aux Etats-Unis, en Angleterre, en Islande, au Danemark, aux Pays Bas, en Belgique, en Israël, en France et en Grèce.

## 3. Population concernée

Les nouveaux-nés représentent la majorité des patients atteints (87,8%). Des adultes et des enfants sont parfois touchés également (12,2%).

Les nouveaux-nés les plus fréquemment atteints semblent être les prématurés et ceux de faible poids à la naissance (confère partie sur l'émergence).

La commission du Codex Alimentarius (2004) considère que les populations à risque sont les nourrissons nés avant terme, après moins de 36 semaines de gestation, jusqu'à l'âge de 4 à 6 semaines, les nourrissons immunodéprimés de tout âge et les nourrissons nés à terme et hospitalisés dans des unités néonatales de soins intensifs de niveau 2 et 3.

Plus de la moitié des patients adultes ont passé la soixantaine d'années. La plupart des cas sont d'origine nosocomiale. Il faut cependant noter que des cas d'infection sans pathologie sous-jacente.

Himelright *et al.* (2002) pensent que l'immunodépression favorise l'apparition de la maladie.

- ☠ Les infections à *E. sakazakii* sont relativement rares (90 cas publiés environ), mais certainement sous-estimées. Aucune donnée n'est disponible en France.
- ☠ Les infections à *E. sakazakii* touchent surtout les pays développés
- ☠ La population à risque est constituée :
  - ☛ Des nourrissons nés avant terme, après moins de 36 semaines de gestation, jusqu'à l'âge de 4 à 6 semaines ;
  - ☛ Des nourrissons immunodéprimés de tout âge ;
  - ☛ Des nourrissons nés à terme et hospitalisés dans des unités néonatales de soins intensifs de niveau 2 et 3.

## **B / RESERVOIR**

*E. sakazakii* a été isolé des intestins de larves de *Stomoxys calcitrans*, originaires d'exploitations agricoles du nord du Pays de Gales (Hamilton *et al.*, 2003) et du Kansas et de la Floride (Mramba *et al.*, 2006) et des intestins de colonies d'*Anastrepha ludens* (Kuzina *et al.*, 2001).

### **1. Anastrepha ludens**

Kuzina *et al.* (2001) ont isolé *E. sakazakii* ainsi que d'autres germes (*Bacillus cereus*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*) dans les intestins d'*A. ludens* aussi mâle que femelle. Le rôle écologique de ces bactéries n'est pas clairement défini.

### **2. Stomoxys calcitrans**

*S. calcitrans* ont été élevés en laboratoires, les larves récupérées du milieu de culture, lavées dans une solution saline stérile et stérilisées en surface par l'immersion dans de l'éthanol à 100%. Les intestins des larves ont été disséqués de manière aseptique, et placés individuellement dans des géloses de culture, qui ont été incubées à 24°C durant la nuit. Chaque colonie bactérienne isolée a ensuite été identifiée par PCR 16S rARN (Hamilton *et al.*, 2003).

*E. sakazakii*, *P. stuartii*, *Erwinia carotovora*, *Micrococcus luteus* et *Serratia marcescens* sont isolés.

La distribution géographique de la mouche est identique à celle d'*E. sakazakii*, et de plus, elle est fréquente dans les étables et pourrait ainsi contaminer le lait de vache (Hamilton *et al.*, 2003).

Mramba *et al.* (2006) ont mené une étude sur 928 mouches provenant du Kansas et de la Floride. Ils ont identifiés *E. sakazakii* en utilisant une PCR 16S. Deux individus (0,2%) étaient positifs pour *E. sakazakii*. De plus, 411 (44%) des mouches portaient des bactéries présumées entériques et 120 (13%) des coliformes fécaux. Il semble donc que *S. calcitrans* soit porteuse de bactéries typiquement présentes dans le fumier des animaux (un des site de développement de ses larves).

### **3. Musca domestica**

Hamilton *et al.* (2003) rapportent l'existence d'un rapport technique d'une entreprise d'extermination d'insectes nuisibles des Etats-Unis ayant enregistré la présence d'*E. sakazakii* chez une mouche domestique (*Musca domestica*). La localisation exacte de la bactérie chez la mouche n'est pas précisée.

### **4. Réservoir naturel**

L'étude de Mramba *et al.* (2006) suggère que le réservoir naturel d'*E. sakazakii* pourrait être le tractus digestif ou le fumier des animaux domestiques. La faible prévalence de la bactérie associée à *S. calcitrans* laisse supposer que cette dernière ne joue pas un rôle majeur en tant que réservoir ou vecteur du pathogène.

La présence d'*E. sakazakii* chez les insectes est très préoccupante dans la mesure où elle soulève la possibilité d'une contamination environnementale par les insectes (notamment dans les usines de fabrication de préparation de poudres de laits pour nourrissons), et une dissémination du germe (Hamilton *et al.*, 2003).

- 
- ✖ Le seul réservoir connu d'*E. sakazakii* est constitué d'insectes (*Anastrepha ludens*, *Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica*). La faible prévalence de la bactérie laisse supposer que ceux-ci ne jouent pas un rôle majeur en tant que réservoir ou vecteur du pathogène.
  - ✖ le réservoir naturel d'*E. sakazakii* pourrait être le tractus digestif ou le fumier des animaux domestiques.
  - ✖ Le risque de contamination environnementale est important.

## C / SOURCE ET MODE DE TRANSMISSION

Jusqu'aux crises décrites par Biering *et al.* (1989) et Simmons *et al.* (1989), la source et le mode de contamination d'*Enterobacter sakazakii* sont restés inconnus. Muytjens *et al.* (1983) avaient suspecté les préparations en poudre pour nourrissons, mais n'avaient pas réussi à prouver leur hypothèse.

Le tableau 19 est un récapitulatif de toutes les sources possibles d'*E. sakazakii*.

### 1. Sources d'*E. sakazakii*

#### a Environnement

*Enterobacter sakazakii* est retrouvé dans ne nombreux milieux. Muytjens *et al.* (1990) n'ont pas réussi à isoler *E. sakazakii* de l'eau de surface, du sol, de la boue, de bois en décomposition, de graines, de fumier d'oiseaux, de rongeurs, d'animaux domestiques, du bétail ou de lait de vache cru.

Cependant, deux souches d'*E. sakazakii* provenant d'eau ont été étudiées (Goulet et Picard, 1986), et des *Enterobacteriaceae* colorés en jaune, dont *E. sakazakii* ont été isolés d'eau traitée (Leclerc *et al.*, 2001).

De plus, *E. sakazakii* a été isolé de quatre usines productrices de poudre de lait, de céréales, de chocolat, de farine de patate, de pâtes, ainsi que dans seize foyers domestiques. Les échantillons sont obtenus en grattant ou essuyant des surfaces de la ligne de production, en récupérant des contenus de sacs d'aspirateurs, aussi bien dans les usines que dans les foyers domestiques (Kandhai *et al.*, 2004a).

La bactérie a aussi été retrouvée dans une boîte de culture au sang non encore usagée. *E. sakazakii* était alors un contaminant, et aurait été considéré comme isolé du patient (Farmer *et al.*, 1980).

*E. sakazakii* a été isolé sur le stéthoscope d'un médecin (Farmer *et al.*, 1980).

Goulet et Picard (1986) ont étudié une souche provenant d'un oiseau.

#### b Aliments

##### *α Poudres de lait*

En 1980, lors de la dénomination officielle d'*E. sakazakii* par Farmer *et al.* (1980), une de leurs 57 souches provenait de lait déshydraté.

En 2002, la FDA (2002c) a averti pour la première fois les professionnels de la possibilité de la présence d'*E. sakazakii* dans les préparations en poudre pour nourrissons, et de la possibilité que l'infection soit due à l'alimentation des nouveaux-nés par ces préparations.

##### ☞ Etude de Postupa et Aldova (1984)

Quatre souches d'*E. sakazakii* ont été isolées de poudre de lait et deux souches de préparation en poudre pour nourrissons. Tous les échantillons avaient une origine commune.

#### ☞ Etude de Muytjens et al. (1988)

Muytjens et al. (1988) ont analysé 141 poudres de lait différentes, provenant de 35 pays avec leur méthode d'enrichissement (eau peptonée tamponnée et bouillon d'enrichissement d'*Enterobacteriaceae*). Des *Enterobacteriaceae* ont été mis en évidence dans 52,5% des poudres, provenant de 28 pays différents.

*E. sakazakii* a été isolé de 20 poudres (14,2%), pouvant être obtenues dans 13 pays, dont les Etats-Unis. C'était le troisième micro-organisme isolé en fréquence, derrière *E. agglomerans* et *E. cloacae*. La concentration d'*E. sakazakii* variait de 0,36 à 66,00 CFU/100g. (moyenne de 4,36 CFU/100g). Toutes les poudres étaient conformes aux recommandations de la FAO (moins de 3 CFU d'*Enterobacteriaceae*/g de poudre).

#### ☞ Etude de Nazarowec-White et Farber (1997b)

Nazarowec-White et Farber (1997b), ont analysé 120 boîtes de poudres de lait provenant de cinq entreprises canadiennes. Huit boîtes (6,4%) ont permis d'isoler *E. sakazakii*. La quantité trouvée était de 0,36 CFU/100g. Sur les cinq usines dont provenaient les poudres de lait, la contamination variait de 0 à 12% des échantillons.

#### ☞ Etude de Heuvelink et al. (2001)

Deux cent onze poudres de lait ont été examinées, dont 40 préparations pour nourrissons. Des souches d'*E. sakazakii* ont été isolées de 7 échantillons de poudre de lait, et d'une préparation pour nourrisson (Heuvelink et al., 2001).

#### ☞ Etude de Heuvelink et al. (2003)

Vingt-cinq grammes de 101 préparations pour nourrissons ont été analysés. Deux souches d'*E. sakazakii* ont été trouvées et aucune souche de *Salmonella* spp. (Heuvelink et al., 2003).

#### ☞ Etude d'Iversen et Forsythe (2004a)

L'étude de Muytjens et al (1988), bien que complète ne reflète pas forcément l'état actuel des poudres de lait, c'est pourquoi, Iversen et Forsythe (2004a) ont mené une nouvelle étude.

Les échantillons ont été collectés de mars à octobre 2003. Ce sont 82 poudres de lait pour nourrissons, 72 poudres de lait, et 332 autres échantillons divers (49 aliments déshydratés pour nourrissons, 8 poudres de lactose, 62 produits à base de fromage, 25 viandes et salades, 122 herbes et épices et 66 aliments secs divers). Au total, 486 échantillons ont été analysés, principalement provenant de Grande Bretagne.

L'analyse se fait sur 25 g d'échantillon et est répétée trois fois (avec des ajustements suivant le poids des échantillons).

Les méthodes décrites par Muytjens et al. (1988), et celle décrite par Iversen et al. (2004) sont utilisées. *E. sakazakii* est cherché, ainsi que d'autres *Enterobacteriaceae* et *Salmonella* spp..

*E. sakazakii* est isolé de 2 des 82 poudres de lait pour nourrissons (2,4%), et de 3 des 72 poudres de lait (4,2%). La contamination est inférieure à 100 CFU/g (à vérifier, je n'ai pas bien compris l'article).

Quarante-neuf poudres de lait pour nourrissons contenaient des *Enterobacteriaceae* (60%). Les espèces les plus fréquemment isolées sont *E. agglomerans* et *Pantoea* spp., ce qui diffère de l'étude de Muytjens et al. (1988), mais qui peut s'expliquer par un changement de taxonomie.

Aucune *Salmonelle* n'a été isolée des poudres, ce qui montre que ce risque est maîtrisé, contrairement au risque *E. sakazakii* (Iversen et Forsythe, 2004a).

### ☞ Etude de Leuschner et al. (2004)

Leuschner *et al.* (2004) ont analysé 58 poudres de lait pour nourrissons, provenant de 11 pays différents en utilisant leur méthode de détection explicitée plus haut (mise en évidence conjoint de la pigmentation jaune des colonies et de l' $\alpha$ -glucosidase).

Vingt et un produits (36%) étaient positifs pour les *Enterobacteriaceae*, et *E. sakazakii* a été isolé de huit des 58 produits, soit 13,8%.

Dans deux produits, deux échantillons étaient positifs. Ceci indique que la bactérie doit être présente en faible nombre et avec une distribution hétérogène. *E. sakazakii* était dans sept des huit produits positifs, présent conjointement avec d'autres *Enterobacteriaceae*. La variété des espèces présentes dans les poudres de lait pourrait être le reflet du statut hygiénique de l'environnement de la production.

### ☞ Etude de Heuvelink et al. (2004)

Dans une étude portant sur 101 échantillons de poudre de lait, *E. sakazakii* n'a pas été retrouvé. L'analyse a été fait par deux méthodes sur 50 g d'échantillon, une de culture classique et une méthode PCR (Heuvelink *et al.*, 2004).

Les résultats de toutes ces études sont résumés dans le tableau 18 ci-dessous.

**Tableau 18: Contamination des poudres de lait par *E. sakazakii* et les *Enterobacteriaceae***

Nombre de poudre de lait étudiées	Présence d' <i>Enterobacteriaceae</i> <sup>a</sup>	Présence d' <i>E. sakazakii</i> <sup>a</sup>	Référence
141	52,5%	14,2%	Muytjens <i>et al.</i> (1988)
120		6,2% (8)	Nazarowec-White et Farber (1997b)
40 et 171 <sup>b</sup>		2,5% (1) et 4,1 (7)	Heuvelink <i>et al.</i> (2001)
101		2% (2)	Heuvelink <i>et al.</i> (2003)
82 et 72 <sup>c</sup>	60% (49) <sup>c</sup>	2,4% (2) et 4,2% (3)	Iversen et Forsythe (2004a)
58	36% (21)	13,8% (8)	Leuschner <i>et al.</i> (2004)
101		0	Heuvelink <i>et al.</i> (2004)

## $\beta$ *Autre aliments*

### ☞ Aliments à base de viande

*E. sakazakii* a été retrouvé dans sept échantillons de fromage, sept échantillons de bœuf haché et sept échantillons de chair à saucisse (Leclercq *et al.*, 2002). Goulet et Picard (1986) ont étudié une souche provenant d'une saucisse.

### ☞ Végétaux et aliments à base de végétaux

<sup>a</sup> Le nombre de poudres positives est indiqué entre parenthèses

<sup>b</sup> Le premier chiffre correspond aux préparations en poudre pour nourrissons et le second aux poudres de lait

<sup>c</sup> Nombre donné uniquement sur les préparations en poudre pour nourrissons

---

Gassem (1999) a isolé *E. sakazakii* dans un pain fermenté typique d'Arabie Saoudite (le Khamir), fait à partir de deux variétés locales de sorgho (Baydah et Hamra).

Coulin *et al.* (2006) ont également isolé le germe dans de l'attiéké, un aliment fermenté typique de Côte d'Ivoire. Il a été retrouvé en grand nombre en même temps que d'autres germes sensibles à l'acidité (*Bacillus* spp., *Klebsiella* spp.), mais le processus de fermentation entraîne une diminution importante de leur croissance. Au final la proportion de germe résiduel est très faible.

La bactérie a été isolée de quatre échantillons de légumes. (Leclercq *et al.*, 2002), et une étude norvégienne a mis en évidence la présence d'*E. sakazakii* dans des échantillons de bourgeons de fèves. La bactérie a été isolée conjointement avec *E. cloacae*, *K. pneumoniae* et *E. coli* dans 25% des échantillons (24 sur 62) et dans des concentrations diverses (entre  $0,2 \times 10^2$  et  $1,4 \times 10^7$  CFU/g). Par contre, la bactérie n'a pas été isolée de l'eau d'irrigation (Roberston *et al.*, 2002).

### ☪ Boisson

*E. sakazakii* a été isolé d'une boisson traditionnelle de Jordanie, appelée le Sous, et préparée par extraction des racines séchées de *Glycyrrhiza glabra*. La préparation est simple, et l'eau est l'ingrédient majeur. Cependant, aucune mesure d'hygiène particulière n'est prise. Cette boisson a un pH alcalin (8,6 en moyenne), et est extrêmement déshydratante.

Vingt et un échantillons de cette boisson ont été analysés. Ils provenaient tous du marché d'Amman. Deux échantillons (9,5%) ont permis la culture d'*Enterobacteriaceae*, *Erwina* sp. a été isolé dans le premier, et *E. sakazakii* dans le deuxième (2,8 log CFU/mL). La bactérie n'a pas été isolée de la deuxième boisson traditionnelle étudiée, le Tamarind, préparée par infusion de *Tamarindus indica* (Nassereddin et Yamani, 2005).

### ☪ Autres

Dans leur étude citée précédemment, Iversen et Forsythe (2004a) ont isolé *E. sakazakii* de 5 des 49 aliments déshydratés pour nourrissons, de 40 des 122 échantillons d'herbe et d'épices, et de 15 des 66 autres aliments desséchés (noisettes, graines, fruits...). La bactérie n'a pas été isolée des 8 poudres de lactose, 62 produits à base de fromage et 25 échantillons d'aliments frais (7 viandes, 20 salades). Ils ont utilisé conjointement la méthode d'isolement de la FDA et le milieu DFI.

Heuvelink *et al.* (2004), n'ont pas réussi à isoler ni *E. sakazakii*, ni *Salmonelle* spp. à partir de 87 échantillons de 50 g de glace et de 12 échantillons de 50 g de poudre pour préparation de pudding instantanée. Ils ont combiné une méthode de culture classique et une méthode PCR

## c Clinique

De nombreuses sources cliniques ont été citées dans la partie concernant les symptômes. *E. sakazakii* est notamment isolé du sang (lors de septicémie) du LCR (lors de méningite), des fèces (lors de colonisation digestive ou d'entérocolite nécrosante), d'exsudats de plaie...

Lorsque la bactérie est isolée dans une autre localisation, il faut prendre garde à une éventuelle contamination secondaire, et ne pas conclure tout de suite sur le lien de cause à effet (Farmer *et al.*, 1980).

Des localisations atypiques ont été décrites dans la littérature. Sur leur 57 souches, Farmer *et al.* (1980), en avaient deux de moelle osseuse, deux provenant d'yeux, un d'une oreille et une d'un abcès mammaire. Goulet et Picard (1986) avaient une souche sur 22 provenant d'une dent

Tableau 19: Sources d'*Enterobacter sakazakii* d'après la littérature

Source	Détails	Références
Nouveaux-nés et enfants	Méningite (LCR)	Urmenyi et Franklin (1961), Farmer <i>et al.</i> (1980), Kleiman <i>et al.</i> (1981), Muytjens <i>et al.</i> (1983), Arseni <i>et al.</i> (1987), Willis et Robinson (1988), Biering <i>et al.</i> (1989), Simmons <i>et al.</i> (1989), Clark <i>et al.</i> (1990), Burdette et Santos (2000), Bar-Oz <i>et al.</i> (2001), Lai (2001)
	Septicémie (sang) Entérococolite nécrosante Conjonctivite, appendicite suppurée Septicémie Plaies	Monroe <i>et al.</i> (1979), Clark <i>et al.</i> (1990), Bar-Oz <i>et al.</i> (2001) Farmer <i>et al.</i> (1980), Van Acker <i>et al.</i> (2001) Reina <i>et al.</i> (1989) Hawkins <i>et al.</i> (1991), Lai (2001)
Adultes	Plaies Abscess mammaire, moelle osseuse, œil, gorge, nez, expectorations, oreille Dent, nez Bouche de patients apoplexiques	Farmer <i>et al.</i> (1980), Reina <i>et al.</i> (1989) Farmer <i>et al.</i> (1980) Goulet et Picard (1986) Gosney <i>et al.</i> (2006)
	Poudre de lait pour nourrissons	Postupa et Aldova (1984), Biering <i>et al.</i> (1989), Simmons <i>et al.</i> (1989), Muytjens <i>et al.</i> (1988), Nazarowec-White et Farber (1997b), Bar-Oz <i>et al.</i> (2001), Heuvelink <i>et al.</i> (2001), Block <i>et al.</i> (2002), Himelright at al. (2002), Heuvelink <i>et al.</i> (2003), Iversen et Forsythe (2004a), Leuschner <i>et al.</i> (2004)
Aliments et boisson	Matériel de préparation (mixeur, cuillère...) Poudre de lait	Clark <i>et al.</i> (1990), Bar-Oz <i>et al.</i> (2001), Block <i>et al.</i> (2002) Farber <i>et al.</i> (1980), Postupa et Aldova (1984), Muytjens <i>et al.</i> (1988), Nazarowec-White et Farber (1997b), Heuvelink <i>et al.</i> (2001), Iversen et Forsythe (2004a), Heuvelink <i>et al.</i> (2004)
	Pain fermenté	Gassem (1999)
	Attiéké	Coulin <i>et al.</i> (2006)
	Laitue	Soriano <i>et al.</i> (2001)
	Bourgeons de fèves	Roberston <i>et al.</i> (2002)
	Fromage, bœuf hachée, chair à saucisse, légumes Alimenté déshydraté pour nourrisson, fromage, herbes et épices, produits secs (graines, noisettes)	Leclercq <i>et al.</i> (2002) Iversen et Forsythe (2004a)
	Saucisse Sous	Goulet et Picard (1986) Nasserredin et Yamani (2005)

<p><b>Environnement</b></p>	<p>Usine de fabrication de poudre de lait, chocolat, céréales, farine de patate, pâtes (ligne de fabrication, sac d'aspirateur) Foyers domestiques (sacs d'aspirateurs) Stéthoscope , boîte de culture au sang « stérile » Eau Oiseau</p>	<p>Kandhai <i>et al.</i> (2004a)  Kandhai <i>et al.</i> (2004a) Farmer <i>et al.</i> (1980) Goulet et Picard (1986), Leclerc <i>et al.</i> (2001) Goulet et Picard (1986)</p>
-----------------------------	---	---

## 2. Mode de transmission

Depuis les premiers cas d'infection à *E. sakazakii* décrits par Urmenyi et Franklin (1961), de nombreux modes de transmission ont été évoqués. Depuis, il semble que ce soit par voie alimentaire *via* les préparations de poudres de lait pour nourrissons. Cependant, ce mode de transmission n'explique pas toutes les infections (cf. annexe).

### a Aérosols

Lors de la première crise décrite (Urmenyi et Franklin, 1961), ce mode de transmission a été suspecté.

En effet, bien que les patients soient morts à deux jours l'un de l'autre, ils n'ont pas eu de contact, et n'étaient pas dans le même endroit de l'hôpital. De plus, le fait qu'un seul des deux jumeaux (cas 2) soit atteint est remarquable, puisque les deux ont subi le même traitement et côtoyé les mêmes infirmières. Les jumeaux ont été placés dans des incubateurs séparés, ce qui est la seule différence existante entre les deux.

Il se pourrait que les deux patients de l'étude aient été dans le même incubateur. Cette hypothèse étant la seule concernant la possibilité de contact entre les deux cas, des analyses bactériologiques de l'incubateur ont été réalisées, plusieurs jours après la mort du deuxième patient. Les écouvillons fait dans l'incubateur et dans les divers endroits de la maternité n'ont permis d'isoler qu'une flore de contamination banale.

Les auteurs supposent que la contamination est survenue par aérosols dans l'incubateur. Ils n'ont pas réussi à confirmer cette hypothèse, malgré de nombreux prélèvements réalisés dans les incubateurs de l'hôpital et l'eau. Ils conseillent cependant de maintenir l'humidité au sein de ces appareils aussi basse que possible afin d'éviter toute contamination (Urmenyi et Franklin, 1961).

Pour un de leur cas, Reina *et al.* (1989) suspectent aussi l'incubateur. Cependant, ils ne l'ont pas démontré. Le patient été âgé de dix jours et souffrait d'une conjonctivite.

### b Passage dans la filière pelvienne

Ce mode de transmission est peu probable. En 1965, Joker *et al.*, pensaient qu'un travail de longue durée favoriserait l'apparition ultérieure de méningite.

De même, Muytjens *et al.* (1983), considéraient que la courte période d'incubation des infections à *E. sakazakii* qu'ils avaient décrites (3 à 5 jours), était en accord avec l'hypothèse d'une transmission lors de l'accouchement. Cependant des patients issus de césarienne n'ont pas eu de passage dans la filière pelvienne. Une infection ascendante est également improbable chez ces individus (d'autant plus pour celui qui est issu d'une césarienne avant même la rupture des membranes).

Les cultures en provenance de la mère des jumeaux (échantillons vaginaux, cervicaux et fécaux), ainsi que celles des patients (échantillons de peau, nez, oreille externe, ombilic, anus, contenu digestif) se sont révélées négatives pour la recherche d'*E. sakazakii* (Muytjens *et al.*, 1983).

Enfin, Ongradi (2002), bien qu'ayant décrit une infection vaginale à *E. sakazakii*, ne penche pas en faveur d'un mode de transmission lors du passage dans la filière pelvienne.

---

## c Infections croisées

Lors de leur étude d'*E. sakazakii*, Farmer *et al.* (1980) avaient un isolat provenant du stéthoscope d'un médecin. Le risque d'infections croisées était donc suspecté. Cependant, la bactérie a rarement été isolée dans les laboratoires de microbiologie participant, et les isolats étaient en règle générale espacés dans le temps et l'espace. Ils rapportent tout de même, le cas d'un hôpital qui avait 29 patients avec une colonisation du tractus respiratoire par *E. sakazakii* (et d'autres colonisations), pendant une période de sept mois. Aucun autre groupe d'infection n'a été rapporté par leurs hôpitaux référents.

Ce mode de transmission, bien que possible, ne sembla pas le plus fréquent.

## d Contact

Dans le cas d'infection vaginale décrite par Ongradi (2002), l'auteur pense que la source de l'infection est l'eau de surface du lac.

## e Blessure

Murray *et al.* (1990) rapportent le cas d'une ostéomyélite du pied causée par *E. sakazakii* et *Serratia liquefaciens* suite à une blessure avec une brindille de bois au travers de la chaussure.

## f Alimentaire

### α Poudre de lait pour nourrissons

#### ☞ Première suspicion

En 1983, Muytjens *et al.*, ont suggéré que la source était la préparation en poudre pour nourrissons, mais sont restés incapables de le démontrer.

Ainsi, *E. sakazakii* a été isolé de la brosse servant à faire la vaisselle, la cuillère servant à mélanger le lait reconstitué, et du lait reconstitué. Cependant, la préparation en poudre pour nourrissons et l'eau utilisée pour préparer le lait, n'ont pas permis la culture de la bactérie.

Aucune différence morphologique, biochimique ou de sensibilité aux antibiotiques n'a été mise en évidence entre ces isolats environnementaux et ceux des patients (sauf une différence de biogroupe chez un des huit patients). Les profils plasmidiques indiquaient que trois ou quatre des cinq patients d'un hôpital étaient infectés par la même souche. Les profils plasmidiques du dernier patient et des isolats environnementaux étaient différents, ce qui suggérait alors que les souches environnementales n'ont pas provoqué l'infection (Muytjens *et al.*, 1983).

A ce stade le mode de transmission est toujours inconnu. Cependant, comme aucun cas n'a ensuite été observé, après le remplacement de la poudre de lait par une formule liquide, les auteurs sont presque sûrs que leur hypothèse est la bonne (Muytjens *et al.*, 1990).

Il se pourrait que les profils des souches isolées chez les patients mettent en évidence une relation épidémiologique. Les auteurs penchent pour un réservoir commun de la souche évoluant pendant cette période ou une prévalence locale, justifiée par le fait que cinq patients ont côtoyé le même hôpital et que les infections ont été contractées dans un délai court (Muytjens *et al.*, 1983).

☞ Mise en évidence de la source et du mode de transmission

☞ Relation épidémiologique

λ *Crise de Biering et al. (1989)*

Dans la crise rapportée par Biering *et al.* (1989), *E. sakazakii* a été isolé d'une bouteille de lait reconstitué qui était stockée dans le réfrigérateur depuis un temps indéterminé, mais dans aucun spécimen reconstitué récemment et immédiatement mis en culture.

Après incubation à 36°C pendant 4 heures, vingt-trois souches d'*E. sakazakii* ont été isolées des échantillons faits à partir de cinq paquets de poudre de lait. Deux autres paquets n'ont pas permis la culture d'*E. sakazakii*. La bactérie a aussi isolée d'écouvillons anaux d'un enfant en bonne santé.

Biering *et al.* (1989) suspectent le lait reconstitué. En effet, tous les enfants malades ont été nourris à partir de poudre de lait. Cependant, d'autres enfants, non malades, et notamment le jumeau d'un des patients, également et n'on pas souffert de méningite... De plus, l'isolement d'*E. sakazakii* dans les écouvillons anaux d'un enfant mettent en évidence une colonisation sans invasion.

λ *Crise de Simmons et al. (1989)*

Les quatre patients (cas 1 à 4) ont été alimentés avec la même formule de poudre de lait: un hydrolysate de protéine en poudre mélangé dans un mixeur avant utilisation. Les écouvillons du mixeur ont permis l'isolement d'*E. sakazakii*, *Pseudomonas fluorescens* et *P. maltophilia*.

Après la crise, le mixeur a été retiré du procédé de reconstitution du lait, jusqu'à ce qu'une méthode de stérilisation de la machine entre les utilisations soit mise en place. *E. sakazakii* n'a plus été responsable de pathologie dans l'unité.

La relation de causalité est significative entre l'exposition à la poudre de lait et la présence d'*E. sakazakii* ( $p=0,00059$ ). De plus, *E. sakazakii* a été isolé d'une boîte de formule entamée.

☞ Typage des isolats

En 1990, Clark *et al.*, ont mis en évidence, dans deux crises indépendantes (celles décrites par Biering *et al.*, 1989, et Simmons *et al.*, 1989), que les souches d'*Enterobacter sakazakii* isolées chez les patients et dans la poudre de lait étaient les mêmes.

Ils ont étudié 27 isolats provenant de la crise de Biering *et al.* (1989 ; 3 de patients, 24 de poudre de lait), et 5 isolats provenant de la crise décrite par Simmons *et al.* (1989 ; 3 de patients, 1 de poudre de lait et 1 du mixeur). Ils ont utilisé des méthodes de typage poussées.

Dans les deux crises, les résultats des typages par électrophorèse en champs pulsé suggèrent que la préparation de poudre de lait pour nourrissons est la source des infections néonatales, car les isolats provenant des patients et de la poudre partagent les mêmes profils. Toutes ces expériences ont été réalisées trois fois.

L'analyse plasmidique a montré que les profils étaient les mêmes dans chaque crise, mais différaient de ceux décrites par Muytjens *et al.* (1988).

Huit des neuf isolats de Biering *et al.* (1989) testés présentent le même profil plasmidique, type électrophorétique, segments de restriction chromosomiques et ribotypes. Le neuvième diffère également dans son biotype, son profil plasmidique, ses bandes de restriction chromosomiques.

Les isolats de Simmons *et al.* (1989) ont le même profil plasmidique, type électrophorétique, segments de restriction chromosomiques et ribotypage ; qui sont différents des isolats précédents (Clark *et al.*, 1990).

☞ Importance des protocoles de préparation

La bactérie est présente dans la poudre de lait en faible nombre, puisque seules les formules reconstituées qui ont été incubées permettent sa mise en évidence. Deux des patients étaient bien portants à la naissance, et il semble peu probable qu'ils aient été réceptifs à un si petit nombre de bactéries. Biering *et al.* (1989) suspectent que les protocoles de reconstitution de lait à partir de la poudre ne soient pas toujours respectés. Il a d'ailleurs été trouvé que les bouteilles de lait reconstitué sont parfois maintenues pendant des laps de temps assez conséquents à 35-37°C. Ainsi, une bouteille non datée a été retrouvée dans le réfrigérateur de l'unité de soins intensifs. Les auteurs ne savent pas depuis quand elle y était présente...

#### ↳ Importance relative d'*E. sakazakii*

Biering et al (1989) soulignent enfin le fait que seul *Enterobacter sakazakii* a été recherché dans le lait, mais que d'autres *Enterobacteriaceae* ont été retrouvés (*E. cloacae* et *E. agglomerans* entre autres). Il convient donc de s'interroger sur quelques éléments. *E. sakazakii* est-il fondamentalement différent des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont aussi retrouvés dans les poudres de lait, ou bien son mode de transmission a t'il seulement été mis en évidence parce que c'est un pathogène inhabituel ? Dans ce cas, est-il possible que d'autres espèces des *Enterobacteriaceae* causant des infections néonatales, soient aussi transmises par la poudre de lait ?

#### ⊕ Autres crises dont la contamination de la poudre de lait est responsable de l'infection

##### ↳ Contamination intrinsèque

##### ⌘ Poudre de lait Alfaré®

Dans la crise décrite par Van Acker *et al.* (2001), douze cas d'entérococolite nécrosante (ECN) sont rapportés.

##### ↳ Relation épidémiologique

Après analyse des procédures d'alimentation, une relation significative a été mise en évidence entre le développement d'ECN, la consommation de lait reconstitué à base de poudre, et l'isolement d'*E. sakazakii*. En effet, six patients sur douze souffrant d'ECN avaient des cultures positives pour *E. sakazakii*, contre zéro sur trent-huit patients ne souffrant pas d'ECN ( $p < 0,0001$ ). Six des quatorze nouveau-nés nourris avec Alfaré® avaient des cultures positives pour *E. sakazakii*, comparé à aucun sur les trente-six ne recevant pas cette recette ( $p < 0,0002$ ).

La bactérie a été isolée de plusieurs boîtes non encore ouvertes du même lot de la poudre de lait en cause (quatorze souches isolées au total du lait Alfaré®). Le typage moléculaire par PCR a confirmé la similitude entre les souches des isolats de la poudre de lait et celles de trois patients.

A l'arrêt de l'utilisation de cette poudre de lait, les cas d'ECN se sont arrêtés. Un patient (cas 8) a été alimenté avec cette poudre après que l'utilisation a été stoppée et a été colonisé par *E. sakazakii*.

Tous ces éléments permettent aux auteurs de conclure qu'il y a une forte relation (voire relation de causalité) entre la contamination intrinsèque des poudres de lait et le développement d'ECN.

##### ↳ Typage moléculaire

Le typage moléculaire des souches d'*E. sakazakii* isolée est très discriminante. Les quatorze souches isolées de la poudre de lait (boîtes non ouvertes et échantillon de lait reconstitué) sont de type Ia. Les neuf souches isolées des patients étaient de type Ia (pour 3 d'entre elles), II (3) et III (3). Les

dix souches de contrôle (isolée de patients de l'hôpital de 1989 à 1996), présente huit profils différents (dont une de type Ib).

Une autre source de contamination que le lait semblant peu probable pour un pathogène aussi rare qu'*E. sakazakii*, les auteurs pensent que la poudre en cause est aussi l'origine des trois types moléculaires différents isolés chez les patients. Le type isolé dans le lait serait alors seulement le type dominant.

La présence du type Ib chez une patiente hors de la cohorte de cas étudiée laisse présager d'une contamination de long terme avant l'éclatement de la crise (la patiente était alimentée avec de l'Alfaré®).

#### ⌘ Poudre de lait Portagen®

Les cas décrits par Himelright *et al.* (2002) ont permis l'isolement d'*E. sakazakii* d'un lot de poudre de lait Portagen®, aussi bien des boîtes entamées que de celles qui étaient fermées (deux lots étaient en cours d'utilisation dans l'hôpital au cours de la crise). Les cultures environnementales et de l'eau se révèlent négatives. L'électrophorèse en gel pulsé permet de mettre en évidence que l'isolat du LCR du patient ayant eu la méningite et les isolats du lot de poudre de lait sont indifférenciables.

C'est le premier cas d'infection à *E. sakazakii* associé à une poudre de lait décrit aux Etats-Unis, qui provoque un retrait d'un produit commercial. Le lot incriminé a, en effet, été rappelé volontairement par le fabricant (Mead Johnson Nutritionals) le 29 mars 2002. Il a également fait une note à l'attention du personnel soignant sur les risques des poudres de lait.

Portagen® est un type de produit recommandé par le fabricant pour les enfants ayant des problèmes de malabsorption, et à utiliser sous la surveillance de personnel médical.

Une étude de cohorte a été réalisée sur 49 patients pour déterminer les facteurs de risques d'une colonisation ou infection due à *E. sakazakii*. Le seul facteur associé significativement avec les infections ou colonisations par *E. sakazakii* est une poudre de lait spécifique (Portagen®). Tous les patients atteints ont été alimentés avec cette formule, contre seulement 21 sur 40 des témoins ( $p < 0,01$ ).

#### ⌘ Préparation en poudre pour nourrissons Pregestimil®

Il semble qu'une crise survenue en France, en décembre 2004 soit due à la préparation en poudre pour nourrissons Pregestimil® (InVS, 2004a).

#### ↶ Contamination extrinsèque

##### ⌘ Par le mixeur

Noriega *et al.* (1990) ont mis en évidence un cas de contamination extrinsèque de la poudre de lait. Ils ont analysé la préparation de poudre de lait qui avait été utilisée chez la patiente. Quand celle-ci était reconstituée dans un bouillon de culture, celle-ci revenait négative. Cependant, les écouvillons provenant du mixeur servant à la préparer, et la formule reconstituée au sein de l'unité de pédiatrie donnaient des cultures positives pour les deux micro-organismes. Les profils biochimiques étaient semblables, ce qui laisse penser que ce sont bien les mêmes isolats.

Huit autres patients de l'unité recevaient cette même poudre, et aucune culture n'est revenue positive, chez aucun d'entre eux.

Bien que les bactéries n'aient pas été isolées de la préparation de poudre de lait pour nourrissons, la contamination extrinsèque par le mixeur, laisse présager que celui-ci a été contaminé en premier lieu par une préparation pour nourrissons.

## $\lambda$ Par une fissure dans le mixeur

De la même façon, dans la crise de l'hôpital de Jérusalem décrite par Block *et al.* (2002) et par Bar-Oz *et al.* (2001), *E. sakazakii* a été isolé d'un échantillon de lait reconstitué, mais pas de la poudre directement, même après incubation. Le microorganisme a aussi été trouvé d'écouvillons provenant du mixeur servant à reconstituer le lait. Celui-ci présentait une fissure. Il a été enlevé de la nurserie après cette crise, mais les cultures étaient toujours positives après cinq mois.

Les auteurs pensent que cette fissure a été la niche qui avait été contaminée par un lot de poudre contenant *E. sakazakii*. Cette hypothèse expliquerait l'absence d'isolement de la bactérie des boîtes de poudres présentes dans l'unité de soins intensifs au moment de la crise (Block *et al.*, 2002).

## ☞ Préparation de poudre de lait pour nourrissons et entérocolite nécrosantes

Une étude de Lucas et Cole (1990), portant sur la relation entre les entérocolites nécrosantes chez les nourrissons, et le type d'alimentation, a montré que 5,5% des prématurés développaient cette maladie (51 sur 926). Le taux de mortalité est de 26%. Ils ont mis en évidence une relation significative entre l'alimentation avec des préparations de poudre de lait pour nourrisson et cette maladie.

En effet, l'entérocolite nécrosante est 6 à 10 fois plus fréquente chez les nourrissons ayant été alimenté exclusivement avec une formule en poudre pour nourrissons, que chez ceux ayant été allaité. De même, la maladie est 3 fois plus fréquente chez les nouveaux-nés nourris avec du lait en poudre, que chez ceux ayant eu un régime mixte lait maternel et poudre de lait. Cela suggère que le lait maternel peut avoir un rôle protecteur, même s'il n'est utilisé que comme complément alimentaire.

Chez les nourrissons nés après plus de 30 semaines de gestation, la maladie est très rare, mais 20 fois plus fréquente chez ceux ayant été nourris avec une préparation pour nourrissons, que chez ceux allaités.

Les autres facteurs de risques incluent la prématurité, les maladies respiratoires, le cathétérisme de l'artère ombilicale et la polycythémie.

Enfin, chez les nourrissons nourris exclusivement avec une préparation de poudre de lait, l'alimentation entérale retardée permet de diminuer la fréquence d'entérocolite nécrosante.

Cette étude semble être un facteur supplémentaire en faveur du mode de transmission alimentaire d'*E. sakazakii* via les préparations en poudre pour nourrissons.

Van Acker *et al.* (2001) pensent également qu'il ne faut pas sous-estimer le rôle du lait reconstitué dans le développement d'ECN. Le lait reconstitué peut à la fois servir de substrat idéal pour la croissance bactérienne, mais aussi de source potentielle de pathogènes (la plupart des poudres sont contaminées intrinsèquement). Ils estiment que des cas d'ECN dus à la poudre de lait, pourraient être manqués si le pathogène est un pathogène moins rare qu'*E. sakazakii*. Les auteurs pensent que le lait maternel est moins souvent contaminé que le lait reconstitué (en plus de la présence protectrice d'IgA).

## $\beta$ Contamination croisée d'aliments

Des contaminations croisées pourraient intervenir du fait de la contamination d'herbes et d'épices, d'aliments secs de type graine et d'aliments déshydratés pour nourrissons (Iversen et Forsythe, 2004a).

Il est possible que des infections surviennent dans des environnements domestiques. En effet, Kleiman *et al.* (1981) rapportent un cas de méningite chez un nourrisson de cinq semaines. Comme la fillette était sortie de l'hôpital normalement après sa naissance, il est fort probable que la contamination ait eu lieu chez elle.

- ☠ *E. sakazakii* est une bactérie très répandue, qui se retrouve :
  - Dans l'environnement (eau, usine...) ;
  - Dans les aliments, notamment les préparations en poudre de lait qui sont contaminées, bien qu'à des taux faibles (quelques CFU par 100 grammes de poudre, et 2 à 15% des poudres contaminées), des légumes, chair à saucisse, épices...
  - Dans des isolats cliniques (LCR, sang...).
  
- ☠ Le mode de contamination principal semble être *via* les préparations en poudre de lait. Celles-ci sont initialement contaminées, mais pour que la bactérie se multiplie, il faut des erreurs de conservation (rupture de la chaîne du froid...).
  
- ☠ D'autres modes de contaminations ne peuvent être écartés (contamination croisée d'aliments, contact, infections croisées...).

---

## D / PÉRIODE D'INCUBATION ET DOSE INFECTIEUSE

### 1. Période d'incubation

Dans leur étude, Pagotto *et al.* (2003) ont démontré qu'il fallait au maximum trois jours après l'inoculation en intra-péritonéal pour que les souriceaux meurent. Le temps d'incubation typique est de 24 à 48 heures.

Aucune période d'incubation n'est disponible chez les nouveaux-nés. L'âge d'apparition des symptômes varie de 2 à 57 jours. L'âge moyen d'apparition des symptômes est de 16 jours.

Dans leur description de crise, Van Acker *et al.* (2001), donnent la date de début de nourrissage avec la préparation de poudre de lait pour nourrissons contaminée, et la date de début des symptômes. Il s'écoule entre 2 et 24 jours entre ces deux dates, avec une moyenne de 8,7 jours.

Il est cependant difficile d'arriver à une conclusion avec de telles données, en considérant que la dose infectieuse doit être administrée en une seule fois, et que le lait reconstitué, sans erreur de préparation, ne présente aucun danger, même s'il est contaminé. Il faut que la bactérie ait le temps de se multiplier. Ce n'est donc pas tant la durée entre le début de l'alimentation avec le lait reconstitué et l'apparition des symptômes qui compte, que la durée entre l'erreur de préparation et l'apparition des symptômes.

### 2. Dose infectieuse et dose réponse

#### a Chez la souris

Dans une étude de Pagotto *et al.* (2003) portant sur les facteurs de virulence d'*E. sakazakii*, les auteurs ont mis en évidence une dose mortelle chez les souriceaux. Les 18 souches testées étaient létales en intra-péritonéal à une dose de  $10^8$  CFU par souriceau.

Deux souches (une productrice d'entérotoxine, et l'autre pas) avaient la plus basse dose létale en intra-péritonéal, et n'étaient pas létales par voie orale, même à hautes doses. Les auteurs pensent que ceci est dû à un facteur de virulence manquant.

Seules deux souches sur 18 ont causé la mort des souriceaux par voie orale. Les isolats étaient cliniques et alimentaires. Ils ont causé la mort d'un des quatre souriceaux, à une dose de  $10^7$  CFU, après 48 et 72 heures (Pagotto *et al.*, 2003).

Cette étude est la seule qui met en évidence une dose infectieuse.

#### b Chez les nourrissons

Il n'y a aucune preuve épidémiologique donnant une dose infectieuse chez l'homme.

#### $\alpha$ Dose infectieuse de 1000 bactéries

##### ☞ Choix de la dose infectieuse

Iversen et Forsythe (2003) ont émis l'hypothèse que la dose infectieuse pourrait être de 1 000 cellules d'*E. sakazakii*. Ils l'ont justifié par le fait que c'est une dose similaire à celle d'autres bactéries pathogènes, telles *Neisseria meningitidis* et *L. monocytogenes* 4b.

La dose infectieuse peut varier suivant l'histoire de la bactérie (facteurs de réponse au stress), l'état de santé du patient (bon ou immunodéprimé) et la matrice alimentaire. Dans le cas des

préparations en poudre pour nourrissons et des nouveaux-nés, la bactérie aura subi un stress lors de la déshydratation et de l'entreposage, l'hôte est immunodéprimé, et le lait liquide passe rapidement dans l'estomac pour aller dans les intestins (diminution de l'exposition aux facteurs acides).

#### ☞ Temps d'attente nécessaire pour atteindre la dose infectieuse

Ils prennent comme dose de départ une contamination de 0,36 bactéries par 100g de préparation en poudre pour nourrissons (d'après les études de Muytjens *et al.*, 1988, et celle de Nazarowec-White et Farber, 1997b), ce qui correspond à une bactérie pour 333 g de poudre (Iversen et Forsythe, 2004b). Ils considèrent que pour nourrir un nourrisson, il faut 18 grammes de poudre, et que le lait reconstitué (115 mL) contiendrait 0,0648 cellules d'*E. sakazakii*. Le taux de croissance de la bactérie est utilisé pour calculer le temps qu'il lui faut pour se multiplier jusqu'à la dose infectieuse de 1 000 bactéries (14 générations), à différentes températures d'incubation.

La préparation reconstituée devrait être gardée presque neuf jours à 8°C, ou 17,9 heures à température ambiante pour atteindre la dose infectieuse (Iversen et Forsythe, 2003).

#### *β Limites du modèle*

Ce modèle est simpliste, et suppose que l'eau chaude ne tue pas les bactéries, et qu'il n'y a pas de multiplication bactérienne dans l'estomac. De plus le calcul considère que les nourrissons sont nourris 4 à 6 fois en 24 heures, que la dose infectieuse doit être administrée au cours d'un seul repas, et qu'elle n'est pas cumulative (Iversen et Forsythe, 2003).

Iversen et Forsythe (2004b) remarquent également que le temps de latence utilisé n'est pas celui qui a été trouvé par Nazarowec-White et Farber (1997b), qui était de 19 à 47 heures à 10°C. Ils se sont basés sur des données de leur laboratoire, qui sont nettement plus courtes.

Havelaar et Zwietering (2004) remettent en cause quelques peu la relation dose infectieuse et dose réponse. Ils considèrent qu'en se basant sur le taux de contamination des préparations en poudre pour nourrissons, 6,5% des bouteilles seraient contaminées. A ce taux de contamination, une seule bactérie est présente dans les bouteilles les plus contaminées (les auteurs négligent la probabilité de 0,2% que deux bactéries soient présentes). Ainsi, il faut 13 heures à 21°C pour atteindre les 1000 bactéries.

Havelaar et Zwietering (2004) estiment également qu'Iversen et Forsythe (2003) considèrent qu'en dessous de la dose infectieuse présumée, il n'y a pas de risque. Havelaar et Zwietering (2004) utilisent un modèle de dose réponse microbienne se basant sur la supposition qu'une seule bactérie a la probabilité, même si la dose est faible, de provoquer une infection. Iversen et Forsythe (2004b) pensent ne pas avoir sous-entendu qu'en dessous de la dose infectieuse le risque est nul.

En utilisant leur modèle, qui considère que le risque existe dès que la contamination est présente, Havelaar et Zwietering (2004) trouvent des durées de conservation aux mêmes températures qu'Iversen et Forsythe (2003) très inférieures (cf. tableau 20 ci-dessous). Ces derniers pensent que même si les durées d'incubation sont plus courtes, la conclusion reste toujours la même. Il ne faut pas laisser les préparations en poudre pour nourrissons reconstituées à une température permettant la multiplication bactérienne trop longtemps (dans les deux études, les durées d'incubations sont compatibles avec une mauvaise pratique concernant les formules reconstituées), et les pratiques d'hygiène élémentaires doivent être respectées (Iversen et Forsythe, 2003, Iversen et Forsythe 2004b).

**Tableau 20: Comparaison des durées nécessaires pour atteindre la dose infectieuse de Iversen et Forsythe (2003) et Havelaar et Zwietering (2004)**

	Températures			
	37°C	21°C	18°C	10C
Iversen et Forsythe (2003)	7 heures	17,9 heures	1,7 jours	7,9 jours
Havelaar et Zwietering (2004)	2 heures	6 heures	13 heures	64 heures

Havelaar et Zwietering (2004) trouvent que le risque d'infection en buvant une bouteille de lait reconstituée contaminée après 8 heures à 18°C est de  $3 \times 10^{-4}$ , tandis que pour cinq bouteilles il est de  $1,5 \times 10^{-3}$ .

La probabilité d'infection avec une bouteille au hasard est de  $5 \times 10^{-5}$ . Ce risque est relativement haut, et suggère que la dose infectieuse d'*E. sakazakii* est en fait plus basse que ce qu'il est communément admis (Havelaar et Zwietering, 2004). Iversen et Forsythe (2004b) se défendent de cet argument en considérant que la probabilité d'ingestion n'est pas la probabilité d'infection.

- ⊠ Chez les souriceaux, la période d'incubation lors d'infection intra-péritonéale est de 24 à 48 heures. Aucune donnée fiable n'est disponible chez l'homme.
- ⊠ Chez les souriceaux, la dose infectieuse en intra-péritonéal est de  $10^8$  CFU par souriceau. Par voie orale, 2 des 18 souches d'*E. sakazakii* testées étaient mortelles à une dose de  $10^7$  CFU.
- ⊠ Chez le nourrisson, en considérant que la dose infectieuse est de 1000 bactéries, il faut 9 jours à 8°C ou 17,9 heures à température ambiante pour l'atteindre. Les durées varient suivant les études. Quoiqu'il en soit, il ne faut pas conserver les préparations de poudre de lait pour nourrissons reconstituées longtemps.

## **E / DISSEMINATION**

### **1. Contamination des préparations pour nourrissons en poudre**

#### **a Contamination à l'usine**

La contamination des poudres de laits pour nourrissons se fait probablement de façon fréquente à l'usine de production. En effet, dans l'étude de Kandhai *et al.* (2004a), des échantillons provenant de quatre usines de fabrication de poudre, de cinq autres usines et de seize foyers domestiques ont été analysés (enrichissement sélectif, culture sur gélose VRBL, puis sur gélose TS, test oxydase-négative, mise en évidence de l' $\alpha$ -glucosidase puis identification biochimique par galerie API 20E et enfin ribotypage).

Les échantillons sont obtenus en grattant ou essuyant des surfaces de la ligne de production, en récupérant des contenus de sacs d'aspirateurs, aussi bien dans les usines que dans les foyers domestiques.

*E. sakazakii* a été isolé de presque tous les environnements étudiés (excepté l'usine de fabrication d'épices). Les différences de fréquence d'isolement de la bactérie ne sont pas significatives. Elle est présente dans des usines productrices de poudre de lait, de céréales, de chocolat, de farine de patate, de pâtes, ainsi que dans les foyers domestiques. *Enterobacter sakazakii* est donc une bactérie présente dans de nombreux environnements différents.

#### **b Site de contamination dans l'usine**

La bonne résistance d'*E. sakazakii* à la dessiccation et au stress osmotique, ainsi que sa capacité à se multiplier à 45°C, montre que dans les environnements secs et chauds, tels qu'autour des équipements de séchage des usines de poudre de lait, elle a un avantage de croissance compétitif comparé aux autres membres des *Enterobacteriaceae* (Breeuwer *et al.*, 2003).

D'après la résistance thermique d'*E. sakazakii* (vue dans la partie de microbiologie), la bactérie ne survivrait pas à la pasteurisation, dès lors, les contaminations des poudres de laits pour nourrissons se font donc lors de manquements à l'hygiène après la pasteurisation (Iversen *et al.*, 2004b).

### **2. Manipulation et conservation des poudres de lait (Decisionalysis Risk Consultant Inc., 2004)**

Une étude de risque a été réalisée pour déterminer les relations entre les manipulations après réhydratation des préparations pour nourrissons, et les températures et temps de conservation.

#### **a Suppositions préliminaires**

Il est supposé que la population bactérienne initiale, avant croissance est faible. Les auteurs considèrent qu'elle est d'1 CFU par repas.

Le risque d'infection est proportionnel à la dose, c'est-à-dire que si la dose double, le risque est également doublé.

Les paramètres de croissance sont ceux explicités dans la littérature (dans la première partie de la thèse en l'occurrence).

## b Conservation au froid

En utilisant un modèle d'évaluation du risque, le risque relatif est estimé à différentes températures de conservation (4 à 10°C) et pour différentes durées (1, 2, 4, 8, 12, 24 et 48 heures). Les conditions de préparation sont identiques pour tous les résultats :

- ☛ La préparation se fait à température ambiante (20°C) et dure un quart d'heure, avec un liquide de réhydratation à 40°C.
- ☛ Le réchauffement se fait à 27°C pendant 30 minutes.
- ☛ Le nourrissage est réalisé dans une pièce de où la température est de 27°C et dure 4 heures.

### *α Risque relatif*

Le tableau 21 ci-dessous montre les variations de risque relatif. La valeur de base (soit le risque relatif de 1) correspond au risque lors de la conservation pendant une heure à 4°C. Les cellules grisées sont celles pour lesquelles le risque relatif est supérieur ou égal à deux.

**Tableau 21: Risque relatif d'infection par *E. sakazakii* suivant la durée et la température de réfrigération**

Temps (heures)	Température de réfrigération						
	4°C	5°C	6°C	7°C	8°C	9°C	10°C
1	1	1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3
2	1,2	1,3	1,4	1,6	1,8	1,9	2,1
4	1,3	1,5	1,8	2,1	2,5	3,1	3,7
8	1,3	1,6	2	2,6	3,5	4,8	7
12	1,2	1,6	2,1	3	4,6	7,2	12,2
24	1,1	1,6	2,6	4,8	10,2	24	64,2
48	0,8	1,6	3,8	12,3	50,4	264,8	1,8 x 10 <sup>3</sup>

La réfrigération a lieu tout de suite après la reconstitution de la préparation pour nourrissons, et sa durée est variable. La préparation est ensuite réchauffée rapidement dans un bain marie à 27°C.

### *β Conclusion*

#### ☛ Influence des durée et température de conservation

L'étude donne une estimation de la quantité d'*E. sakazakii* au moment du nourrissage, en se basant sur le profil température-durée de la préparation et l'ampleur de l'inactivation ou de la croissance de la bactérie. L'ampleur de la croissance est très dépendante de la température de réfrigération. L'exemple le plus notable est lorsque celle-ci est de 10°C. Le risque est alors de plus de 1000 fois supérieur que le risque lors de conservation à 4°C pendant 48 heures.

La quantité finale d'*E. sakazakii* dans la préparation est la plus importante pour les températures de conservation les plus élevées, avec une quantité augmentant avec la durée de conservation.

### ☞ Conséquences pratiques

Pour de températures de réfrigération de 4 à moins de 6°C, un entreposage de moins de 48 heures a peu d'influence sur le risque (il augmente moins de 4 fois).

Si le temps de conservation est de moins de 4 heures, des températures de réfrigération jusque 10°C ont peu d'impact sur le risque (augmentation inférieure à 4 fois).

#### c Influence de la température du liquide de réhydratation lors de conservation réfrigérée

Le risque relatif est estimé pour différentes températures du liquide de réhydratation (10, 20, 30, 40, 50, 60 et 65°C), pendant des durées variables de conservation (1, 2, 4, 8, 12, 24 et 48 heures) à 6°C.

Le risque de base de 1 est considéré pour une température du liquide 10°C, et une durée de conservation de une heure à 6°C. Les cellules grisées du tableau 22 sont celles pour lesquelles le risque relatif est au moins deux fois supérieur au risque de base.

Le tableau montre que les scénarios de risque maximum sont pour des températures du liquide de réhydratation entre 40°C et 50°C.

**Tableau 22: Risque relatif d'une infection par *E. Sakazakii* résultant d'une conservation à 6°C pour différentes durées, avec une température du liquide de réhydratation variable**

Temps (heures)	Température du liquide de réhydratation						
	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	65°C
1	1	1,8	4,4	10,5	7,4	0,1	<0,01
2	1,1	2	5	13,9	15,7	1	<0,01
4	1,1	2,2	5,9	17,3	20,9	1,5	<0,01
8	1,2	2,3	6,3	19	23,2	1,6	<0,01
12	1,3	2,5	6,7	20,3	24,8	1,8	<0,01
24	1,5	3	8,2	24,8	30,3	2,2	<0,01
48	2,2	4,3	12,2	37	45,3	3,2	<0,01

La température de réhydratation influence le risque de deux manières :

- ⌘ Premièrement, il y a un effet d'inactivation lors de l'addition du liquide. Celui-ci commence à partir de 49°C, mais devient appréciable à partir de 55°C.
- ⌘ Deuxièmement, la température du liquide de réhydratation influence de profil température-durée de la préparation. Plus basse est la température du liquide, et plus vite la préparation atteint-elle, lors du refroidissement, la température de réfrigération telle que la croissance bactérienne sera minimisée, et réciproquement.

Ainsi, le tableau 23 montre le temps que le préparation passe à différentes températures suivant la température initiale du liquide de réhydratation.

**Tableau 23: Durées pendant lesquelles les préparations reconstituées seront à des températures données**

Temps (heures)	Température du liquide de réhydratation						
	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	65°C
Temp<25°C	8,56	8,56	8,1	7,66	7,32	7,06	6,94
Temp 25-49°C	4,18	4,18	4,64	5,08	5,38	5,3	5,3
Temp>49°C	0	0	0	0	0,04	0,38	0,5
Temps total	12,74	12,74	12,74	12,74	12,74	12,74	12,74

**d Conservation à température ambiante**

Le risque relatif est évalué pour différentes durées de conservation (1 à 10 heures) à des températures ambiantes possibles (15, 20, 25, 30 et 35°C). Les conditions de préparation sont tous identiques :

- \* Le préparation se fait à température ambiante et dure un quart d'heure.
- \* Il n'y a pas de refroidissement ou de chauffage de la préparation.
- \* Le liquide de réhydratation est à 40°C.

Le risque relatif est déterminé pour chaque température, avec le risque basal de 1 pour chaque température, lors d'une durée de conservation d'une heure (tableau 24).

**Tableau 24: Risque relatif lors de conservation à température ambiante pour 1 à 10 heures**

Temps (heures)	Température ambiante				
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
1	1	1	1	1	1
2	2,5	3,6	5,4	7,7	9,1
3	4,8	10,5	24,2	52	78,1
4	8,2	26,8	98,3	337,2	681,9
6	20,3	147,8	1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup>	5,1 x 10 <sup>4</sup>
8	47,3	762,8	2 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>5</sup>	3,9 x 10 <sup>6</sup>
10	108,5	3,9 x 10 <sup>3</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup>	1,9 x 10 <sup>7</sup>	2,9 x 10 <sup>8</sup>

Le tableau 24 met en évidence que lorsque la durée de conservation augmente, le risque aussi, avec un effet beaucoup plus marqué à des températures plus élevées.

Lors de sa conservation à température ambiante, la préparation pour nourrissons refroidit de 40°C à la température d'équilibre. Ainsi, plus la température de la pièce est élevée, et plus la température finale de la préparation est élevée, et cela augmente d'autant les possibilités de croissance d'*E. sakazakii*. De plus, plus la conservation est longue, et plus la bactérie a l'opportunité de se multiplier.

Lorsque du lait est contaminé par *E. sakazakii*, une fermentation très rapide a lieu, et est accompagnée par une forte diminution du pH, et par une production de gaz (CO<sub>2</sub>) importante (Skladal *et al.*, 1993).

☠ *E. sakazakii* est présente dans les usines de fabrication des préparations de poudre de lait pour nourrissons. La contamination des préparations se fait certainement à ce niveau, après l'étape de pasteurisation.

☠ La manipulation et conservation des préparations de poudre de lait reconstituées ont une influence forte sur la dissémination de la bactérie :

☛ La quantité finale d'*E. sakazakii* dans la préparation est la plus importante pour les températures de conservation les plus élevées, avec une quantité augmentant avec la durée de conservation. Ainsi, pour de températures de réfrigération de 4 à moins de 6°C, avec un entreposage de moins de 48 heures et pour un temps de conservation est de moins de 4 heures avec des températures de réfrigération jusque 10°C, l'impact sur le risque est faible.

☛ Pour des températures du liquide de réhydratation entre 40 et 50°C, le risque est maximum.

☛ Lorsque la durée de conservation augmente, le risque aussi, avec un effet beaucoup plus marqué à des températures plus élevées.

---

## F / EMERGENCE ET EVALUATION DU RISQUE

### 1. E. sakazakii : un pathogène émergent

Il est intéressant de noter, que récemment, un article de synthèse sur l'émergence d'*Enterobacter sakazakii* a été publié (Drudy *et al.*, 2006a). Il semble que la communauté scientifique s'accorde à dire que cette bactérie est réellement un pathogène émergent. Nous allons essayer de donner quelques arguments en faveur de cette hypothèse.

#### a Notion d'émergence

##### $\alpha$ *Définition*

Un pathogène émergent est défini comme un pathogène responsable d'une maladie dont l'incidence réelle augmente significativement dans une population donnée, d'une région donnée et pendant une période donnée, par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie.

Il convient d'insister sur les caractéristiques d'espace et de temps correspondant à une émergence. Un pathogène ne peut être émergent en permanence, et dans le monde entier (Toma et Thiry, 2003).

##### $\beta$ *Commentaire*

Il faut prêter une attention toute particulière à l'augmentation de l'incidence d'un pathogène. En effet, elle peut être due à une amélioration des techniques de dépistage, ou de diagnostic, ou à la mise en place d'une épidémiologie. Enfin, cette pseudo-émergence peut être amplifiée par la médiatisation (Toma et Thiry, 2003).

##### $\chi$ *Dans le cas d'E. sakazakii*

##### $\otimes$ Chronologie

Nous avons rapporté une majorité des cas d'infection à *E. sakazakii* décrits dans la littérature en annexe. Le tableau 17 est un récapitulatif des cas.

Depuis la première crise décrite, qui date de 1958 (Urmenyi et Franklin, 1961), une dizaine d'autres crises au moins et une dizaine de cas sporadiques, ont été rapportées.

La figure xx montre le nombre de cas d'infections néonatales à *E. sakazakii* par an depuis le premier cas de 1958. Ces données ne sont pas très fiables dans la mesure où dans les articles, la date des cas n'est pas toujours donnée. Dans ce cas, nous avons pris l'année de publication de l'article.

Jusqu'aux années quatre-vingt, seulement trois cas ont été décrits. Ensuite, avec la dénomination d'*E. sakazakii* en tant qu'espèce à part entière et non plus en tant que variant atypique d'*E. cloacae* pigmenté en jaune, le nombre de cas décrits dans la littérature a augmenté. Il est intéressant de remarquer que depuis les années 1998-1999, des cas sont décrits tous les ans. Aucun cas n'est encore rapporté en 2003.

Le graphique de la figure 11 semble montrer une augmentation de l'incidence des infections dues à *E. sakazakii* depuis 1958.

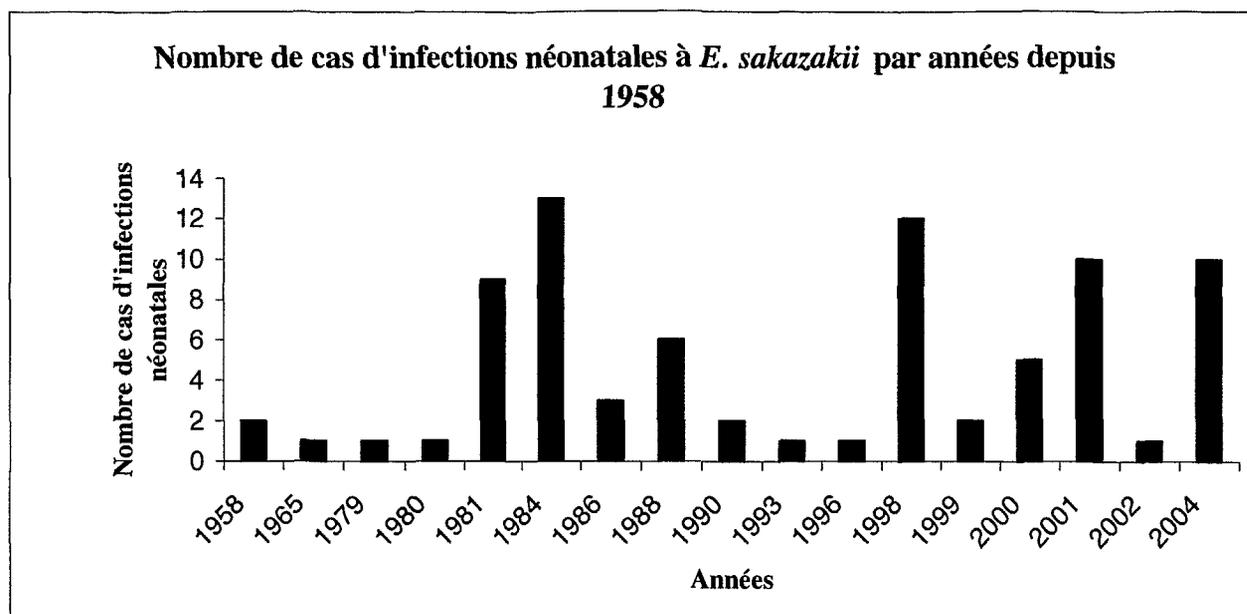


Figure 11: Nombre d'infections néonatales à *E. sakazakii* par an depuis 1958

#### ☞ Population concernée

Nous considérerons que la population donnée correspond aux nouveaux-nés, notamment ceux qui sont prématurés (la population est décrite précisément dans la première partie de l'épidémiologie).

Les cas sur les adultes et les enfants qui ont été rapportés ne rentrent pas dans la mise en évidence de l'émergence de cet agent pathogène. Ils représentent une minorité des cas d'infection (12,2%).

#### ☞ Région et période concernée

La région géographique en cause correspond aux pays développés (ceux dans lesquels les enfants prématurés sont pris en charge). Des cas d'infection ont été décrits en Angleterre, aux Etats-Unis, en Islande, au Danemark, aux Pays Bas, en Belgique, en Israël, en France et en Grèce.

La période d'apparition de l'émergence d'*E. sakazakii* correspond aux cinquante dernières années environ (depuis les premiers cas de 1958), puisque avant les cas de 1958, il ne semble pas qu'il y ait eu d'infections dues à *E. sakazakii* rapportées.

### **b** Facteurs d'émergence

Il est fort probable que l'apparition de maladies dues à *E. sakazakii* soit principalement due à l'apparition d'une population sensible, c'est-à-dire les nouveaux-nés prématurés, et de pratiques à risque : l'utilisation de préparation en poudre pour nourrissons.

Il faut considérer que les progrès de la médecine ont permis, depuis une cinquantaine d'années, la naissance et la survie d'enfants prématurés, ce qui n'était pas le cas auparavant. De plus, l'utilisation des préparations en poudre pour nourrissons est aussi récente, et souvent liée à ces naissances avant terme (la mère n'a pas encore de lait, il faut donc le remplacer).

Il est donc fort probable que l'apparition d'un nouveau type de population et de nouveaux facteurs de risques soit à l'origine de l'émergence de ce pathogène.

---

### *α Méthodes de détection*

Il ne semble pas que les méthodes de détection bactériologiques par culture et identification biochimique aient fondamentalement évoluées ces 50 dernières années. Urmenyi et Franklin (1961), n'ont pas été capables de nommer la bactérie qu'ils ont isolée de leurs patients, mais l'ont tout de même cultivée, et identifiée comme une souche d'*E. cloacae* atypique pigmentée en jaune.

Il est possible que des cas d'infections néonatales dues à *E. sakazakii* soient considérés comme ayant une étiologie inconnue, mais ce n'est certainement pas la majorité des cas.

Les remises en cause de l'identification biochimique des bactéries depuis l'avènement des méthodes moléculaires (Iversen et Forsythe, 2004c) sont à garder à l'esprit. Les conséquences sur la taxonomie pourraient être considérables.

Il est peu probable que le pathogène soit seulement pseudo-émergent. Les méthodes de détection évoluent, mais n'amplifient pas l'incidence de la maladie. Elles permettent seulement une meilleure connaissance de la biologie de l'agent pathogène.

Le risque est plutôt de sous-estimer l'incidence de la maladie, pour les raisons évoquées par ailleurs (première partie de l'épidémiologie).

### *β Population sensible*

Bien que ce ne soit pas toujours le cas, il semble que la population sensible soit constituée de nouveaux-nés, le plus souvent prématurés, et de faible poids à la naissance.

Une étude de Lai (2001) a mis en évidence que 50% des nouveau-nés dont le poids est mentionné dans les publications font moins de 2,500kg, 70% soit étaient prématurés, soit avaient souffert de complications péripartum.

### ⌘ Influence de la durée de gestation

Nous ne reprenons les données que des cas qui donnent toutes les informations (durée de la gestation et poids à la naissance). Les crises ou cas décrits par Arseni *et al.* (1987), Reina *et al.* (1989) et Noriega *et al.* (1990) ne sont donc pas pris en compte dans notre analyse.

La grande majorité des nourrissons malades sont prématurés (86%), et parmi ceux nés à terme, un seul (20%) a présenté une gestation avec complication.

Les durées de gestation s'étalent de 26 à 39 semaines (durée de gestation normale de 40 semaines). La durée moyenne de gestation est de 30 semaines et demi.

La sensibilité particulière des nouveaux-nés prématurés est à mettre en relation avec le fait que l'estomac des enfants prématurés a un pH plus élevé que celui d'un adulte. L'ingestion de lait reconstitué ne permet pas l'acidification et permet par conséquent la survie et la multiplication des pathogènes (Ongradi, 2002).

### ⌘ Influence du poids à la naissance

Quelques auteurs avaient mis en relation le poids à la naissance et le développement de méningite. Ils trouvent que l'incidence des méningites néonatales est plus importante chez les nouveaux-nés de faible poids (Muytjens *et al.*, 1983 ; Bar-Oz *et al.*, 2001). D'ailleurs, un des deux patients qui a guéri dans la crise décrite par Muytjens *et al.* (1983) était le plus lourd du groupe (2,830kg).

Lorsque le poids à la naissance des patients est donné, il s'étale de 0,460 à 3,308 kg. La moyenne est de 1,704 kg. Il semble donc que ce soit un élément important dans l'apparition d'infections due à *E. sakazakii*.

### χ *Utilisation de préparation en poudre pour nourrissons*

Pour palier le retard de la montée de lait lors de la naissance d'enfants prématurés, des préparations de poudre de lait pour nourrissons sont utilisées. Ces préparations ont différentes indications, suivant l'apport nutritionnel dont le nourrisson a besoin. Les progrès en nutrition des nouveaux-nés, ainsi que les nouveaux besoins ont favorisé leur développement, ce qui a permis de faire baisser le taux de mortalité infantile.

La croissance bactérienne est faible, aussi bien dans le lait humain que dans les poudres de lait reconstituées lorsqu'ils sont maintenus à des températures avoisinant les 22°C. De plus, il semble que l'ajout de bactériostatiques n'ait alors que très peu d'influence sur la multiplication des germes (Telang *et al.*, 2005).

### ⌘ Préparation de poudre de lait et infections à *E. sakazakii*

La mise en évidence du mode de transmission alimentaire d'*E. sakazakii* via les préparations en poudre de lait a été faite en 1990 de manière certaine par Clark *et al.*, et a été largement développée dans la partie concernant les sources et modes de transmission.

Une relation significative a souvent été mise en évidence entre l'utilisation de préparation en poudre pour nourrissons et le développement d'infections à *E. sakazakii*.

### ⌘ Contamination des préparations

Nous avons déjà vu les différentes études qui ont été réalisées pour déterminer le taux de contamination des préparations en poudre pour nourrissons. Ces produits ne sont pas stériles, contrairement aux préparations liquides, mais seulement pasteurisées. Quoiqu'il en soit c'est un fait avéré que les poudres de laits présentent des contaminations bactériennes.

Himmelright *et al.* (2002) pensent que le facteur le plus important au stade de la contamination est le nombre de bactéries présentes dans le produit.

### ⌘ Conduites à risque

Le taux de contamination des préparations de poudre de lait est trop faible pour être responsable d'une infection si aucune erreur de préparation n'est associée. De nombreux auteurs ont donc considéré que le protocole de réhydratation des poudres ne devait pas être observé de manière rigoureuse au moment des crises.

Biering *et al.* (1989), après avoir mis en évidence avec Clark *et al.* (1990) que la consommation de poudre de lait était à l'origine des infections à *E. sakazakii*, ont suggéré que les protocoles reconstitution de lait à partir de la poudre ne soient pas toujours respectés. Simmons *et al.* (1989) et Noriega *et al.* (1990) ont aussi mis en cause les protocoles de préparation des laits reconstitués.

Himmelright *et al.* (2002) pensent que lors de conservation après la préparation, prolongée et à température ambiante, il y a une possibilité d'amplification importante du nombre de bactéries déjà présent.

Les conclusions de l'étude de Decisionalysis risk Consultant Inc. (2004) rapportées dans la partie précédente (Dissémination) sont en accord avec ces conclusions. La préparation (température du liquide de réhydratation) et la conservation (température, durée) des préparations de poudre de lait pour nourrisson sont les éléments clé des conduites à risque à maîtriser.

Ces conduites à risque doivent être évitées. Pour cela, des mesures de prévention des infections doivent être mises en place. Une évaluation la plus précise possible du risque associé à *E. sakazakii* doit être réalisée, pour permettre des mesures de prévention efficaces.

---

## 2. Evaluation du risque

### a Objectif

Les objectifs de l'évaluation du risque engendré par *E. sakazakii* sont de répondre aux questions suivantes (FAO, 2005) :

- ◆ Quels sont les facteurs de risque pour la sécurité microbiologique des poudres de lait, et quelle est leur importance relative ;
- ◆ Quelles sont les mesures à prendre pour influencer sur ces facteurs de risques et quelle est leur efficacité relative ;
- ◆ Quelles données ou connaissances scientifiques clés sont nécessaires pour réduire l'incertitude concernant l'estimation des risques et de l'efficacité des mesures de contrôle ;
- ◆ Quelles sont les conséquences potentielles des mesures de contrôle du risque si elles sont appliquées ?

### b Considérations préliminaires

Beaucoup de produits différents rentrent dans la dénomination préparation en poudre pour nourrissons. Dans cette évaluation du risque, les produits considérés sont ceux correspondant à la définition suivante : des produits vendus sous forme de poudre, nécessitant une étape de réhydratation, pour servir d'aliment sous forme liquide en tant que substitut complet ou partiel du lait humain.

L'évaluation du risque ne peut se faire de manière mondiale, mais uniquement dans les pays fournissant une information

Les risques associés à la contamination intrinsèque de la poudre de lait, et ceux acquis lors de la préparation et du nourrissage sont évalués. Par contre, les conséquences potentielles de la qualité microbiologique de l'eau sont ignorées.

Comme il a été décrit, la majorité des cas d'infection à *E. sakazakii* a lieu chez les nourrissons et nouveaux-nés. Seules ces deux populations sont donc considérées (FAO, 2005).

### c Eléments clé de l'évaluation du risque *E. sakazakii*

#### *α Concernant les préparations de poudre de lait*

Les éléments clé affectant ce risque microbiologique sont le taux de contamination initial de la poudre de lait, le degré d'hygiène lors de la préparation et de la distribution de la préparation reconstituée, l'existence ou non d'un traitement bactéricide lors de la préparation, et la durée du nourrissage, couplé à la température (FAO, 2005).

#### *β Facteurs de réduction du risque*

Les deux facteurs ayant une plus grande influence sur la réduction du risque associé à *E. sakazakii*, sont la durée de consommation, et l'ajout d'un traitement bactéricide lors de la réhydratation (FAO, 2005).

#### *χ Contrôle de la contamination*

Le risque associé à *E. sakazakii* peut être réduit en diminuant la contamination des poudres de lait, et l'importance de cette contamination est directement imputable à la présence du pathogène dans l'environnement (FAO, 2005).

$\delta$  *Nombre de mesures de contrôle*

Il faut faire en sorte que les mesures de contrôle du risque soient synergiques entre elles (FAO, 2005).

$\varepsilon$  *Connaissance du pathogène*

Les estimations du risque associé à *E. sakazakii* sont très incertaines du fait du manque de connaissances scientifiques (FAO, 2005).

☠ *E. sakazakii* est un pathogène émergent : l'incidence des infections causées par *E. sakazakii* a augmenté depuis 1958, chez les nouveaux-nés et nourrissons, dans les pays industrialisés.

☠ Ses facteurs d'émergence sont :

● Le développement de la population sensible, c'est-à-dire les nouveaux-nés prématurés (30 semaines et demi de gestation en moyenne) et de faible poids à la naissance (1,704 Kg en moyenne).

● L'utilisation de préparations de poudre de lait pour nourrissons contaminées par *E. sakazakii* avec des erreurs de préparation et surtout de conservation.

☠ Les éléments clé de l'évaluation du risque *E. sakazakii* :

● Le taux de contamination initial des préparations de poudre de lait ;

● L'hygiène lors de la préparation et distribution ;

● L'existence d'un traitement bactéricide lors de la préparation ;

● La durée et la température de distribution ;

● La pression environnementale des usines de fabrication des poudres de lait ;

● La synergie des mesures de contrôle d'*E. sakazakii* ;

● L'état des connaissances scientifiques.

---

## **IV - PREVENTION DES INFECTIONS A *ENTEROBACTER SAKAZAKII***

---

Les deux éléments majeurs à contrôler, sont la contamination initiale des poudres de lait par *E. sakazakii*, ce qui n'est pas évident étant donné le caractère ubiquiste du germe, et la multiplication bactérienne dans les préparations de poudre de lait pour nourrissons lorsque la contamination est réelle.

Ces deux éléments passent par une action des industriels pour limiter, voire supprimer la contamination des poudres de lait, et par une action de toutes les personnes reconstituant un biberon, qui doit appliquer des règles strictes.

### **A / MESURES APPLICABLES PAR LES INDUSTRIELS**

Les pathogènes présents dans les poudres de lait proviennent de l'environnement, des ingrédients ajoutés après les traitements thermiques, et de contamination après pasteurisation. Le séchage et le remplissage sont souvent les sites de contamination principaux des produits en poudre (Iversen et Forsythe, 2003).

#### **1. Contrôle des étapes de fabrication**

##### **a Etape de contamination**

D'après la résistance thermique d'*E. sakazakii* (vue dans la partie de microbiologie), la bactérie ne survivrait pas à la pasteurisation, dès lors, les contaminations des poudres de laits pour nourrissons se font donc lors de manquements à l'hygiène après la pasteurisation (Iversen *et al.*, 2004b). Dans le cadre de la lutte spécifique contre *E. sakazakii*, c'est donc après cette étape qu'il faut éviter les contaminations (Iversen et Forsythe, 2003).

Le lait de vache est utilisé à la place du lait humain. Ce lait de vache est modifié pour réduire les protéines, les minéraux, augmenter les protéines du petit lait, l'hydrate de carbone, et le ration Ca/P. Le taux de matière grasse est modifié, et des vitamines ajoutées. Ceci est réalisé grâce au traitement humide et au traitement sec (Iversen et Forsythe, 2003).

##### **b Présence dans l'environnement**

Il a été vu que dans les environnements secs et chauds, tels qu'autour des équipements de séchage des usines de poudre de lait, *E. sakazakii* a un avantage de croissance compétitif comparé aux autres membres des *Enterobacteriaceae* (Breeuwer *et al.*, 2003).

Il serait intéressant de réduire le nombre d'*Enterobacteriaceae* dans l'environnement de production pour réduire la prévalence et la concentration d'*E. sakazakii* dans le produits fini.

##### **α Application de bonnes pratiques industrielles et hygiéniques**

Il faut séparer les étapes sèches et humides du procédé. L'application de bonnes pratiques industrielles, hygiéniques et des principes HACCP est nécessaire pour contrôler au mieux les diverses possibilités de contamination lors de la fabrication et du traitement des préparations de poudre de lait

---

pour nourrissons. De plus, il peut être intéressant d'avoir un système efficace d'hygiène du matériel, incluant un monitoring environnemental (EFSA, 2004 ; FAO, 2005).

Lors du traitement humide, les mesures d'hygiène basiques sont appliquées, comme la conception hygiénique de l'équipement, notamment pour les parties situées après le traitement thermique, ou encore les procédures de nettoyage et désinfection (EFSA, 2004).

### *β Séparation de l'usine en zones*

Pour limiter la présence d'*E. sakazakii* dans les usines, l'hygiène doit être très stricte dans leur sein, en classant les zones en trois catégories (hygiène basique, moyenne et enfin haute sur les lignes de production). L'intégrité physique des bâtiments doit être vérifiée, ainsi que la conception hygiénique des équipements et matériaux ... (EFSA, 2004)

### *χ Contrôle de l'humidité*

L'EFSA (2004) conseille de maintenir l'environnement le plus sec possible pour limiter le développement bactérien. Il convient d'éliminer les sources d'eau et d'appliquer des procédures de nettoyage à sec.

### *δ Limites*

Le caractère ubiquiste de la bactérie est à prendre en considération, puisque malgré ces mesures, il est possible de la retrouver dans l'environnement. Dès lors, il est impossible d'exclure la possibilité d'une contamination sporadique des poudres de lait (EFSA, 2004)

## **2. Matières premières**

La FAO (2005) et l'EFSA (2004) conseillent de mettre en place un système de garantie avec les fournisseurs des matières premières et de les contrôler rigoureusement, surtout pour les ingrédients ne subissant pas de traitement thermique supplémentaire avec le mélange. Des audits de leurs procédures sont à réaliser, ainsi que des contrôles d'usines.

Dans certaines matières premières, telles que le lait cru, la présence d'*E. sakazakii* est possible, et la mesure de contrôle la plus efficace est le traitement thermique. Les ingrédients ajoutés après le traitement thermique (comme le lactose par exemple) doivent répondre aux mêmes critères microbiologiques que le produit fini (EFSA, 2004).

## **3. Personnel**

L'accès du personnel doit être rigoureusement contrôlé. Les tenues vestimentaires sont changées à l'entrée (EFSA, 2004).

## **4. Produits finis**

En sortie d'usine, il est aussi conseillé de faire des autocontrôles dans les poudres de lait (FAO, 2005).

Il faut noter que certains fabricants communiquent activement pour dire qu'ils ont une procédure HACCP en place, qu'ils essaient de contrôler les contaminations environnementales, et qu'ils testent des échantillons des produits avant la sortie d'usine (SHS International, 2003).

## 5. Contrôle de l'efficacité des mesures

L'efficacité des mesures est vérifiée par des contrôles microbiologiques. Ils portent sur des échantillons de matières premières, des lignes de productions (résidus, surfaces en contact avec les aliments) et des échantillons environnementaux (surface externes des équipements et des environs des lignes de production). Les *Enterobacteriaceae* sont des indicateurs fiables de la possibilité de présence d'*E. sakazakii*. Ces plans de contrôles sont dynamiques et sont à accorder suivant les résultats obtenus (EFSA, 2004).

Toutes les mesures décrites ci-dessus permettent de limiter la contamination des poudres de lait par *E. sakazakii*, mais ces produits ne sont pas stériles, et la préparation et la conservation des biberons doit également être contrôlée (EFSA, 2004).

- ☠ Les pathogènes présents dans les poudres de lait proviennent de l'environnement, des ingrédients ajoutés après les traitements thermiques, et de contamination après pasteurisation.
- ☠ Il faut contrôler le procédé de fabrication (séparation des secteurs, plan HACCP, choix des matériaux...), les matières premières (notamment celles ne subissant pas de traitement thermique) et le personnel pour éviter au maximum la contamination.
- ☠ Des contrôles microbiologiques sont à réaliser à toutes les étapes.
- ☠ Quelles que soient les mesures prises, les préparations de poudre de lait pour nourrissons ne sont pas stériles.

---

## **B / PREPARATION ET CONSERVATION DES BIBERONS**

L'allaitement maternel constitue la référence pour l'alimentation du nourrisson pendant les premiers mois de vie. L'assemblée générale de l'OMS a ainsi recommandé en mai 2001 un allaitement maternel exclusif pendant les six premiers mois de la vie et la poursuite de l'allaitement jusqu'à l'âge de deux ans, voire au-delà en fonction du souhait des mères (OMS, 2001).

Dans cette optique, il faut renforcer la promotion et le support de l'allaitement maternel au sein (Lucas et Cole, 1990 ; Arts, 2004 ; Agostoni *et al.*, 2004), et supporter la mise en place d'une banque de lait humain (Lucas et Cole, 1990).

Cependant, si l'allaitement n'est pas possible, le nouveau-né est alimenté avec des préparations pour nourrissons à base de protéines de lait de vache ou de soja, dont la composition répond aux normes définies dans la directive 91/321/CEE (1991), les directives 96/4/EC (1996) et 1999/50/EC (1999) amendant la directive 91/321/CEE, et dans la directive 1999/21/EC sur les aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS) (1999).

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, ces produits sont stériles quand ils sont sous une forme liquide prête à l'emploi, mais ne le sont pas quand ils sont sous forme de poudre. Les conditions de préparation, de manipulation et de conservation sont essentielles pour éviter les contaminations microbiennes et leur multiplication, qui peuvent être à l'origine d'infections graves, voire de décès, de nouveau-nés et de jeunes nourrissons. *E. sakazakii* est un exemple typique de bactérie présente dans ces préparations et causant des maladies chez les nourrissons.

La nature très répandue d'*E. sakazakii* doit être prise en considération dans la mise en place de mesures préventives de contrôle (Kandhai *et al.*, 2004a).

Cette partie traite des mesures préventives à tous les niveaux pour éviter des cas d'infections chez les nouveaux-nés. Elle est en très grande partie inspirée du rapport de l'Afssa intitulé « préparation et conservation des biberons ».

Les experts de ce groupe recommandent de veiller à la prise de connaissance de leur rapport et à l'appropriation de leurs recommandations par les établissements concernés (établissements hospitaliers, pouponnières, structures d'accueil de la petite enfance, etc.) et le personnel administratif et soignant en charge de leur application (Turck *et al.*, 2005).

### **1. Réglementation portant sur l'hygiène, la préparation et la distribution des repas en collectivités**

#### **a Dispositions relatives à l'hygiène générale des denrées**

La mise en œuvre au 1<sup>er</sup> janvier 2006 du règlement 852/2004/CE qui établit les règles générales en matière d'hygiène des denrées alimentaires à l'intention des exploitants du secteur alimentaire, tous secteurs confondus, et notamment des collectivités de restauration, renforce la responsabilité première du professionnel en matière de sécurité alimentaire.

Ce règlement impose la mise en œuvre de procédures fondées sur les principes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point ou Analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise) ou, le cas échéant, établies par des guides de bonnes pratiques d'hygiène, validés par les autorités compétentes.

**b** Dispositions relatives aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite, aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS) et aux substances ajoutées dans les biberons

L'arrêté du 1er juillet 1976 relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge et l'arrêté du 5 juin 2003 relatif aux substances qui peuvent être ajoutées dans un but nutritionnel spécifique aux denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière sont les principaux textes de base établissant les critères sanitaires et de pureté des préparations pour nourrissons et des préparations de suite fabriquées par les industriels.

Les préparations diététiques et/ou magistrales réalisées dans les services de néonatalogie et de pédiatrie échappent à cette réglementation.

Une attention particulière devrait être portée à la composition et à la destination des substances ajoutées dans les biberons (épaississants, vitamines, minéraux...), utilisées dans ces préparations au sein de l'hôpital.

**c** Les principes HACCP

Les aliments sont des vecteurs importants de dangers qu'il faut savoir identifier. C'est pourquoi les professionnels doivent mettre en place, appliquer et maintenir une ou plusieurs procédures permanentes fondées sur les principes du concept HACCP.

Ces sept principes sont les suivants (FAO, 2001) :

1. Identifier tout danger (biologique, physique ou chimique) qu'il y a lieu de prévenir, d'éliminer ou de ramener à un niveau acceptable ;
2. Identifier les points critiques au niveau desquels une maîtrise est indispensable pour prévenir ou éliminer un danger ou pour le ramener à un niveau acceptable ;
3. Etablir, aux points critiques de maîtrise, les limites critiques qui différencient l'acceptabilité de l'inacceptabilité pour la prévention, l'élimination ou la réduction des dangers identifiés ;
4. Etablir et appliquer des procédures de surveillance efficace des points critiques de maîtrise ;
5. Etablir les actions correctives à mettre en œuvre lorsque la surveillance révèle qu'un point critique de contrôle n'est pas maîtrisé ;
6. Etablir des procédures exécutées périodiquement pour vérifier l'efficacité des mesures visées aux points 1 à 5 ;
7. Etablir des documents et des dossiers en fonction de la nature et de la taille de l'établissement pour prouver l'application effective des mesures visées aux points 1 à 6.

L'application de ces principes est implicite et ne sera donc pas reprise spécifiquement dans les différents chapitres de ce document.

**d** Les guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP

Réalisés par les organismes professionnels ou interprofessionnels sur la base d'une démarche volontaire, ces guides permettent aux différentes structures concernées de mettre en œuvre des procédures simplifiées mais éprouvées de maîtrise des dangers. Toutefois, seuls les guides validés par les autorités après avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) représentent un consensus entre l'administration et les professionnels, et sont donc opposables.

---

## e Les contraintes réglementaires

### *α Autocontrôles*

La mise en œuvre d'un plan HACCP ne peut s'exonérer des autocontrôles qui permettent de vérifier le respect des valeurs limites/critiques.

Ainsi, les surfaces de l'environnement de préparation, le matériel, les matières premières doivent être régulièrement contrôlés, mais aussi le personnel, selon des procédures établies (FAO, 2001).

### *β Dispositions relatives au personnel*

Les personnels d'établissements dans lesquels des denrées d'origine animale sont préparées, traitées et transformées, en vue de la consommation collective des entreprises, des administrations, des institutions à caractère social et des établissements scolaires et universitaires, doivent se soumettre à un dépistage relatif à leur état de santé et d'hygiène selon les modalités de l'arrêté du 10 mars 1977.

### *χ Echantillonnage des plats témoins*

Disposition réglementaire selon l'arrêté du 29 septembre 1997, l'échantillonnage doit permettre d'identifier la source d'une contamination accidentelle. Cette obligation de moyens parfois lourde à mettre en œuvre ne doit pas occulter l'objectif de résultat : identifier l'origine de la contamination. C'est pourquoi il est absolument nécessaire, si la structure ne peut mettre en place un échantillonnage pertinent, d'élaborer un système de traçabilité et d'identification des produits et d'enregistrement des paramètres des procédés mis en œuvre en cas de toxi-infection alimentaire collective.

## f Recommandations de l'Afssa

Si l'arrêté du 29 septembre 1997 rend obligatoire le port de la charlotte, le port du masque oro-nasal est laissé à l'appréciation du professionnel.

Cependant, le règlement 852/2004/CE précise que toute personne travaillant dans une zone de manutention de denrées alimentaires doit respecter un niveau élevé de propreté personnelle et porter des tenues adaptées et propres assurant, si cela est nécessaire, sa protection.

Le groupe d'expert de l'Afssa préconise que le personnel affecté à la préparation des biberons soit formé aux principes d'application de la méthode HACCP, et porte non seulement une charlotte mais aussi un masque (de type masque de soins) afin de limiter au maximum la diffusion de gouttelettes potentiellement contaminantes provenant du nez et de la bouche (Turck *et al.*, 2005).

### 2. Locaux, équipements (infrastructures, nettoyage, désinfection) et personnels

Cette partie porte sur les caractéristiques de la biberonnerie et de ses équipements, quelle que soit son implantation dans des secteurs prenant en charge des enfants, et sur le personnel travaillant en biberonnerie.

## a Locaux et équipements

### *α Biberonnerie : généralités*

#### ☞ Fonctionnement

Dans un établissement de santé, le fonctionnement de la biberonnerie s'apparente à celui d'une cuisine hospitalière. La biberonnerie est donc une unité fonctionnelle spécifique, exclusivement dédiée à la reconstitution de préparations lactées ou de produits nutritionnels spécifiques.

Son activité s'articule autour des unités de soins pédiatriques et de maternité. Elle nécessite une organisation rigoureuse pour délivrer les préparations nutritionnelles 24 heures sur 24, 7 jours sur 7 (Turck *et al.*, 2005).

#### ☞ Réglementation

Le code de la santé publique impose aux établissements de santé de disposer d'une biberonnerie spécifique depuis 1997 lorsqu'ils sont dotés d'un service de pédiatrie, et depuis octobre 1998 lorsqu'ils comportent un service de néonatalogie.

L'unité de néonatalogie comporte «un secteur spécialement affecté à l'alimentation des nouveau-nés ; ce secteur peut être commun à l'unité d'obstétrique et, éventuellement, à l'unité de réanimation néo-natale» (Article D 712-92).

L'unité de réanimation néo-natale comprend «un secteur destiné à l'alimentation des nouveau-nés, éventuellement commun aux unités d'obstétrique et de néonatalogie» (Article D 712-99).

En ce qui concerne la maternité, «le secteur spécifiquement affecté à la préparation des biberons est divisé, s'il y a lieu, en 2 zones distinctes, permettant d'une part, la préparation des aliments des nouveau-nés, d'autre part, l'entretien des biberons» (Article D 712-87).

Selon la classification des locaux hospitaliers, ce secteur à risque infectieux nécessite une organisation architecturale de type secteur protégé (zone 3). Il comporte un sas réglementant les entrées et permettant l'accès aux zones propres et sales.

Par extension, ce secteur alimentaire doit répondre aux exigences organisationnelles de l'arrêté fixant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective (partie précédente). Les activités nécessaires à la préparation et à la reconstitution des biberons et des seringues de nutrition entérale nécessitent des locaux adaptés.

#### ☞ Organisation des locaux

Ces locaux répondent à une logique organisationnelle selon :

- ⌘ Le concept de la «marche en avant», qui permet le cheminement des denrées, du matériel et les déplacements de personnel afin de respecter les principes d'hygiène de fabrication ;
- ⌘ le concept de séparation du secteur sale du secteur propre, qui vise à séparer physiquement au fur et à mesure les différents flux (personnels, matériels, denrées alimentaires).

Lorsque les locaux ne permettent pas la mise en œuvre du concept de la « marche en avant » dans l'espace, ce concept se transforme en une organisation conduisant à une répartition des tâches par zone selon le moment de la journée (Turck *et al.*, 2005).

### *β La biberonnerie : un secteur à adapter au type de structure*

En fonction de la structure concernée (établissements de santé ou collectivités pédiatriques), un secteur spécifique doit permettre d'effectuer la préparation, la manipulation, la

---

conservation des biberons et des seringues pour la nutrition entérale (American Dietetic Association, 2005).

Parmi ces structures, on distingue deux groupes (Turck *et al.*, 2005) :

- ⌘ Etablissements de santé, centres thérapeutiques spécifiques, pouponnières, avec unité centralisée de préparation des biberons ;
- ⌘ Unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés), structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants), qui nécessitent une adaptation de l'organisation du travail à une architecture plus restreinte selon le même concept de «marche en avant».

#### ☞ Etablissements de santé, centres thérapeutiques spécifiques, pouponnières, avec une unité centralisée de préparation des biberons

La biberonnerie comporte un secteur général d'intendance matérielle des stocks (neutre), un secteur protégé et un secteur sale.

Les experts de l'Afssa conseillent de veiller à la présence d'unités centrales de préparation des biberons dans les hôpitaux (Turck *et al.*, 2005).

#### ☞ Réglementation

Selon la réglementation fixant les conditions d'hygiène applicables aux établissements assurant un service de restauration pour une collectivité (hôpitaux, cliniques, crèches, foyers d'accueil, etc.) et aux unités les approvisionnant (cuisines et laboratoires), l'infrastructure de base de l'équipement des divers secteurs doit comporter au minimum (Code de la santé publique) :

- ☛ *«Un système d'évacuation des eaux usées et pluviales ;*
- ☛ *Un système de ventilation suffisant devant éviter tout flux d'air pulsé d'une zone contaminée vers une zone propre ;*
- ☛ *Un éclairage suffisant ;*
- ☛ *Des revêtements de sol et des surfaces murales faciles à nettoyer et à désinfecter ; en matériaux étanches, non absorbants, résistant aux chocs, imputrescibles, clairs, lavables et non toxiques ;*
- ☛ *Des angles d'insertion entre le sol et les surfaces murales permettant de maintenir une propreté permanente ;*
- ☛ *Des portes lessivables, résistantes aux chocs, imputrescibles et lisses ;*
- ☛ *Des fenêtres et autres ouvertures prévenant l'encrassement et équipées de protection contre les insectes, démontables pour être nettoyées ;*
- ☛ *Des plafonds, faux plafonds et autres équipements suspendus permettant un état de propreté permanent, réduisant la condensation, les moisissures et la chute de particules sur les denrées ou les surfaces en contact»...*

#### ☞ Secteur général

Ce secteur neutre comporte (American Dietetic Association, 2005 ; Turck *et al.*, 2005) :

- ⌘ Des vestiaires spacieux ; ils sont réservés au personnel et comportent des sanitaires situés à l'extérieur du secteur protégé. A la sortie des toilettes, un équipement permettant le lavage des mains est installé. Il est composé de lave-mains à commande non manuelle, alimentés en eau chaude et froide, et équipés de distributeurs de savon liquide et d'essuie-mains à usage unique ;
- ⌘ Une zone de réception des produits (premier déconditionnement) ;
- ⌘ Une zone de stockage des matériels destinés à la conservation des biberons recyclables ou à usage unique (dispositifs médicaux à usage unique, seringues, biberons, accessoires et tenues en non tissé...), et des denrées (poudres de lait, produits diététiques, etc.). Ce local, non chauffé et sec, est meublé par un équipement lavable et pouvant être désinfecté, en matériaux lisses, clairs,

imputrescibles et non toxiques. C'est une salle de transit permettant d'effectuer différents modes de conservation ;

- ⌘ Une armoire réservée aux produits destinés à l'entretien et à la vaisselle ;
- ⌘ Une zone destinée à décartonner ;
- ⌘ Un bureau de contrôle/supervision des activités, à proximité de la salle de préparation. Ce bureau, selon l'architecture, peut faire fonction de sas d'entrée ;
- ⌘ Un sas d'accès au secteur protégé, qui comporte :
  - ✱ Un point d'eau à commande non manuelle,
  - ✱ Du savon liquide, de type savon doux (contenant un bactériostatique), avec un conditionnement non contaminable,
  - ✱ Un distributeur d'essuie-mains à usage unique,
  - ✱ Des tenues vestimentaires à usage unique.

Les produits de friction pour les mains (solution ou gel) peuvent constituer une alternative au savon liquide. Ils permettent le traitement hygiénique des mains par friction. Ils sont bien tolérés, rapides d'utilisation mais demandent une bonne connaissance de la technique de friction (Société française d'hygiène hospitalière, 2002). Ils ne dispensent pas d'un lavage des mains initial à l'entrée dans le secteur, et chaque fois que les mains sont souillées.

En ce qui concerne l'installation électrique, il est nécessaire de prévoir un nombre suffisant de prises électriques, bien positionnées vis à vis des postes de travail, dans des matériaux supportant le bionettoyage.

Tous les locaux disposent de poubelles sans couvercle ou à commande non manuelle, et de sacs à usage unique.

#### ☞ Un secteur propre ou protégé

##### ⌘ *Fonctionnement*

Son accès est réglementé et nécessite le passage du personnel par le sas d'accès. Les postes de travail ne doivent pas entraîner de déplacement du personnel entre le secteur propre et le secteur sale au moment de la préparation des biberons. Si nécessaire, ces déplacements doivent être organisés pendant des périodes différentes de la journée et sont intégrés dans le processus de préparation.

Afin de maintenir autant que possible la chaîne du froid, il est souhaitable que la température de ce local, dans la zone de préparation, ne soit pas supérieure à 20°C.

Ce secteur propre est la salle de préparation des biberons, spacieuse et claire (Coteheros, 1997).

##### ⌘ *Equipements et matériel*

Les matériaux des surfaces composant ce local doivent permettre de les maintenir facilement dans un état de propreté constant.

L'équipement et les ustensiles de préparation des biberons doivent être choisis selon des critères d'entretien et être démontables. Il doit être possible de les désinfecter. Il comporte (Coteheros, 1997 ; American Dietetic Association, 2005) :

- De nombreux placards, des paillasse,
- Des guéridons et des chariots,
- Du matériel de réfrigération : armoire, table, vitrine ou enceinte réfrigérée,
- Des lave-mains individualisés, à commande non manuelle.

---

### ⌘ *Surveillance environnementale*

Dans le cadre de la surveillance environnementale, des contrôles microbiologiques réguliers de l'eau du réseau sont effectués selon le système d'assurance-qualité mis en place dans l'établissement (fréquence minimale trimestrielle). Des contrôles de la qualité des surfaces peuvent être réalisés (American Dietetic Association, 2005).

Si des préparations chaudes sont effectuées dans ce local, une zone spécifique doit être aménagée, comprenant un bain-marie, des plaques de cuisson avec hotte et une cellule de refroidissement (Turck *et al.*, 2005).

### ⌘ *Systèmes de réchauffement utilisant de l'eau*

En pratique hospitalière, il n'est pas conseillé d'utiliser des systèmes de réchauffement utilisant de l'eau (bain-marie, chauffe-biberon avec eau ; Muytjens *et al.*, 1990 ; Turck *et al.*, 2005).

Si réchauffement il y a, il faut privilégier un chauffe-biberon à sec (Turck *et al.*, 2005), ou bien garder les bouteilles au réfrigérateur et les réchauffer au micro-onde juste avant leur utilisation (Muytjens *et al.*, 1990). Les experts de l'Afssa contre-indiquent formellement l'utilisation du micro-onde (les raisons sont expliquées dans le paragraphe traitant du réchauffement des biberons).

### ⌘ *L'enceinte réfrigérée*

Elle est adaptée à la capacité de stockage de l'eau et des ingrédients nécessaires à la préparation des biberons, avant leur distribution dans les unités.

Une zone particulière permet le stockage du lait de femme. La température intérieure doit être inférieure ou égale à 4°C, enregistrée et contrôlée quotidiennement. Un étalonnage de l'appareil de mesure est à réaliser de façon régulière.

A proximité, un petit local ou un placard (équipé d'un système de fermeture) doit permettre le stockage du matériel et des produits d'entretien (Turck *et al.*, 2005).

### ⌘ *Un secteur sale*

Il regroupe les zones de traitement des produits et du matériel utilisés. Il comporte :

- ⌘ Une zone de pré-désinfection des produits utilisés pour la préparation (eau embouteillée, boîtes étanches diverses, etc.) ;
- ⌘ Une zone de lavage des biberons et du petit matériel de préparation. Un lave-vaisselle permet le traitement automatisé de l'ensemble des matériels (pots, fouets, couverts, etc.).

Le ramassage des biberons usagés dans les services est effectué dans des bacs fermés utilisés ensuite pour la pré-désinfection en zone sale.

En fonction du mode de distribution aux services, un local de stockage des chariots ou des conteneurs isothermes est utilisé. Ces matériels sont nettoyés et désinfectés tous les jours et sont maintenus en bon état de fonctionnement (Coteheros, 1997 ; Turck *et al.*, 2005).

### ☞ Unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés), structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants)

#### ⌘ *Réglementation*

Ces structures sont également tenues d'appliquer le règlement 852/2004/CE relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, qui définit dans son annexe II les dispositions générales applicables, en particulier :

- ⌘ Des locaux adaptés à leur utilisation ;

- ⌘ Une ventilation et un éclairage adéquats et suffisants ;
- ⌘ Des surfaces bien entretenues, faciles à nettoyer et/ou à désinfecter, constituées de matériaux étanches, non absorbants, lavables et non toxiques ;
- ⌘ Des installations sanitaires en nombre suffisant, équipées d'eau chaude et froide, si possible à commande non manuelle, du matériel pour le nettoyage et pour le séchage des mains dans le respect des règles d'hygiène ; les toilettes ne doivent pas directement communiquer avec les locaux de manipulation et de préparation.

#### ↪ Locaux et équipements

Les locaux utilisés doivent être entretenus, nettoyés et/ou désinfectés selon un plan de nettoyage adapté à leur agencement et à leur conception. Ils doivent prévenir ou réduire la contamination aéroportée.

Si une certaine souplesse par rapport à la disposition des locaux ou de l'équipement peut être accordée aux petites structures, celles-ci doivent cependant remplir les obligations liées au règlement 852/2004/CE.

#### ↪ Enceintes réfrigérées

Les enceintes réfrigérées doivent (au sens de l'article 4 du règlement 852/2004/CE), assurer le maintien de la chaîne du froid. La température intérieure doit y être inférieure ou égale à 4°C, être enregistrée et contrôlée quotidiennement. Un étalonnage régulier de l'outil de mesure de la température est nécessaire.

#### ⌘ Entretien du matériel

Le décret du 22 décembre 2000 relatif à la pharmacie à usage intérieur impose que les diverses étapes d'entretien et de stérilisation soient effectuées dans un seul lieu.

Selon la structure, l'opération de remise en état du matériel peut être prise en charge par le service de stérilisation ou réalisée dans la biberonnerie. Les matériels sont conditionnés, stérilisés à l'autoclave vapeur dans des conditions adéquates de propreté sous la responsabilité du pharmacien.

#### ⊕ Etablissement de santé, centres thérapeutiques spécifiques, pouponnières, avec une unité centralisée de préparation des biberons

##### ↪ Type de désinfection (Turck et al., 2005)

En établissement de santé le biberon est assimilé à un dispositif médical. Selon le classement des dispositifs médicaux et le niveau de traitement requis, il s'agit d'un matériel en contact avec la muqueuse buccale ; le classement du matériel est de type semi-critique, le niveau de risque infectieux est un risque médian.

#### ⌘ Enfants immuno-compétents

Pour les enfants immuno-compétents, ce matériel nécessite une désinfection de type intermédiaire.

---

<sup>a</sup> Désinfection de bas niveau : Désinfection visant en priorité la bactéricidie (formes végétatives des bactéries) ; elle concerne essentiellement les dispositifs médicaux non invasifs et les surfaces.

Désinfection de niveau intermédiaire : Désinfection faisant appel à un produit bactéricide, fongicide, virucide et mycobactéricide ; elle concerne les dispositifs médicaux en contact avec des muqueuses ou une peau lésée.

---

Un appareil professionnel portant la mention « thermo-désinfection », appelé « laveur-désinfecteur », permet d'atteindre une désinfection de niveau intermédiaire.

Les étapes de désinfection de niveau intermédiaire se suffisent alors à elles-mêmes

### ⌘ *Enfants immuno-déprimés*

Toutefois, dans certains services à haut risque infectieux (néonatalogie, onco-hématologie, centre de rééducation pédiatrique), l'état immunitaire des patients peut être compromis. Le matériel est alors considéré comme critique il est nécessaire de recourir à une stérilisation.

#### ↪ Biberons à usage unique

Selon le choix de la structure, pour éviter le recyclage des biberons, il est plus pratique au niveau organisationnel d'utiliser des biberons à usage unique. Ceux-ci doivent être stériles pour les enfants immunodéprimés (Turck *et al.*, 2005).

#### ↪ Procédure de nettoyage et de désinfection

L'automatisation de la procédure de nettoyage et de désinfection des matériels de préparation et des biberons justifie que cette procédure soit effectuée par un procédé de désinfection thermique (Coterehos, 1997).

### ⌘ *Etapes de la procédure*

Quel que soit le traitement envisagé, les biberons doivent être vidés de leur éventuel contenu résiduel et rincés à l'eau du réseau. Leur immersion dans de l'eau contenant un détergent type liquide-vaisselle peut se justifier dans le cas d'un délai d'attente avant traitement.

Selon le niveau de thermorésistance des micro-organismes, on estime que la désinfection est obtenue si la température est maintenue au moins une minute à 80°C (ou 6 secondes à 90°C) pour les formes bactériennes les moins résistantes. Une augmentation de la durée ou de la température accroît l'efficacité du procédé.

### ⌘ *Appareils utilisés*

Le nettoyage et la désinfection doivent être effectués par des appareils automatiques, qui sont de 2 types :

- ✱ Les laveurs-désinfecteurs professionnels :
- ✱ température > 90°C, durée 1 minute de plateau thermique ;
- ✱ Les lave-vaisselle :
  - Semi-professionnels, la température est au maximum de 85 / 86°C,
  - Non-professionnels (domestiques) : la température doit être supérieure à 65°C.

#### ☪ Unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés), structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants)

#### ↪ Type de désinfection

Le biberon est un matériel hôtelier au même titre que les couverts et les assiettes. A ce titre, il relève d'une désinfection de bas niveau (Turck *et al.*, 2005).

---

Désinfection de haut niveau : Désinfection faisant appel à un produit bactéricide, fongicide, virucide, mycobactéricide et sporicide ; elle concerne les dispositifs médicaux qui pénètrent dans des tissus ou des cavités stériles

## ↳ Procédure de nettoyage et de désinfection (Coterehos, 1997)

### ⌘ Procédure usuelle

L'idéal pour ces structures est de disposer d'un appareil automatique de nettoyage et de désinfection, de type semi-professionnel.

A défaut, on peut utiliser un lave-vaisselle de type domestique, en veillant à ne pas mélanger les biberons et le petit matériel annexe de préparation avec tout autre matériel. Il faut alors utiliser un cycle complet (haute température, au moins égale à 65°C, et séchage impératif) pour les biberons.

Les biberons doivent être vidés de leur éventuel contenu résiduel, rincés à l'eau du réseau avant d'être mis dans le lave-vaisselle. Leur immersion dans de l'eau contenant un détergent type liquide-vaisselle peut se justifier dans le cas d'un délai d'attente avant la mise dans le lave-vaisselle.

### ⌘ Procédures particulières

En structure d'accueil de la petite enfance, les enfants accueillis sont en bonne santé et uniquement exposés au risque infectieux de toute collectivité : il s'agit d'un risque infectieux de bas niveau. Il n'y a donc pas lieu, dans ces structures, de stériliser les biberons.

Il n'est pas non plus justifié d'utiliser :

- Les procédés chimiques dits de stérilisation, (par exemple de type chloré), qui exigent des contraintes de temps et d'organisation, et utilisent un produit désinfectant susceptible d'être instable ;
- Les dispositifs à micro-ondes ou les « stérilisateur » du commerce. En effet, les caractéristiques techniques de ces derniers ne leur permettent pas, au sens de la normalisation européenne (CEN) ou française (AFNOR), d'être qualifiés de procédés de stérilisation. En l'absence de données concernant la reproductibilité de ces procédés (en ce qui concerne leurs paramètres d'activité, le maintien de la température et/ou la production de la vapeur), ils sont également déconseillés.

## δ Entretien des locaux (Coterehos, 1997)

### ⌘ Plan de nettoyage et de désinfection

Quelle que soit la structure et selon la réglementation, un plan de nettoyage et de désinfection est défini par écrit.

Il précise pour tous les locaux et matériels, les modalités d'entretien : fréquence, modalités d'utilisation de chaque produit, nécessité ou non de rinçage, identification du responsable de l'entretien pour chaque secteur, et modes de contrôles.

Une procédure d'entretien est nécessaire pour les surfaces et les sols des divers locaux de la biberonnerie. Cet entretien comporte un nettoyage et une désinfection (bionettoyage).

### ⌘ Equipement

L'entretien requiert un équipement spécifique à ce secteur comportant un chariot d'entretien stocké dans un local utilitaire en dehors de la zone de préparation :

- ⌘ Pour l'entretien des sols : balai-trapèze et gazes à usage unique, balai articulé et système rasant (entretenus en blanchisserie), 2 seaux de 8 litres ;
- ⌘ Pour l'entretien des surfaces : des chiffonnettes à usage unique (ou lavées à chaque utilisation en machine à laver ou en blanchisserie) et des produits d'entretien : détergent-désinfectant homologué pour usage alimentaire.

## **b Personnels**

### *α Qualification*

La qualification est une part importante du bon fonctionnement de la biberonnerie. Le personnel doit accéder à une formation continue à l'hygiène alimentaire, adaptée aux contraintes organisationnelles et aux besoins de chaque poste de travail. Les experts de l'Afssa recommandent de promouvoir la formation du personnel aux bonnes pratiques d'hygiène alimentaire.

Une formation d'adaptation au poste de travail doit être dispensée le cas échéant :

- ☒ Diététiciennes, puéricultrices, ou infirmières et/ou,
- ☒ Educatrices de jeunes enfants,
- ☒ Auxiliaires de puériculture (idéalement) ou aides-soignantes et/ou,
- ☒ Agents hospitaliers ou agents de service intérieur.

Un responsable de proximité, spécialisé, doit être identifié pour permettre la mise en œuvre effective des bonnes pratiques de préparation et de conservation des préparations nutritionnelles (American Dietetic Association, 2005).

### *β Tenue vestimentaire (Turck et al., 2005)*

#### ☞ Principe

La propreté corporelle et le port de vêtements de travail adéquats et propres constituent les fondements de la tenue de base. De couleur claire, celle-ci comporte des manches courtes et doit être changée tous les jours. Le port de chaussures de service lavables est recommandé.

En secteur propre ou protégé, la tenue de travail est revêtue d'une tenue de protection à usage unique (systématiquement enlevée et jetée lors de toute sortie du secteur).

Les règles d'hygiène élémentaires sont les suivantes ;

- ☒ Tenue à manches courtes,
- ☒ Cheveux propres, courts ou attachés,
- ☒ Absence de montre et de bijoux (mains et poignets),
- ☒ Ongles courts et dépourvus de vernis.

#### ☞ Composition

La tenue de protection se compose :

- ⌘ d'une blouse de type « casaque » (sans ouverture sur le devant),
- ⌘ d'une coiffe ou d'un calot enveloppant la totalité de la chevelure,
- ⌘ d'un masque (de type masque de soins) recouvrant la bouche et le nez.

#### ☞ Précautions particulières

Les masques doivent être changés toutes les 3 heures et chaque fois que l'agent a quitté la pièce protégée.

En cas de lésions cutanées, le port de gants à usage unique (en boîtes distributrices) est recommandé lors de la préparation des biberons. Le lavage des mains s'impose avant et après avoir revêtu la tenue vestimentaire à usage unique.

La tenue de protection doit être également portée par toute personne étrangère à ce secteur.

Il convient de limiter les sorties et les entrées des personnes de ce secteur propre ou protégé, ainsi que le nombre de personnes ayant accès à ce secteur.

**c Cas particulier du domicile (Turck *et al.*, 2005)**

La préparation du biberon doit se faire extemporanément pour chaque repas (Agostoni *et al.*, 2004).

***α Préparation du biberon***

La préparation du biberon est réalisée dans un endroit propre, sur un plan de travail préalablement nettoyé. Ce plan de travail ne doit pas être situé à proximité de l'emplacement où l'enfant est changé (Turck *et al.*, 2005).

***β Conservation***

Le biberon reconstitué, s'il n'est pas consommé immédiatement par l'enfant, doit être conservé impérativement au réfrigérateur à une température inférieure ou égale à 4°C, pendant une durée n'excédant pas 30 heures (Turck *et al.*, 2005).

Les experts de l'ESPGHAN conseillent de ne pas conserver les restes des biberons. Il convient également de ne pas conserver le lait reconstitué dans un récipient chaud. Ils proposent de garder de l'eau chaude seule dans un thermos, et de la mélanger avec la poudre juste avant de nourrir l'enfant (Agostoni *et al.*, 2004).

Le réfrigérateur doit être lavé au moins une fois par mois avec de l'eau savonneuse, rincé à l'eau claire et désinfecté à l'eau javellisée (reconstituée par ajout de 5 cuillères à soupe d'eau de Javel du commerce prête à l'emploi à 9° chlorométriques dans 1 litre d'eau). L'utilisation du vinaigre blanc (parfois recommandée par certains fabricants de réfrigérateurs) ne se justifie que pour détartrer et désodoriser l'intérieur du réfrigérateur (Turck *et al.*, 2005).

***χ Nettoyage et désinfection***

Après utilisation, le biberon est vidé de son éventuel contenu résiduel, rincé à l'eau froide et lavé en lave-vaisselle en utilisant un cycle spécifique complet (haute température à 65°C au minimum et séchage impératif). Les bagues, les capuchons et les tétines en silicone peuvent également être mis au lave-vaisselle.

Les tétines en caoutchouc ne peuvent pas être mises au lave-vaisselle ; elles sont rincées et nettoyées minutieusement avec un écouvillon propre en les retournant.

En l'absence de lave-vaisselle, après utilisation, le biberon et les annexes sont rincés à l'eau froide et nettoyés par immersion dans de l'eau additionnée de produit détergent (liquide-vaisselle) avec un écouvillon propre, puis rincés. Le biberon et ses annexes doivent être mis à sécher. L'utilisation du torchon est proscrite.

D'une façon générale, à domicile, il n'y a pas lieu de stériliser les biberons. Il n'y a donc pas lieu d'utiliser les procédés chimiques dits de stérilisation, ni les dispositifs à micro-ondes, ni les « stérilisateur » du commerce. Les caractéristiques techniques de ces derniers ne leur permettent pas, au sens de la normalisation européenne (CEN) ou française (AFNOR), d'être qualifiés de procédés de stérilisation (Turck *et al.*, 2005).

### 3. Préparation des biberons

Il serait intéressant d'établir des directives écrites pour la préparation et la conservation des biberons dans les structures concernées, et leur installation contrôlée (Agostoni *et al.*, 2004).

#### a Conséquences nutritionnelles des traitements thermiques des préparations lactées

##### *α Introduction*

Le lait est le seul aliment conçu pour et dédié à la nutrition du jeune mammifère. C'est un produit extrêmement complexe (probablement plus de 100.000 espèces moléculaires) qui apporte non seulement les nutriments nécessaires à la croissance et au développement physiologique du jeune, mais aussi les éléments propres à assurer la défense de son organisme contre les multiples agressions post-natales du milieu environnemental.

Dans une première approche très schématique, on peut considérer que le lait est une solution aqueuse de particules (cellules somatiques, globules de matière grasse, bactéries et micelles de caséine), de macromolécules (protéines majeures et mineures du lactosérum, enzymes), de molécules diverses (lactose et autres sucres, hormones, peptides, acides aminés, urée, nucléotides, vitamines, etc.) et de sels minéraux.

L'animal producteur n'étant pas élevé en conditions aseptiques, le lait produit ne peut être stérile et, sauf dans le cas de l'allaitement direct, le lait doit subir des traitements technologiques pour assurer à celui qui le consomme une sécurité d'hygiène maximale.

Tous ces traitements technologiques (chauffage, refroidissement, séparation centrifuge, concentration, déshydratation) modifient peu ou prou les équilibres physico-chimiques du lait tels qu'ils existent à 37°C. Ils peuvent aussi avoir des effets dommageables sur l'activité biologique de nombreux composants par l'intermédiaire de changements structuraux. Ces traitements peuvent aussi entraîner, s'ils ne sont pas réalisés dans des conditions parfaitement contrôlées et maîtrisées, tant au niveau des équipements que de l'environnement, des post-contaminations délétères (Turck *et al.*, 2005).

##### *β Traitements thermiques des préparations lactées*

L'avantage indéniable apporté par les traitements thermiques sur la qualité microbiologique des préparations lactées est nuancé par certaines conséquences délétères sur le plan nutritionnel, en particulier en ce qui concerne la post-stérilisation des laits infantiles liquides.

##### ☞ Types de lait

Trois types de laits sont théoriquement disponibles pour l'alimentation des prématurés, des nouveau-nés et des nourrissons :

- \* Le lait en poudre,
- \* Le lait liquide UHT (Ultra Haute Température), pour lequel le traitement thermique stérilisateur est appliqué en fin de processus de fabrication, juste avant le remplissage aseptique du récipient (emballages à base d'aluminium recouvert de carton, ou bouteilles en élastomère),
- \* Le lait liquide post-stérilisé ou autoclavé pour lequel le traitement thermique stérilisateur est appliqué après le remplissage et la fermeture du récipient (canettes, bouteilles).

### ☞ Traitements thermiques

Les principales étapes des traitements thermiques sont résumées dans le tableau 25.

**Tableau 25: Traitement thermique des laits en poudres et laits liquides pour nourrissons d'après Turck et al. (2005)**

Traitements thermiques communs	Traitement thermique spécifique	Type de lait
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ecrémage et standardisation en matière grasse à 60°C, durée variable</li> <li>• Homogénéisation du lait de 60 à 75°C pendant 20 secondes</li> <li>• 1<sup>ère</sup> pasteurisation (au minimum 72°C pendant 15 secondes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-chauffage souvent à 95°C pendant 60 secondes</li> <li>• Concentration par évaporation (58 à 70°C pendant 60 secondes)</li> <li>• Séchage de 65 à 70°C pendant un temps variable</li> </ul>	Lait en poudre
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-chauffage à 90°C pendant 60 secondes</li> <li>• Chauffage à 138-145°C pendant 4 à 8 secondes avant le remplissage aseptique du récipient</li> </ul>	Laits liquides UHT
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-chauffage à 90°C pendant 60 secondes ou traitement UHT avant le remplissage du récipient</li> <li>• Autoclavage à 115-120°C pendant 10 à 15 minutes du récipient fermé (post-stérilisation)</li> </ul>	Laits liquides autoclavés

En pratique, il est difficile de connaître les traitements thermiques appliqués aux laits liquides disponibles pour l'alimentation des nourrissons, ces renseignements n'étant pas disponibles sur les emballages.

Il faut donc inclure des mises en gardes sur les paquets de poudres de lait et les autres substituts de lait maternel qu'ils peuvent être contaminés par *E. sakazakii* et autres microorganismes (Arts, 2004).

### χ Effets des traitements thermiques (Turck et al., 2005)

En introduction, il doit être précisé que les traitements thermiques ont des effets qui se cumulent. En conséquence, la modification nutritionnelle consécutive à ces opérations résulte non pas uniquement du traitement thermique principal mais bien de l'historique thermique complet du procédé de fabrication.

Il doit également être indiqué que le couple temps-température n'est pas une indication suffisante pour évaluer l'effet délétère d'un traitement thermique. L'équipement mis en œuvre peut avoir un effet significativement différent : par exemple, l'application d'un traitement UHT dit indirect (utilisation d'un échangeur) dénature beaucoup plus de protéines de lactosérum qu'un même traitement UHT dit direct (injection de vapeur dans le lait).

### ☞ Effets sur *E. sakazakii*

*E. sakazakii* ne survit pas au procédé de pasteurisation (Nazarowec-White et Farber, 1997a ; Nazarowec-White et al., 1999 ; Iversen et al., 2004b ; Edelson-Mammel et Buchanan, 2004). Il est donc certain que la contamination des poudres de lait se fait après ce procédé. Il faut donc prévenir cette contamination, comme nous l'avons dans le premier paragraphe de cette quatrième partie.

---

## ☞ Effets sur les protéines du lait

### ↳ Immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) du lait constituent le groupe de protéines le plus sensible aux traitements thermiques.

La pasteurisation (62,5°C-30 minutes ou 72°C-15 secondes) inactive 30% des IgA, 100% des IgM et 33% des IgG. Cette sensibilité thermique des Ig rend hautement probable qu'elles soient totalement inactivées dans les préparations lactées, qu'elles soient en poudre ou liquides UHT, du fait du cumul des traitements thermiques évoqué ci-dessus.

Une solution pourrait être l'apport d'Ig actives, opération réalisée industriellement dans plusieurs pays, par un mélange à sec de poudres infantiles avec de la poudre de colostrum, épurée sur le plan microbien par diverses technologies mais le plus souvent par microfiltration sur membrane.

### ↳ Protéines majeures

#### ⌘ $\beta$ -lactoglobuline

Le chauffage du lait à une température supérieure à 37°C initie la réaction de Maillard de la protéine la plus réactive qui est la  $\beta$ -lactoglobuline, protéine majeure du lactosérum de lait de vache (mais absente du lait humain). Cela provoque un effet délétère sur la qualité nutritionnelle (d'autant plus que le lactose participe également à cette réaction).

#### ⌘ $\alpha$ -lactalbumine

La même réaction de lactosylation est observée avec une autre protéine importante du lactosérum : l' $\alpha$ -lactalbumine (source majeure d'apport de tryptophane) mais avec un degré de réactivité nettement inférieur, ce qui n'affecterait pas la qualité nutritionnelle de cette protéine.

#### ⌘ Caséine $\kappa$

Tout traitement thermique du lait induit la formation de liaisons covalentes de type disulfure (S-S) entre la caséine  $\kappa$  et la  $\beta$ -lactoglobuline. L'aptitude à la coagulation par la chymosine de l'estomac s'en trouve diminuée, mais la formation de ce complexe au niveau de la micelle de caséine n'aurait pas d'effet délétère sur la qualité nutritionnelle.

### ↳ Protéines mineures

La bioactivité des protéines mineures du lait peut être affectée par les traitements thermiques. Si la pasteurisation a peu d'effet sur la bioactivité de la lactoferrine bovine (perte inférieure à 5%), un traitement thermique à 137°C pendant 8 secondes entraîne sa dénaturation totale. La sensibilité thermique de la lactoferrine humaine serait toutefois supérieure. La pasteurisation entraînerait une perte de bioactivité de 67%.

Un traitement thermique de 90°C induirait une perte d'au moins 50% de la bioactivité de la Folate Binding Protein (FBP), qui a un rôle essentiel dans la synthèse des bases constitutives de l'ADN. Par contre, il semblerait que la cystatine C, qui inhibe la résorption osseuse par action sur la cathepsine L, soit thermorésistante. Il en serait de même pour le kininogène (inhibiteur des ostéoclastes) et le TGF- $\beta$  (facteur de croissance et de régulation cellulaire).

## ☞ Effets sur les acides aminés

Il ne semble pas qu'il y ait des effets notoires sur les acides aminés.

### ☞ Effets sur le lactose

Le traitement thermique du lait induit initialement la dégradation du lactose avec formation d'isomère et d'acide formique.

Toutefois, le principal effet anti-nutritionnel d'un traitement thermique du lait impliquant le lactose est la réaction de Maillard (brunissement non enzymatique).

### ☞ Effets sur les minéraux

Les minéraux du lait sont en équilibre dynamique entre eux (formes ionisée et non ionisée), et entre phase soluble et phase colloïdale. Le traitement thermique du lait à une température supérieure à 75°C a pour conséquence une co-précipitation du citrate tricalcique et du phosphate tricalcique du lait. Cette insolubilisation est partiellement réversible.

### ☞ Effets sur les vitamines

Le traitement thermique du lait affecte peu la biodisponibilité des vitamines liposolubles mais affecte celle des vitamines hydrosolubles. La pasteurisation (72°C-20 secondes) induirait une perte inférieure à 10% pour la thiamine, les vitamines B6 et B12 et l'acide folique, mais cette perte atteindrait 25% pour la vitamine C. Un traitement de stérilisation (120°C-10 minutes) induirait pour ces mêmes vitamines des pertes variant entre 15 et 100%. Quant au traitement UHT (145°C-3 secondes), les pertes constatées seraient inférieures à 30%.

### ☞ Evaluations nutritionnelles des différentes formes de laits pour nourrissons

Sur le plan clinique, il n'existe pas d'étude contrôlée et randomisée comparant la valeur nutritionnelle des différentes formes de lait chez le prématuré, le nouveau-né et le nourrisson. Les laits en poudre ont fait l'objet de nombreux travaux et, en dépit des traitements thermiques subis, constituent de fait le standard de référence.

Les études disponibles suggèrent que la valeur nutritionnelle des laits UHT serait équivalente à celle des laits en poudre en ce qui concerne l'absorption et l'utilisation des protéines et des minéraux.

La majorité des laits liquides actuellement disponibles pour les prématurés et les nouveau-nés sont des laits conditionnés en bouteilles de verre ou en canettes, autoclavés, ayant subi une « agression » thermique relativement importante. Les études expérimentales et cliniques concernant ces types de lait montrent une réduction de l'absorption et de l'utilisation des protéines ainsi qu'une réduction de la biodisponibilité des minéraux et des oligo-éléments.

## δ *Recommandations*

### ☞ Aux fabricants

#### ☞ Sur un plan nutritionnel

Il est recommandé aux fabricants de :

- ⌘ Minimiser, autant que faire se peut, l'accumulation successive des traitements de chauffage lors des procédés de fabrication et utiliser, chaque fois que cela est possible, des traitements alternatifs athermiques,
- ⌘ Utiliser, dans leur formulation, des ingrédients obtenus eux aussi par des traitements athermiques,
- ⌘ Préciser sur l'emballage les processus thermiques utilisés (type UHT ou post-stérilisation),

---

⌘ Réaliser des études cliniques contrôlées et randomisées afin d'évaluer l'impact des traitements thermiques et des processus technologiques utilisés sur la valeur nutritionnelle des laits liquides (Turck *et al.*, 2005).

↪ Sur un plan microbiologique

Dans le cadre de la lutte spécifique contre *E. sakazakii*, il faut éviter la contamination des poudres de lait après l'étape de pasteurisation. Les recommandations ont été données dans le premier paragraphe de la partie portant sur la prévention des infections par *E. sakazakii*.

☞ Aux professionnels de santé

L'attention des professionnels de santé doit être attirée sur quelques éléments.

↪ Chez l'enfant à terme

Chez l'enfant à terme, les avantages de sécurité microbiologique et de commodité d'utilisation de laits liquides pendant une durée de quelques jours en maternité sont supérieurs aux éventuels inconvénients nutritionnels (Turck *et al.*, 2005).

↪ Chez le nouveau-né prématuré

⌘ *D'un point de vue nutritionnel*

Chez le prématuré, en raison de leur utilisation prolongée, les interrogations sur la valeur nutritionnelle des laits liquides actuellement disponibles sur le marché ayant subi une post-stérilisation importante (présentant une coloration caramélisée traduisant la présence de produits de la réaction de Maillard), amènent à conseiller l'utilisation de laits liquides adaptés aux prématurés ayant subi un procédé UHT, et à défaut, dans l'attente d'un développement plus généralisé de ces formules, de maintenir l'utilisation des laits en poudre en s'attachant particulièrement aux règles d'hygiène nécessaires à leur préparation (Turck *et al.*, 2005).

⌘ *D'un point de vue sanitaire*

Il faut rappeler aux cliniciens que les poudres de lait ne sont pas stériles, et peuvent contenir des pathogènes opportunistes tels qu'*E. sakazakii*. Dans cette optique, il peut être intéressant de choisir des alternatives aux poudres de lait (Himmelright *et al.*, 2002).

Certains auteurs pensent que l'utilisation de formule stérilisée liquide pourrait être une solution. Cela présente le désavantage de limiter de manière importante la gamme nutritionnelle disponible, et il faut, dans une unité de soins intensifs, des petites quantités et des recettes de concentration variables, pour s'adapter aux besoins des patients. C'est également une solution plus coûteuse et nécessitant des capacités de stockage et de transport supérieures. Cependant, les produits liquides stérilisés permettent d'éviter les contaminations intrinsèques, puis extrinsèques lors de la réhydratation (Noriega *et al.*, 1990 ; Van Acker *et al.*, 2001).

La FAO (2005) conseille également l'utilisation de formules liquides stérilisées.

☞ Critères microbiologiques

Le code des pratiques d'hygiène pour les aliments destinés aux nourrissons et enfants de la FAO (Food and Agriculture Organisation ; Codex Alimentarius CAC/RCP 21-1979) recommande un minimum de 4 sur 5 échantillons avec moins de 3 coliformes par grammes et un maximum d'un échantillon sur 5 avec plus de 3 et 20 ou moins coliformes par gramme.

Lors des crises dues à *E. sakazakii*, ces critères n'ont jamais été dépassés.

Muytjens *et al.* (1988) ont trouvé dans leur étude des taux de contamination des poudres de lait allant de 0,36 à 66,00 CFU/100 g., avec les *Enterobacteriaceae* n'excédant pas 1 CFU/g. De même, Simmons *et al.* (1989) ont trouvé 8 cellules d'*E. sakazakii* par 100 grammes dans une boîte de poudre de lait ouverte ayant causé une crise. D'autres études ont été menées pour déterminer le taux de contamination des poudres de lait, et sont décrites dans la partie correspondante. Dans aucun cas, le taux de contamination était supérieur aux normes prescrites par la FAO.

Ainsi, Van Acker *et al.* (2001) et la FAO (2005) recommandent l'utilisation de normes plus drastiques concernant la qualité microbiologique des poudres de lait (moins d'un coliforme par gramme dans tous les échantillons en Belgique). De même, Iversen et Forsythe (2003) proposent une norme de moins d'une bactérie entérique par 25 grammes. Cette norme est déjà appliquée pour *Salmonella*.

## **b** Laits de femme ou de mère

Le lait de femme est l'aliment naturel du nouveau-né. L'allaitement direct au sein doit toujours être privilégié.

En cas d'impossibilité d'allaitement direct, deux méthodes de recueil du lait maternel sont possibles : soit l'expression manuelle, soit l'utilisation d'un tire-lait manuel ou électrique (chaque marque propose des tire-lait avec biberons adaptés). La collecte du lait de femme doit être favorisée chaque fois que l'enfant ne peut pas être allaité directement.

Les conditions de recueil et de conservation du lait de femme doivent être adéquates, conformes aux règles d'hygiène, car une contamination microbiologique est possible avec un risque non négligeable chez les enfants les plus à risque comme les grands prématurés. Cependant, quand le nourrisson est né à terme, sans antécédents, et qu'il est en bonne santé et nourri au domicile, le risque pour la santé de l'enfant lié à une éventuelle contamination est estimé faible (Turck *et al.*, 2005).

### *α* **Risque d'infection à *E. sakazakii***

Aucun cas d'infection due à *E. sakazakii* et transmise par du lait humain n'a été décrit. Cependant, étant donné les caractéristiques de résistance de la bactérie et sa capacité à former des biofilms, des contaminations croisées pourraient survenir.

Des cas de crises d'infections néonatales provoquées par *E. sakazakii*, dues à la contamination extrinsèque de la poudre de lait par un mixeur ont été rapportés (Simmons *et al.*, 1989 ; Clark *et al.*, 1990 ; Noriega *et al.*, 1990 ; Bar-Oz *et al.*, 2001 ; Block *et al.*, 2002). Il convient donc de faire tout particulièrement attention au matériel utilisé pour la collecte du lait de femme (tire-lait), la conservation et le transport (biberons).

Le lait provenant du lactarium peut être en poudre, et doit être reconstitué. Les mises en gardes émises sont donc renforcées dans ce cas. Le risque de contamination croisée est augmenté du fait de l'utilisation de matériel commun (mixeur).

### *β* **Devenir du lait**

Le lait recueilli par une mère est destiné à son propre enfant pour être consommé ultérieurement :

- Au domicile ;
- Dans une structure d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants) ;
- Dans un établissement de santé (unité de soins, service de néonatalogie) ;
- Après être passé par un lactarium.

---

Le lait d'une mère est destiné exclusivement à son propre enfant, sauf s'il passe par un lactarium et répond aux exigences des textes régissant le don de lait.

Lorsqu'une mère a plus de lait que nécessaire pour nourrir son enfant, elle peut faire don de ce lait à un lactarium selon les textes régissant le don du lait. Dans cette optique, les experts du groupe de travail de l'Afssa conseillent de modifier la circulaire DGS/SP2 n°97/785 du 17 décembre 1997 relative au don personnalisé d'une mère à son enfant hospitalisé. Cette circulaire stipule que lorsque le lait tiré par la mère ne peut être donné à l'enfant dans les 12 heures suivant son recueil, il faudra procéder à sa pasteurisation. Il semble qu'il serait possible de stocker du lait de mère pendant un maximum de 48 heures dans une enceinte réfrigérée à une température inférieure ou égale à 4°C avant sa consommation par l'enfant.

Dans tous les cas, le recueil du lait doit se faire dans des conditions d'hygiène satisfaisantes (cf. paragraphe suivant). Ces conditions doivent être soigneusement expliquées aux mères (Turck *et al.*, 2005).

#### ☞ Cas particulier du lait de mère recueilli et utilisé immédiatement

Si l'allaitement direct au sein n'est pas possible, le lait recueilli par la mère, soit dans une structure d'accueil de la petite enfance, soit dans un établissement de santé, peut être donné directement à son propre enfant à condition :

- ⌘ Que le temps entre le début du recueil et la fin de l'utilisation (fin de la consommation du biberon) de ce lait laissé à température ambiante n'excède pas 4 heures ;
- ⌘ Que des conseils d'hygiène de recueil (cf. paragraphe correspondant) aient été donnés à la mère et qu'on se soit assuré qu'ils aient été correctement compris.

Il n'est pas conseillé de donner directement du lait d'une mère à son propre enfant en cas de grande prématurité (poids inférieur à 1500 g et/ou terme inférieur à 32 semaines) s'il y a risque d'infection à Cytomégalovirus (CMV) (mère ayant une sérologie CMV positive). Dans ce cas, le passage du lait par un lactarium est recommandé (Turck *et al.*, 2005).

#### ⌘ Lait provenant du domicile (Turck *et al.*, 2005)

##### ☞ Recueil à domicile

Les conditions de recueil doivent être soigneusement expliquées aux mères.

##### ☞ Hygiène corporelle

Avant toute manipulation, un lavage soigneux des mains (savon liquide) est indispensable. Outre cette étape indispensable, une douche quotidienne avec lavage des seins et des mamelons est recommandée.

##### ☞ Tire-lait

Les tire-lait sont une source potentielle de contamination et nécessitent un nettoyage soigneux et une désinfection : à chaque utilisation, laver soigneusement la téterelle et le flacon de recueil du lait avec du liquide-vaisselle et rincer. L'usage du lave-vaisselle avec un cycle amenant l'eau à 65°C est efficace et autorisé, mais ne dispense pas d'un lavage soigneux au préalable. Juste avant de tirer le lait, il est également recommandé de porter à ébullition la téterelle et le flacon de recueil dans une casserole d'eau. Pour faciliter leur refroidissement, il convient de vider l'eau chaude mais de ne pas rincer sous l'eau du robinet.

Les systèmes chimiques dits de stérilisation à froid ne sont pas recommandés.

### ↪ Stockage

Le lait recueilli, s'il doit être conservé, ne doit l'être que dans des flacons (ou biberons) en plastique polypropylène, en polycarbonate ou en verre.

En cas de conservation du lait, le contenant de conservation peut ne pas être stérile, à condition qu'il soit propre et sec (nettoyage au lave-vaisselle domestique à 65°C minimum et cycle complet).

#### ⌘ Biberon de conservation

Si le volume souhaité de lait à conserver est recueilli en une seule fois, verser le lait recueilli à chaque extraction dans le biberon (appelé dès lors biberon de conservation), fermer ce biberon (obturateur et capuchon) et placer ce biberon directement dans un réfrigérateur à une température inférieure ou égale à 4°C.

#### ⌘ Biberon de recueil

Si le volume souhaité de lait n'est pas recueilli en une seule fois, verser le lait recueilli à chaque extraction dans un biberon dit de recueil, le refroidir et verser le lait refroidi dans le biberon de conservation, refermer le biberon (obturateur et capuchon) et placer le biberon dans un réfrigérateur à une température inférieure ou égale à 4°C tant que le volume souhaité n'est pas atteint.

#### ⊕ Conservation du lait à domicile

Lorsque le lait recueilli par une mère n'est destiné qu'à la consommation de son propre enfant à son domicile, il est recommandé de noter avant toute conservation la date et l'heure du 1er recueil de lait sur le biberon (indication pour la durée de conservation).

Si le lait recueilli doit être amené dans une structure d'accueil de la petite enfance, dans une structure de soins ou au lactarium, avant toute conservation, noter le nom et le prénom de l'enfant, en plus de la date et de l'heure du 1er recueil de lait sur le biberon.

Il existe deux possibilités de conservation :

#### ↪ Conservation au réfrigérateur

Le lait doit être mis dans un réfrigérateur immédiatement après recueil.

Le lait peut être stocké à une température inférieure ou égale à 4°C (qui doit être vérifiée) pendant une durée de conservation n'excédant pas 48 heures.

#### ↪ Conservation au congélateur

Si l'on souhaite conserver le lait plus de 48 heures, il convient de le congeler (la congélation doit alors avoir lieu aussi rapidement que possible pour prévenir la peroxydation lipidique, et préserver les vitamines).

Le lait stocké au congélateur (-18°C) peut être conservé pendant 4 mois sans conséquence nutritionnelle délétère.

Quelques recommandations sont à respecter :

- ⌘ Le lait décongelé ne doit pas être recongelé.
- ⌘ Il ne doit pas être placé dans un freezer (bac à glaçons du réfrigérateur), car la température n'y est pas assez basse.
- ⌘ Il ne faut pas ajouter de lait de femme fraîchement recueilli à un biberon de lait congelé.
- ⌘ Il faut veiller à ne remplir le biberon qu'aux trois-quarts en prévision de l'augmentation du volume provoqué par la congélation.

## Transport

Il convient d'éviter toute rupture de la chaîne du froid.

Que le lait soit réfrigéré à une température inférieure ou égale à 4°C ou congelé, il doit être transporté du domicile au lieu de consommation dans une glacière ou dans un sac isotherme avec pack eutectique (pack de glace, etc.).

## Réception sur le site de consommation

Dès l'arrivée sur le site de consommation, vérifier que les biberons de lait ont été correctement identifiés (nom et prénom de l'enfant, date et heure du 1er recueil), et placer les biberons, soit dans une enceinte réfrigérée à une température inférieure ou égale à 4°C, soit au congélateur.

Les conditions de réchauffement (décrites ci-dessous) et d'utilisation lors de la consommation par l'enfant, doivent être strictement respectées (Turck *et al.*, 2005).

## Conditions d'utilisations sur le site de consommation

Ces conditions tiennent compte du site où est utilisé le lait :

### Cas du lait utilisé pour son propre enfant, en dehors de toute structure d'accueil

Ceci est considéré comme « à domicile ». Il convient de respecter les conditions de réchauffement ci-dessous.

### Cas du lait utilisé dans une structure d'accueil de la petite enfance, dans une unité de soins (en dehors d'un service de néonatalogie)

Le lait d'une mère recueilli et conservé moins de 48 heures dans les conditions décrites ci-dessus peut être donné directement à son enfant.

Si les conditions de recueil et de transport ne sont pas fiables ou si le recueil date de plus de 48 heures, le lait doit passer par un lactarium pour y être pasteurisé.

### Cas du lait utilisé dans un service de néonatalogie

La conservation du lait dans des flacons (biberons) de conservation stériles est recommandée lorsque ce lait est à destination d'un service de néonatalogie (enfant prématuré) ou d'un lactarium.

Le lait d'une mère, recueilli et conservé moins de 48 heures dans les conditions décrites ci-dessus, peut être donné directement à son enfant (en dehors de contre-indication médicale due à l'état de la mère ou de l'enfant). Il est de la responsabilité du service de néonatalogie de s'assurer que les conseils de recueil et de transport ont été donnés, compris et respectés (un examen bactériologique de contrôle du lait est souhaitable pour s'assurer initialement de la qualité du lait). Si ces conditions de recueil, de conservation et de transport ne sont pas fiables ou si le recueil date de plus de 48 heures, le lait doit passer par un lactarium pour y être pasteurisé.

En cas de grande prématurité, il est rappelé qu'il n'est pas recommandé de donner directement le lait sans s'être assuré de l'absence de risque de transmission du CMV.

### Cas du lait apporté congelé

Après décongélation, le lait, gardé à une température inférieure ou égale à 4°C sans rupture de la chaîne du froid, doit être utilisé dans les 24 heures.

Si le lait décongelé a été laissé à température ambiante, il doit être utilisé dans un délai d'une heure suivant la décongélation.

⌘ En cas de substances ajoutées dans le lait

Dans ce cas, les mêmes précautions que celles recommandées pour les préparations de laits en poudre doivent être respectées et s'ajoutent aux conditions de préparation du lait de femme.

δ Lait provenant de lactarium

Selon le lactarium, le lait provenant de lactarium peut se présenter sous une forme congelée ou lyophilisée.

En cas de lyophilisation, la reconstitution sera effectuée dans les mêmes conditions que pour les préparations en poudre.

En cas de lait congelé provenant du lactarium (lait pasteurisé), la décongélation peut s'effectuer en quelques heures en plaçant le biberon dans une enceinte à une température inférieure ou égale à 4°C (décongélation lente) ou par un réchauffement rapide dans de l'eau. La préparation et l'utilisation ultérieure du biberon doivent impérativement respecter la chaîne du froid.

En cas de substances ajoutées dans le lait, les mêmes précautions que celles recommandées pour les préparations de laits en poudre doivent être respectées (Turck *et al.*, 2005).

Il est rappelé le risque supplémentaire encouru concernant *E. sakazakii*, du fait de la possibilité de contamination extrinsèque de la poudre de lait par le matériel de reconstitution.

ε En cas de réchauffement

Le réchauffement du biberon conservé à une température inférieure ou égale à 4°C doit être rapide pour atteindre la température souhaitée (par exemple la température ambiante). Sa consommation doit intervenir immédiatement ou au maximum dans les 60 minutes qui suivent la sortie de l'enceinte réfrigérée.

Le réchauffement du biberon doit être effectué au domicile soit à l'aide d'un bain-marie, soit d'un chauffe-biberon (cf. conditions d'utilisation des systèmes de réchauffement utilisant de l'eau), en aucun cas en le laissant à température ambiante, en raison du risque de développement microbien.

En pratique hospitalière, il n'est pas conseillé d'utiliser des systèmes de réchauffement utilisant de l'eau (bain-marie, chauffe-biberon avec eau). Si réchauffement il y a, il faut privilégier un chauffe-biberon à sec.

Le réchauffement du biberon au four à micro-ondes est contre-indiqué (Turck *et al.*, 2005).

ζ Eau

De manière générale, il n'est pas nécessaire de recourir au chauffage de l'eau pour la préparation des biberons (Turck *et al.*, 2005). Certains (FAO, 2005) conseillent l'utilisation d'eau chaude (70 à 90°C).

α Recommandations au domicile

⊕ Eau de distribution publique

Il est possible d'utiliser l'eau de distribution publique sous réserve de certaines conditions.

Après ouverture du robinet, un temps d'écoulement (quelques secondes) de l'eau est respecté avant de la recueillir. L'eau froide est exclusivement utilisée (attention à la position du mitigeur), car au-delà de 25°C<sup>a</sup>, l'eau peut être plus chargée en micro-organismes et en sels minéraux.

La concentration de l'eau en plomb ne doit pas dépasser 10 µg/L pour la préparation des biberons. Dans les habitats anciens (antérieurs à 1948) où les canalisations peuvent être encore en plomb, ce point mérite une attention particulière<sup>b</sup>. La composition minérale de l'eau distribuée est compatible avec les critères de qualité pour les eaux embouteillées destinées à la consommation des nourrissons notifiés dans l'avis de l'Afssa du 2 décembre 2003<sup>c</sup>.

Il n'est pas recommandé d'utiliser de l'eau ayant subi une filtration (carafe filtrante par exemple ou tout autre type de traitement de filtration à domicile) ou ayant subi un adoucissement car sa charge microbienne peut être excessive.

Le robinet, le plan de travail (le plus souvent l'évier) et les accessoires situés à proximité utilisés font l'objet d'un entretien régulier (nettoyage, détartrage notamment pour le robinet, utilisation de produits détergents pour le reste ; Turck *et al.*, 2005).

#### ☞ Eau embouteillée

A défaut de pouvoir garantir la conformité de l'eau de distribution publique aux critères précités, il est recommandé d'utiliser de préférence une eau embouteillée. Il convient alors d'utiliser une eau minérale naturelle ou une eau de source répondant aux critères de qualité de l'avis de l'Afssa du 2 décembre 2003<sup>d</sup> (Afssa, 2003 et confère annexe)

Les caractéristiques de la minéralisation peuvent avoir des conséquences sur l'absorption digestive, sur l'état de santé de l'enfant ou sur la préparation des poudres de lait (WHO, 2005).

L'utilisation d'eau gazeuse est déconseillée pour la préparation des biberons (Turck *et al.*, 2005).

#### ☞ Situations exceptionnelles

En l'absence d'eau potable ou d'eau embouteillée, l'eau bouillie et refroidie peut être utilisée (Turck *et al.*, 2005).

#### *β* Recommandations dans les structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants) et en unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés) (C)

#### ☞ Structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants)

Les recommandations sont les mêmes que pour le domicile (paragraphe ci-dessus).

#### ☞ Unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés)

Il est recommandé d'utiliser une eau embouteillée : eaux minérales naturelles ou eaux de source répondant aux critères de qualité de l'avis de l'Afssa du 2 décembre 2003 (cf. annexe).

<sup>a</sup> Cette limite ne s'applique pas aux zones tropicales.

<sup>b</sup> On peut se reporter au dossier spécifique du ministère de la Santé sur ce sujet : <http://www.sante.gouv.fr>

<sup>c</sup> L'information sur la qualité des eaux est disponible auprès de la mairie ou de la Direction Départementale de Affaires Sanitaires et Sociales

<sup>d</sup> A l'heure où cette thèse est rédigée (août 2005), l'étiquetage des eaux embouteillées ne donne pas d'informations sur ces critères. Le label « eau convenant à l'alimentation des nourrissons » est défini par le code de la santé publique R1321-80. Une harmonisation entre les exigences précisées par le code de la santé publique R1321-80 et l'avis de l'Afssa du 2 décembre 2003 est nécessaire.

Les caractéristiques de minéralisation peuvent avoir des conséquences sur l'absorption digestive, sur l'état de santé de l'enfant ou sur la préparation des poudres de lait (WHO, 2005).

Les experts de l'Afssa recommandent :

- D'utiliser une eau réfrigérée (conservée en enceinte réfrigérée à une température inférieure ou égale à 4°C) ;
- De ne pas conserver une bouteille ouverte et réfrigérée au-delà de 24 heures ;
- De ne pas utiliser de l'eau de fontaine réfrigérante.

En conformité avec le guide technique de l'eau dans les établissements de santé (Ministère de la Santé, 2004), le stockage de ces eaux ne doit pas être réalisé dans des conditions susceptibles de dégrader la qualité du contenant et du contenu (exposition aux polluants, chocs, lumière, contaminations microbiennes externes, etc.).

*χ Recommandations en établissements de santé, centres thérapeutiques, pouponnières, avec une unité centralisée de préparation des biberons (H)*

#### *☪ Cas communs*

Les experts de l'Afssa recommandent d'utiliser :

- ⌘ Soit une eau embouteillée : les recommandations sont les mêmes que pour les collectivités pédiatriques type unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés), et les structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants) ;
- ⌘ Soit de l'eau bactériologiquement maîtrisée<sup>a</sup> répondant aux critères de qualité du guide technique de l'eau dans les établissements de santé (Ministère de la Santé, 2004).

La qualité de cette eau doit être obtenue soit après traitement chimique, soit après traitement physique de l'eau du réseau d'entrée dans l'établissement.

La microfiltration (porosité moyenne de 0,2 µm) au robinet est le procédé le plus classique. Les filtres utilisés peuvent être stérilisables et réutilisables, ou encore à usage unique.

Les contrôles microbiologiques et physico-chimiques doivent être effectués en fonction du système d'assurance-qualité mis en place dans l'établissement (fréquence minimale trimestrielle). Les systèmes de microfiltration à usage unique ne justifient pas de réaliser des contrôles bactériologiques dès lors que le procédé a été validé et que ses modalités d'utilisation sont régulièrement contrôlées (Turck *et al.*, 2005).

#### *☪ Cas particuliers*

##### *☞ Enfants immuno-déprimés et/ou contexte particulier et sur prescription médicale*

Le contexte particulier en cause peut être lié à l'enfant (immunodépression) ou à un contexte épidémique de pathologie possiblement liée à l'eau. Dans tous ces cas, les experts de l'Afssa conseillent d'utiliser des laits prêts à l'emploi sous forme liquide (Turck *et al.*, 2005).

---

<sup>a</sup> Une eau bactériologiquement maîtrisée a la préférence des hygiénistes car elle présente une qualité bactériologique supérieure à l'eau de distribution. Elle doit néanmoins répondre aux critères de minéralisation des eaux embouteillées formulés dans l'avis de l'Afssa du 2 décembre 2003

## ☞ Enfants prématurés et alimentation entérale

Si des laits prêts à l'emploi sous forme liquide ne sont pas disponibles, l'utilisation d'eau stérile pour la reconstitution des biberons est préférable pour les services de néonatalogie (enfants prématurés).

L'utilisation d'eau stérile (dénomination de la Pharmacopée) est soumise au respect d'une minéralisation compatible avec l'alimentation du nouveau-né ou du nourrisson (Turck *et al.*, 2005)

### d Reconstitution et traçabilité du biberon en dehors du domicile

L'objectif est d'assurer une préparation de qualité sur le plan microbiologique et nutritionnel du biberon de lait (en poudre ou prêt à l'emploi sous forme liquide) ou du biberon contenant du lait de femme ou de mère, préparé dans un local spécifique ou un office alimentaire.

#### α Reconstitution

Le mode idéal de reconstitution des biberons de préparations lactées à usage médical (ADDFMS) ou non, à partir d'une préparation en poudre ou prête à l'emploi sous forme liquide, est extemporané, c'est à dire que la reconstitution est faite immédiatement avant la consommation par l'enfant. Ceci devrait être le cas chaque fois qu'un biberon est préparé dans une unité d'hospitalisation, et devrait être la solution préférée en structure d'accueil de la petite enfance (Turck *et al.*, 2005).

La croissance bactérienne au cours de la préparation du lait reconstitué à base de poudre doit être évitée. Le lait reconstitué est en effet un excellent milieu de culture (Muytjens *et al.*, 1990).

#### ☞ Conditions techniques préalables à la préparation

Les conditions techniques ont été évoquées dans le paragraphe traitant des locaux et de l'équipement. Seules les prescriptions principales sont rappelées ici.

Il est recommandé d'avoir une :

- ⌘ Hygiène de la tenue : tenue de protection, coiffe cachant tous les cheveux, masque de soins ;
- ⌘ Hygiène des mains (ongles courts et sans vernis, absence de bijoux) : lavage simple des mains pendant 30 secondes avec un savon doux liquide ;
- ⌘ Hygiène du plan de travail : nettoyé et désinfecté selon le protocole défini avec les produits adéquats.

#### ☞ Préparation (Turck *et al.*, 2005)

Il est important de différencier d'une part les établissements de santé, les centres thérapeutiques spécifiques et les pouponnières qui bénéficient d'une pièce spécifique à la préparation des biberons, et d'autre part les unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés) et les structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants).

## ☞ Matériel et produits nécessaires

### ⌘ Matériel commun

Dans tous les types de structure, il faut :

- Un biberon muni de tétine, capuchon, et bague propres ;
- Un couteau (pour le lait en poudre) ou une paire de ciseaux (pour le lait prêt à l'emploi sous forme liquide) propres ;
- Une étiquette au nom de l'enfant avec la date de préparation du biberon ;

- Le lait en poudre (vérifier les dates de péremption et d'ouverture du produit : conservation 15 jours à un mois après ouverture selon les préconisations du fabricant) ou le lait prêt à l'emploi sous forme liquide (vérifier les dates de péremption après ouverture selon les préconisations du fabricant).

*λ Dans les établissements de santé, les centres thérapeutiques spécifiques et les pouponnières*

Au matériel précédent, il convient d'ajouter :

- Une balance de précision ;
- Un plateau en inox.
- Du matériel nécessaire à changer pour chaque nouveau lot de lait : des feuilles de papier propre, de préférence sulfurisé ; des louches, cuillères, cupules, fouets, pichets et pieds-mixers démontables, lavables au lave-vaisselle et stérilisables.
- De l'eau bactériologiquement maîtrisée ou eau embouteillée réfrigérée, peu minéralisée, provenant d'une bouteille ouverte depuis moins de 24 heures.

*λ Dans les unités de soins et les structures d'accueil de la petite enfance*

Au matériel de base, il faut ajouter une assiette plate.

Dans les unités de soin, l'eau utilisée est de l'eau embouteillée réfrigérée, peu minéralisée, provenant d'une bouteille ouverte depuis moins de 24 heures, alors que dans les structures d'accueil de la petite enfance, de l'eau de distribution publique, à défaut de l'eau embouteillée réfrigérée, peu minéralisée, provenant d'une bouteille ouverte depuis moins de 24 heures est utilisée.

*↪ Déroulement de la technique*

Les étapes à respecter sont les mêmes dans les deux types de structures. Il est recommandé de :

- S'assurer visuellement de la propreté du plan de travail, de la boîte de lait et le cas échéant de la bouteille d'eau ;
- Vérifier la date de péremption de la boîte de lait et de tout produit diététique ajouté ;
- Effectuer avant l'ouverture de toute boîte de lait un essuyage humide à l'aide d'une solution détergente agréée « contact alimentaire » (sans rinçage) avec un carré d'essuyage ;
- -Garder la boîte dans le même local avec sa date d'ouverture mentionnée ;
- -Mettre la charlotte et le masque de soins ;
- -Se laver les mains ;
- -Revêtir la tenue de protection appropriée ;
- -Préparer le matériel et les produits vérifiés, sur le plan de travail nettoyé.

*↪ Technique*

*λ Dans les établissements de santé, les centres thérapeutiques spécifiques et les pouponnières*

*➤ Lait prêt à l'emploi sous forme liquide :*

Il est conseillé de procéder de la manière suivante :

- ☼ Prendre la prescription médicale spécifique à l'enfant ;
- ☼ Remplir le biberon de la quantité de lait désirée ;
- ☼ Refermer le biberon avec la tétine, la bague et le capuchon ;
- ☼ Stocker les biberons dans une enceinte réfrigérée à une température inférieure ou égale à 4°C en les regroupant par service.

#### ✎ Lait en poudre :

Deux étapes sont à respecter.

La première correspond à la dilution des poudres de lait et des produits diététiques. Il faut :

- ✱ Peser la poudre avec la balance de précision dont le plateau est muni d'une feuille de papier propre (de préférence sulfurisé) ;
- ✱ Verser le volume d'eau souhaité dans un pot ayant bénéficié d'une désinfection de haut niveau ;
- ✱ Ajouter la poudre ;
- ✱ Homogénéiser avec un fouet ou un bras de mixer ayant bénéficié d'une désinfection de haut niveau ;
- ✱ Après reconstitution d'une quantité de lait d'un lot précis, assurer le remplissage des biberons ;
- ✱ Changer de fouet lorsqu'on change de lot.

La deuxième étape correspond au remplissage des biberons. Pour cela, il faut :

- ✱ Prendre la prescription médicale spécifique à l'enfant ;
- ✱ Verser la préparation liquide directement dans les biberons ;
- ✱ Revisser les biberons avec la tétine, la bague et le capuchon ;
- ✱ Stocker les biberons dans une enceinte réfrigérée à une température inférieure ou égale à 4°C en les regroupant par service.

### ⌘ *Dans les unités de soins et les structures d'accueil de la petite enfance*

#### ✎ Lait prêt à l'emploi sous forme liquide :

Il est conseillé de remplir le biberon de la quantité de lait désirée, puis de refermer le biberon avec la tétine, la bague et le capuchon. Enfin, il faut mettre les biberons au réfrigérateur à une température inférieure ou égale à 4°C.

#### ✎ Lait en poudre :

Les étapes de la technique sont les suivantes :

- ✱ Retirer les accessoires du biberon et les déposer sur l'assiette propre ;
- ✱ Verser la quantité d'eau dans le biberon : remplir le biberon avec N x 30mL d'eau ;
- ✱ Prélever la poudre de lait sans tasser à l'aide de la cuillère-mesure de la boîte, en évitant de toucher les parois intérieures de la boîte. La cuillère-mesure doit être arasée avec le dos du couteau (partie droite du couteau) ;
- ✱ Verser dans le biberon les N cuillères-mesure arasées de lait en poudre (s'assurer que la reconstitution écrite sur la boîte est bien une cuillère-mesure dans 30 mL d'eau et que la cuillère-mesure est bien celle de la boîte de lait). Si le nombre de cuillères-mesure est important, il faut mettre les cuillères-mesure en deux temps (mélanger une 1ère fois le lait au milieu de l'opération) ;
- ✱ Le volume obtenu est égal ou supérieur à N x 30 mL.  
Par exemple : pour un biberon « de 150 mL », mettre 150 mL d'eau (soit 5 x 30mL d'eau).  
Ajouter 5 cuillères-mesure de poudre de lait. Le volume obtenu est d'environ 165 mL en fonction du lait utilisé.
- ✱ Refermer le biberon avec la tétine, la bague et le capuchon ;
- ✱ Mélanger en roulant le biberon entre les mains ;
- ✱ Mettre les biberons au réfrigérateur à une température inférieure ou égale à 4°C.

### ☞ Précautions particulières

#### ☞ Reconstitution avec du lait en poudre

Il faut surtout éviter que le goulot de la bouteille d'eau entre en contact avec le goulot du biberon, et éviter le contact de la cuillère-mesure de lait avec le bord du biberon (Turck *et al.*, 2005).

Le mixeur ou la cuillère utilisés lors de la reconstitution du lait, doivent être correctement désinfectés avant chaque usage pour éviter de contaminer la poudre avec un grand nombre de bactéries (Muytjens *et al.*, 1990).

La FAO (2005) propose de pasteuriser la préparation une fois reconstituée. De même, Noriega *et al.* (1990), après avoir vérifié que cela ne modifiait pas ses propriétés, ont décidé de pasteuriser à nouveau la préparation une fois reconstituée, et de la conserver au réfrigérateur.

#### ☞ Biberon à plusieurs composants (farines, épaississants...)

Toute substance ajoutée à la préparation en poudre pour nourrissons, à usage médical ou non, doit respecter les critères microbiologiques réglementaires applicables à la poudre elle-même.

Le matériel à utiliser est une cuillère à soupe ou à dessert selon le besoin. La technique est identique en respectant l'introduction des denrées des plus liquides aux plus épaisses, les quantités de produits utilisés et en notant la composition du biberon sur l'étiquette (Turck *et al.*, 2005).

### $\beta$ Traçabilité

Les biberons sont munis d'une étiquette ou d'un système de traçabilité équivalent permettant de connaître :

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>⌘ Les nom, prénom et date de naissance de l'enfant ;</li><li>⌘ La dénomination du lait ;</li><li>⌘ L'identification des substances éventuellement ajoutées (qui doivent obéir aux mêmes exigences bactériologiques que tous les ingrédients : poudre de lait, eau, amidon, épaississant, huile...) ;</li><li>⌘ Les date et heure limites de consommation ;</li><li>⌘ Le service destinataire le cas échéant.</li></ul> |
|--|

Par ailleurs doivent être enregistrés chaque jour, pour chaque enfant, le type de préparation lactée, en poudre ou liquide prête à l'emploi, les ajouts éventuels et les numéros de lot.

En raison des préconisations données ci-dessus pour la préparation des biberons, les conditions de reconstitution des préparations en poudre pour nourrissons, décrites par les fabricants sur les emballages, devront être revues. De plus, il faut veiller à la connaissance par le personnel d'encadrement du Règlement 852/2004/CE, notamment concernant la traçabilité (Turck *et al.*, 2005).

### e Refroidissement, conservation et transport du biberon

Les recommandations ci-dessous sont à distinguer en fonction du lieu de préparation des biberons : unité centrale dans les hôpitaux, unités de soins (lorsque les biberons y sont préparés) et structures d'accueil de la petite enfance (crèches, jardins d'enfants), ou domicile.

---

### *α Température du liquide de réhydratation*

Les modalités de refroidissement, préalable nécessaire à tout stockage au froid, dépendent de la température de préparation des biberons. Il convient d'écarter la solution consistant à préparer les biberons avec une eau bactériologiquement maîtrisée chauffée à 60°C, pour des raisons à la fois pragmatiques (risques de brûlures) et nutritionnelles (Turck *et al.*, 2005).

Cependant, il semble que réhydrater les poudres de lait avec de l'eau dont la température est supérieure à 70°C permet de réduire le risque. En considérant que le niveau de contamination des poudre par *E. sakasaki* est d'environ 1 cfu/100g, une réduction de 4 D devrait permettre un risque quasi nul (Edelson-Mammel et Buchanan, 2004).

Selon l'étude de Decisionalysis risk Consultant Inc. (2004), la meilleure solution est une préparation avec une eau bactériologiquement maîtrisée dont la température est idéalement inférieure ou égale à 10°C, et dans tous les cas inférieure ou égale à 20°C.

### *β Conduite à tenir après la reconstitution du biberon*

#### ☞ Unité centrale dans les hôpitaux

Lorsque les préparations sont réalisées avant conservation dans une enceinte à une température inférieure ou égale à 4°C, leur refroidissement doit être rapide, permettant que la température à cœur du biberon atteigne 4°C en moins de 30 minutes (cellule de refroidissement).

Ce refroidissement rapide doit être effectué dans le délai le plus court possible par rapport à la fabrication, de manière à éviter les conséquences d'un réchauffement progressif à température ambiante. Il faut un enregistrement continu de la température du réfrigérateur, et réchauffer les préparation que juste avant leur utilisation (Agostoni *et al.*, 2004 ; Turck *et al.*, 2005).

La FAO (2005) conseille un refroidissement rapide et un stockage à moins de 10°C, et de limiter autant que possible la durée de conservation.

#### ☞ Unités de soins, structures d'accueil de la petite enfance et domicile

Si le biberon est destiné à être consommé dans un délai de moins d'une heure, il peut alors rester à température ambiante, à l'abri du soleil et de toute source de chaleur.

S'il est destiné à être consommé après un délai de plus d'une heure, il doit être immédiatement placé dans une enceinte dont l'air est maintenu à une température inférieure ou égale à 4°C, qui doit être mesurée et enregistrée. L'appareil de mesure de la température de l'enceinte doit être étalonné régulièrement dans les unités de soins et les structures d'accueil de la petite enfance (Turck *et al.*, 2005).

### *χ Conservation*

Dans tous les cas nécessitant une conservation de plus d'une heure après la fabrication des biberons, et si nécessaire après refroidissement rapide, les biberons sont immédiatement placés dans une enceinte dont l'air est maintenu à une température inférieure ou égale à 4°C, qui doit être vérifiée et enregistrée.

L'appareil de mesure de la température de l'enceinte doit être étalonné régulièrement et ladite enceinte doit être exclusivement réservée à la conservation des biberons dans toutes les structures autres que le domicile.

Le délai maximal autorisé pour la conservation des biberons en enceinte réfrigérée avant consommation est de 30 heures (Turck *et al.*, 2005).

### *δ Transport*

Le transport des biberons sur le(s) site(s) de consommation (unités de soins) doit être effectué sans rupture de la chaîne du froid, en utilisant une armoire réfrigérée si le transport dure plus de 10 minutes.

Dans tous les cas, après transport, les biberons seront immédiatement replacés dans une enceinte dont l'air est maintenu à une température inférieure ou égale à 4°C, qui doit être mesurée et enregistrée. De même que précédemment, l'appareil de mesure de la température de l'enceinte doit être étalonné régulièrement (Turck *et al.*, 2005).

## **f Consommation du biberon**

### *α Conduite à tenir*

La conservation, à une température trop élevée et pendant un temps trop long augmente significativement le risque associé à *E. sakazakii*. En effet, la bactérie se multiplie bien dans la poudre de lait. Le risque augmentera de façon exponentielle une fois le temps de latence passé (FAO, 2005).

Les biberons ne doivent être sortis de l'enceinte réfrigérée de conservation qu'immédiatement avant leur utilisation.

Tout biberon sorti de l'enceinte réfrigérée doit être consommé dans un délai d'une heure (Turck *et al.*, 2005). Si les préparations doivent être maintenues à température ambiante pendant une durée prolongée, le temps maximal autorisé est de 4 heures (Agostoni *et al.*, 2004).

Le réchauffement d'un biberon avant sa consommation ne s'impose qu'en cas de conservation à une température inférieure ou égale à 4°C. Si le biberon est réchauffé, ce délai de consommation est ramené à 30 minutes.

Après le début de sa consommation par l'enfant, tout biberon non terminé dans un délai d'une heure doit être jeté (Turck *et al.*, 2005).

### *β En cas de réchauffement*

Si un réchauffement du biberon est effectué, il doit être rapide pour atteindre la température souhaitée (par exemple la température ambiante).

Il doit alors être effectué soit au bain-marie, soit au chauffe-biberon, en aucun cas en le laissant à température ambiante, en raison du risque de développement microbien. En pratique hospitalière, il n'est pas conseillé d'utiliser des systèmes de réchauffement utilisant de l'eau (bain-marie, chauffe-biberon avec eau).

Si réchauffement il y a, il faut privilégier un chauffe-biberon à sec. En effet, un appareil contenant du tartre n'est jamais propre et peut favoriser la prolifération de micro-organismes hydrophiles. Si un système de réchauffement de l'eau est néanmoins utilisé, il doit être vidé de son eau après chaque usage, séché et nettoyé au moins une fois par 24 heures.

L'utilisation du four à micro-ondes est totalement proscrite. En effet, il peut exister une très grande hétérogénéité de températures au sein du biberon de lait qui sort de ce four à micro-ondes. Celle-ci peut engendrer, en cas de température excessive, un risque élevé de brûlures de la bouche et de la gorge, et de diminution de la qualité nutritionnelle du lait (dégradation des vitamines et dénaturation des protéines).

Quel que soit le mode de réchauffement éventuellement utilisé, il est essentiel d'agiter le biberon pour homogénéiser la température du lait et de vérifier cette dernière en mettant quelques

---

gouttes sur la face interne de l'avant-bras de la personne qui alimente l'enfant avant de proposer le biberon à l'enfant (Turck *et al.*, 2005).

### *χ Technique de réchauffement*

#### *⊕ De préférence*

Il est préférable d'utiliser un chauffe-biberon à sec (à préférer en milieu hospitalier) et de suivre les indications du fabricant.

#### *⊕ A défaut*

##### *↪ Bain-marie*

Il faut prendre une casserole propre (à laver à chaque utilisation), mettre l'eau du robinet et faire bouillir. Dès l'ébullition, hors du feu, ajouter un volume égal d'eau froide (ce qui va conduire à une température moyenne de 40-42°C), mettre le ou les biberon(s) et attendre quelques minutes.

##### *↪ Bain thermostaté*

C'est un bain-marie automatisé à usage collectif. Il faut suivre les indications du fabricant.

##### *↪ Chauffe-biberon à eau*

Il faut mettre l'eau du robinet selon les indications du fabricant, et une fois le chauffe-biberon chaud y mettre le biberon, puis attendre le temps indiqué.

##### *↪ Recommandations supplémentaires*

Il est préférable de rincer les chauffe-biberons à eau, bains-marie et bains thermostatés tous les jours et de les laisser sécher, de changer l'eau à chaque utilisation et de détartre si nécessaire.

## **g Alimentation entérale avec du lait de femme et/ou des préparations lactées (non conditionnées sous une forme prête à l'emploi)**

### *α Définition de l'alimentation entérale*

L'alimentation entérale est technique de nutrition regroupant tous les procédés d'alimentation par voie digestive qui court-circuitent la voie orale, recommandée pour assurer un apport calorico-azoté et hydro-électrolytique en cas de dénutrition ou d'incapacité à utiliser la voie orale, en substitution ou en complément de l'alimentation orale normale (Turck *et al.*, 2005).

### *β Recommandations sur le système nutritif*

En premier lieu, il convient de vérifier la date de péremption et l'intégrité du conditionnement des préparations liquides prêtes à l'emploi.

Les recommandations concernant la préparation (qui ne doit être réalisée qu'en unité centrale sous conditions rigoureuses d'asepsie), la conservation et le transport des biberons, seringues ou poches sont identiques à celles relatives aux préparations lactées pour l'alimentation orale.

Si l'unité de néonatalogie est située dans un établissement ne disposant pas d'une unité centrale de préparation à destinée pédiatrique, cette préparation peut être effectuée dans la

biberonnerie de l'unité (Décret n°98-899 du 9 octobre 1998) et avec les mêmes précautions d'habillement et de manipulation.

Le respect de la chaîne du froid est impératif.

Les préparations lactées liquides prêtes à l'emploi sont stériles. Si l'apport nutritif nécessite leur déconditionnement ou leur supplémentation (avec des substances contrôlées pour cette utilisation et ayant une forme galénique adaptée), elles doivent être conservées dans les mêmes conditions que précédemment.

Entre la sortie de l'enceinte réfrigérée et le moment où le liquide nutritif est entièrement consommé par l'enfant, il doit s'écouler au maximum 4 heures.

Concernant le dispositif de nutrition entérale, la tubulure utilisée reste en place à la température ambiante (souvent entre 20 et 30°C), pendant quelques heures, voire une journée ; la sonde naso-gastrique n'est remplacée qu'après une ou plusieurs journées et demeure donc, pendant ce laps de temps, à la température corporelle du nouveau-né ou du nourrisson (36-37°C). Ce dispositif qui sert à véhiculer un produit non stérile peut être le siège de développement bactérien et de formation de biofilm, néfastes à la qualité microbiologique du produit nutritif. Une réflexion devrait être engagée sur l'utilisation de produits stériles adaptés (Turck *et al.*, 2005).

#### 4. Conduite à tenir en cas d'infections à *E. sakazakii*

Tous les cas d'infections à *E. sakazakii* doivent être explorés de la façon la plus complète possible, de manière à connaître la source de contamination et d'avoir plus de données sur l'écologie de la bactérie (FAO, 2005). Il serait intéressant de mettre en place un système d'épidémiologie-vigilance.

##### a En France

En France, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS, 2004c) demande de suivre la conduite suivante en cas d'infection certaine ou probable à *E. sakazakii* chez un nouveau-né diagnostiquée depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2004 :

- ⌘ Avertir immédiatement l'équipe opérationnelle d'hygiène pour investigation, documentation du cas et de son régime alimentaire ;
- ⌘ Procéder au signalement externe à l'aide de la fiche de signalement des infections nosocomiales habituelle (Décret n°2001-671 du 26/07/2001 et circulaire DGS/SD5C-DHOS/E2 n°21 du 22 janvier 2004), en mentionnant notamment sur la fiche la notion ou non de consommation de Pregestimil® par le nouveau-né. Ensuite, il faut envoyer sans délai cette fiche à l'InVS (par fax au 01 41 79 67 69) et suivant la procédure habituelle au CClin et à la Ddass ;
- ⌘ S'assurer que la (les) souches(s) d'*E. sakazakii* isolées sont conservées au laboratoire de bactériologie, et contacter le laboratoire en charge de centraliser les souches afin de la (les) lui transmettre.
- ⌘ Consigner à la pharmacie toutes les boîtes de Pregestimil® potentiellement administrées au(x) cas, dans l'attente d'instructions spécifiques pour leur envoi au laboratoire adéquat. Ces boîtes ne doivent pas être retournées à leur producteur.

L'InVS contactera l'établissement pour confirmer chaque cas signalé et vérifiera certains éléments (caractéristiques du nouveau-né, régime alimentaire dont consommation ou non de Pregestimil®, numéro des lots concernés...).

Si nécessaire, l'investigation complémentaire d'un cas confirmé sera faite par le CClin concerné, en lien avec l'équipe d'hygiène, le laboratoire de bactériologie et les services cliniques.

## b Aux Etats-Unis

Il convient de rapporter les cas d'infections sur des enfants de moins de douze mois, particulièrement lors de présence de la bactérie dans le sang ou le LCR aux départements d'Etat de la santé ou au CDC. Lors que le lien est établi avec les poudres de lait, le faire savoir à la FDA (Himelright *et al.*, 2002), ou à l'autorité sanitaire compétente du pays.

- ☒ L'allaitement maternel est à privilégier.
- ☒ Le règlement 852/2004/CE sera applicable au 1<sup>er</sup> janvier 2006.
- ☒ Une démarche de type HACCP doit être appliquée lors de la préparation des biberons, ou des bonnes pratiques d'hygiène. Des autocontrôles sont à réaliser.
- ☒ La biberonnerie fonctionne suivant le principe de marche en avant, avec un secteur général, un secteur propre et un secteur sale. Le matériel et les locaux doivent être correctement nettoyés et désinfectés.
- ☒ Le personnel doit être qualifié. Sa tenue vestimentaire (blouse, masque, calot) et son hygiène corporelle sont à contrôler.
- ☒ Les traitements thermiques du lait permettent un avantage sur la qualité microbiologique, mais ont des inconvénients nutritionnels. Les préparations liquides stériles ne semblent pas encore au point pour les nourrissons prématurés. Malgré le risque des préparations en poudre, il semble que ce soit celles à préconiser chez ces individus, ou mieux les laits liquides ayant subi un procédé UHT.
- ☒ L'eau utilisée doit être de qualité microbiologique maîtrisée et de température inférieure à 20°C.
- ☒ Pour reconstituer le biberon, il faut une hygiène de la tenue, des mains, et du plan de travail. La traçabilité est très importante.
- ☒ Il est préférable de consommer les biberons, dans l'heure suivant la reconstitution (demi-heure lors de réchauffement). Ils peuvent cependant être conservés 30 heures à 4°C.
- ☒ Le refroidissement des biberons doit être rapide.
- ☒ Le réchauffement est rapide, avec un chauffe-biberon à sec si possible (four à micro-ondes proscrit).
- ☒ Les recommandations pour l'alimentation entérale sont les mêmes.

## C / AXES DE RECHERCHE

Les études portant sur *Enterobacter sakazakii* se sont concentrées sur les méthodes pour éliminer le coliforme des préparations en poudre pour nourrissons, sa résistance thermique, les réservoirs environnementaux, la pathogénie, les résistances antibiotiques, la production d'exopolysaccharide, la mise au point de méthodes de détection rapides, le dénombrement et l'identification... Des recherches complémentaires doivent être faites aussi bien dans ces domaines que dans d'autres supplémentaires.

### 1. Typage et méthode de détection

Il serait nécessaire de conduire des recherches supplémentaires dans le typage d'*E. sakazakii* et son sérotypage et les méthodes pour récupérer et raviver les bactéries blessées (autre mot à utiliser, mais je trouve pas) (Gurtler *et al.*, 2005).

### 2. Pathogénie et facteurs de virulence

Des études sur la pathogénie sont en cours, et les facteurs de virulence d'*E. sakazakii* sont en voie de caractérisation.

#### a Pathogénie

Lai (2001), en mettant en évidence la capacité d'*E. sakazakii* d'infecter certains individus et certains groupes d'individus par des voies particulières, a mis en relief le fait que son tropisme pour le système nerveux central des nouveaux-nés et des nourrissons reste incompris.

Sa capacité à infecter des enfants à terme et en bonne santé mais pas dans le même cadre reste énigmatique (Gurtler *et al.*, 2005). Le cas décrit par Biering *et al.* (1989), où un seul des deux jumeaux est atteint en est un exemple.

#### b Facteurs de virulence

Bien que l'étude de Pagotto *et al.* (2003) sur les facteurs de virulence de la bactérie et sa dose infectieuse chez les souris ait suggéré la présence d'une endotoxine, les autres facteurs de virulence d'*E. sakazakii* restent inconnus, notamment ceux à l'origine des méningites. De nombreux auteurs pensent qu'il doivent être étudiés plus en avant (Pagotto *et al.*, 2003 ; Iversen et Forsythe, 2003 ; Gurtler *et al.*, 2005)

Les corrélations potentielles entre la pathogénie et la coloration, la forme et la texture des colonies, la production de DNase et l'utilisation d'autres modèles animaux et d'autres lignées cellulaires comme système d'exploration de l'endotoxine, doivent être étudiées (Pagotto *et al.*, 2003).

Iversen et Forsythe (2003) recommandent d'approfondir les recherches concernant le rôle de la capsule dans la résistance à la dessiccation et la destruction thermique.

Un autre secteur de recherche inclut l'étude des conditions influant sur la formation de biofilm par *E. sakazakii* dans les chaînes de production des usines ou dans les équipements hospitaliers (les tubulures de nutrition entérale par exemple) (Gurtler *et al.*, 2005).

---

### 3. Contrôle de la contamination des poudres de lait

#### a Élimination du pathogène des poudres

Les traitements traditionnels ou de technologie de pointe pour éliminer le pathogène des préparations en poudre n'ont pas tous été explorés. Il a été suggéré d'utiliser l'irradiation comme moyen de contrôle, ou bien de rechercher dans le sens de l'utilisation des pro- ou pré-biotiques (Gurtler *et al.*, 2005).

#### b Condition de croissance et de survie

Des études déterminant les conditions qui ont une influence sur la survie, la croissance ou causant la mort d'*E. sakazakii* dans les poudres de lait et les formules reconstituées, sont nécessaires étant donné la forte probabilité que la contamination ait lieu après la pasteurisation. Il serait intéressant de déterminer précisément la tolérance à la dessiccation, la chaleur, le pH, les temps de latences à différentes températures et dans différentes matrices alimentaires d'*E. sakazakii* (Gurtler *et al.*, 2005).

#### c Mesures d'élimination chimique

Gurtler *et al.* (2005) conseillent d'étudier l'intérêt de l'utilisation de bactériocines, d'acides organique, de désinfectants et autres produits chimiques pour contrôler la croissance d'*E. sakazakii*.

### 4. Maîtrise sanitaire

Des études sur l'efficacité des mesures sanitaires et l'évaluation des protocoles de préparation et de nourrissage avec des préparations de poudre de lait à l'hôpital et au domicile sont à faire (Gurtler *et al.*, 2005).

Enfin, les experts de l'Afssa (Turck *et al.*, 2005) conseillent de réaliser des études permettant d'obtenir des informations concernant les possibilités de maîtrise du risque lié à *E. sakazakii* et aux autres micro-organismes pathogènes.

## CONCLUSION

*Enterobacter sakazakii* est une Entérobactérie **ubiquiste** qui présente les caractéristiques d'un germe infectieux **opportuniste émergent**. Il est à l'origine d'une pathologie grave mais **peu fréquente** chez l'homme, affectant principalement le **nouveau-né prématuré de faible poids à la naissance** ou immunodéprimé.

Les premiers cas de **méningites** décrits remontent aux années soixante et la bactérie n'a réellement été identifiée qu'au début des années quatre-vingt. Depuis près d'une centaine de cas d'infection sont rapportés associant aux méningites des colonisations digestives, des septicémies et des entérocolites nécrosantes. Le taux de mortalité est relativement élevé et lors de méningites, les séquelles restent importantes.

Si la pathogénie reste encore floue, les sources et mode de contamination principaux semblent être la consommation de **préparations de lait en poudre pour nourrissons**. Ces préparations peuvent être contaminées par *E. sakazakii* principalement dans le **site de fabrication** et éventuellement lors de la reconstitution du lait, ses caractéristiques biologiques lui permettant la colonisation de niches écologiques particulières. Des études montrent que cette contamination est initialement faible et la dose infectieuse ne peut être atteinte qu'à la suite d'**erreurs** commises dans les **protocoles de préparation et de consommation des biberons**. Les poudres de lait ne sont pas stériles ainsi, la maîtrise de ce pathogène doit passer par l'application d'une méthode type **HACCP** intégrant à la fois le site de fabrication et le site de reconstitution et de consommation.

Les connaissances concernant *E. sakazakii* notamment sur sa persistance dans l'environnement, l'existence éventuelle d'agents disséminants et les facteurs de virulence expliquant l'apparition de méningites restent insuffisantes.

Le Professeur responsable  
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

P. C. VERNOZY-ROLAND

Vu : Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Le Président de la thèse

Professeur Jérôme ETIENNE

LE DIRECTEUR DE L'AGRICULTURE  
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE  
Ecole Nationale  
vétérinaire  
LYON  
Stéphane MARTINOT

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 08 JUIL. 2006

Pour le Président de l'Université

Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales

Professeur D. VITAL-DURAND



---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Afssa (2003). (Page consultée le 8 août 2005). Site de L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments. [en ligne] Adresse URL : <http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/22077-22569.pdf>
2. Afssa (2005). Fiche de description du danger. Bultel C. Communication personnelle
3. Agence de santé publique du Canada (Page consultée le 19 juillet 2005). Site de l'Agence de santé publique du Canada, [en ligne] Adresse URL : <http://www.phac-aspc.ca/msds-ftss/msds59f.html>
4. Agostini C., Axelsson I., Goulet O., Koletzko B., Michaelsen K.F., Puntis J.W.L., Rigo J., Shamir R., Szajewska H., Turck D., Vandenplas Y., Weaver L.Y. (2004). Preparation and handling of powdered infant formula : a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39, 320-322.
5. Aldova E., Hausner O., Postupa R. (1983). Tween-esterase activity in *Enterobacter sakazakii*. *Zbl. Bakt. Hyg. A.* 256, 103-108
6. American Dietetic Association (2005). (page consultée le 10 août 2005). American Dietetic Association. Guidelines for preparation of formula and breastmilk in health care facilities. [en ligne] Adresse URL: [http://www.eatright.org/Public/ProductCatalog/104\\_8515.cfm](http://www.eatright.org/Public/ProductCatalog/104_8515.cfm)
7. Arseni A., Malamou-Ladas E., Koutsia C., Xanthou M., Trika E. (1983). Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J. Hospit. Infect.* 9, 143-150
8. Arts M. (2004). *Enterobacter sakazakii* in factories and households. *Lancet.* 364, 414
9. Bar-Oz B., Preminger A., Peleg O., Block C., Arad I. (2001). *Enterobacter sakazakii* infection in newborn. *Acta Paediatr.* 90, 3, 356-358
10. Biering G., Karlsson S., Clark N.C., Jonsdottir K.E., Ludvigsson P., Steingrimsson O. (1989). Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* 27, 9, 2054-2056
11. Block C., Peleg O., Minster N., Bar-Oz B., Simhon A., Arad I., Shapiro M. (2002). Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 8, 613-616
12. Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M., Joosten H.M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 967-973
13. Burdette J.H., Santos C. (2000). *Enterobacter sakazakii* brain abscess in neonate : the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* 30, 33-34
14. Chan K.L., Saing H., Yung R.W.H., Yeung Y.P., Tsoi N.S. (1994). A study of pre-antibiotic bacteriology in 125 patients with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr. Suppl.* 396, 45-48
15. Clark N.C., Hill B.C., O'Hara C., Steingrimsson O., Cooksey R.C. (1990). Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 467-472

16. Clementino M.M., De Filippis I., Nascimento C.R., Branquinho R., Rocha C.L., Martins O.B. (2001). PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 11, 3865-3870
17. Coignard B., Vaillant D., Vincent J.P., Leflèche A., Mariani-Kurkjian P., Bernet C., L'Hériteau F., Sénéchal H. Grimont P., Bingen E., Desenclos J.C. (2006). Infections sévères à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourrissons, France, octobre-décembre 2004. *Bull. Epidem. Hebdo.* 2-3, 10-13
18. Collado M.C., Gueimonde M., Hernandez M., Sanz Y., Salminen S. (2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J. Food Prot.* 68, 12, 2672-2678
19. Commission du Codex Alimentarius (2004). Profils de risqué d'*Enterobacter sakazakii* et d'autres microorganismes dans les préparations en poudre pour nourrissons. Préparé par les Etats-Unis d'Amérique et le Canada. Trente-sixième session du Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire. Point 11a de l'ordre du jour, CX/FH 04/12, Washington
20. Coterehos (1997). (page consultée le 10 août 2005). Coterehos. Guide Hygiène et architecture dans les établissements de santé. Aide à la conception des unités de soins. [en ligne] Adresse URL : <http://nosobase.chu-lyon.fr/> et <http://nosobase.chu-lyon.fr/recommandations/Architecture/architecture.htm>
21. Coulin P., Farah Z., Assanvo J., Spillmann H., Puhan Z. (2006). Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Internat. J. Food Microbiol.* 106, 131-136
22. Decisionalysis risk Consultant Inc. (2004). Handling and storage of rehydrated powdered infant formula and the associated risk of *E. sakazakii* infections in infants: preliminary finding from draft risk assessment model. Ontario, Canada, 10p.
23. Dennison S.K., Morris J. (2002). Multiresistant *Enterobacter sakazakii* wound infection in adult. *Infect. Med.* 19, 533-535
24. Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments du Canada. (Page consultée le 12 mai 2005). Site de la Direction de Santé Canada, [en ligne] Adresse URL : [http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendieum/volume\\_3/f\\_mflp-27.html](http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendieum/volume_3/f_mflp-27.html)
25. Drudy D., Mullane N.F.R., Quinn T., Wall P.G., Fanning S. (2006a). *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clin. Infect. Dis.* 42, 996-1002
26. Drudy D., O'Rourke M., Murphy M., Mullane N.R., O'Mahony R., Kelly L., Fischer M., Sanjaq S., Shannon P., Wall P., O'Mahony M., Whyte P., Fanning S. (2006b). Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *Int. J. Food Microbiol.* A l'impression
27. Edelson-Mammel S.G., Buchanan R.L. (2004). Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J. Food Prot.* 67, 1, 60-63
28. Edelson-Mammel S.G., Porteous M.K., Buchanan R.L. (2005). Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* 68, 9, 1900-1902
29. European Food Safety Association (2004). Microbiological risks in infant formulae and follow-up formulae. *EFSA J.* 113, 1-35

- 
30. FAO (2001) (Page consultée le 7 août 2005). Site de la Food and Agriculture Organisation. Système de qualité et de sécurité alimentaire : manuel de formation. [en ligne] Adresse URL : [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/DOCREP/005/W8088F/w8088f00.HTM](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/005/W8088F/w8088f00.HTM)
  31. FAO (2004). (Page consultée le 17 août 2005). Site de la Food and Agriculture Organisation. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. [en ligne] Adresse URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5502e/y5502e00.pdf>
  32. Farber J.M. (2004). *Enterobacter sakazakii* – new foods for thought? Lancet. 363, 5
  33. Farmer J.J., Asbury M.A., Hickmann-Brenner F.W., the *Enterobacteriaceae* Study Group (1980). *Enterobacter sakazakii* a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 3, 569-584
  34. Farmer J.J., Davis B.R., Hickman-Brenner F.W., McWhorter A., Huntley-Carter G.P., Asbury M.A., Riddle C., Wathen-Grady H.G., Elias C., Fanning G.R., Steigerwalt A.G., O’Hara C.M., Morris G.K., Smith P.B., Brenner D.J. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 21, 1, 46-76
  35. FDA. Center for Safety and Apply Nutrition.(2002a). (Page consultée le 12 mai 2005). Site de la Food and Drugs Administration, [en ligne] Adresse URL : <http://www.cfsan.fola.gov/~comm/mmesakas.html>.
  36. FDA. Center for Safety and Apply Nutrition.(2002b). (Page consultée le 12 mai 2005). Site de la Food and Drugs Administration. Questions and answers on method for *E. sakazakii* in powdered infant formula. [en ligne] Adresse URL : <http://www.cfsan.fola.gov/~comm/mmesakqa.html>.
  37. FDA. Center for Safety and Apply Nutrition.(2002c). (Page consultée le 12 mai 2005). Site de la Food and Drugs Administration. FDA warns about possible *Enterobacter sakazakii* infections in hospitalized newborns fed powdered infant formula. [en ligne] Adresse URL : <http://www.cfsan.fola.gov/~1rd/tpinf.html>.
  38. FDA (2002d). (Page consultée le 12 mai 2005). Site de la Food and Drugs Administration. FDA alerts public regarding recall of powdered infant formula. [en ligne] Adresse URL : <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2002/NEW00849.html>
  39. Gallagher P.G. (1990). *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. Rev. Infect. Dis. 12, 5, 808-812
  40. Gallagher P.G., Ball W.S. (1991). Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. Pediatr. Radiol. 21, 135-136
  41. Gassem M.A.A. (1999). Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. J. Appl. Microbiol. 86, 221-225
  42. Gonzalez S., Flick G.J., Arritt F.M., Holliman D., Meadows B. (2006). Effect of high-pressure processing on strains of *Enterobacter sakazakii*. J. Food Prot. 69, 4, 935-937
  43. Gosney M.A., Martin M.V., Wright A.E., Gallagher M. (2006). *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia. European J. Internal Med. 17, 185-188

44. Guillaume-Gentil O., Sonnard V., Khandai M.C., Marugg J.D., Joosten H. (2005). A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Prot.* 68,1,64-69
45. Gutler J.B., Kornacki J.L., Beuchat L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 1, 1-34
46. Gutler J.B., Beuchat L.R. (2005). Performance of media for recovering stressed cells of *Enterobacter sakazakii* as determined using spiral plating and ecometric techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 12, 7661-7669
47. Hamilton J.V., Lehane M.J., Braig H.R. (2003). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midguts of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 10, 1355-1356
48. Havelaar A.H., Zwietering M. (2004). On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 99-100
49. Hawkins R.E., Lissner C.R., Sanford J.P. (1991). *Enterobacter sakazakii* bacteremia in adult. *Southern Medical Journal*, 84, 793-795
50. Hayes M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C., Stanton C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3, 2260-2264
51. Heuvelink A.E., Ahmed M., Kodde F.D., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., de Boer E. (2001). *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. Keuringsdienst van Waren oost. Project number OT 0110
52. Heuvelink A.E., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., Van der A H., Wit B., van Oosterom R., de Boer E. (2003). Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in zuigelingenvoeding. Keuringsdienst van Waren oost. Project number OT 0210
53. Heuvelink A.E., Moes H., Tilburg J.J.H.C., de Boer E. (2004). Handhavingsactie *Enterobacter sakazakii* in poedervormige producten. Keuringsdienst van Waren oost. Project number OT 03H006
54. Himelright I., Harris E., Lorch V., Anderson M., Jones T., Craig A., Kuehnert M. Forster T., Arduino M., Jensen B., Jernigan D. (2002). *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered infant formula – Tennessee, 2001. *Morb. Mortal Wkly Rep.* 51, 297-300
55. Hoffmann H., Roggenkamp A. (2003). Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 9, 5309-5318
56. IBFAN (2002). Communiqué de presse IBFAN 10 mai 2002 (page consultée le 19 août 2005). Site de l'IBFAN [en ligne] Adresse URL : <http://www.ibfan.org/french/news/presse/press10may02-fr.html>
57. Institut de Veille Sanitaire, InVS (2004a). Communiqué de presse – 10 décembre 2004. Retrait de lots de Pregestimil® , préparation pour alimentation pour nourrissons et enfants en bas âge. (page consultée le 12 mai 2005) Site de l'InVS, [en ligne] Adresse URL : [http://www.invs.sante.fr/presse/2004/communiqués/pregestimil\\_1012204/index.html](http://www.invs.sante.fr/presse/2004/communiqués/pregestimil_1012204/index.html)
58. Institut de Veille Sanitaire, InVS (2004b). Communiqué. Retrait de l'ensembles des lots de Pregestimil® , préparation pour alimentation pour nourrissons et enfants en bas âge. (page consultée le 12 mai 2005) Site de l'InVS, [en ligne] Adresse URL : [http://www.invs.sante.fr/presse/2004/communiqués/pregestimil\\_1712204/index.html](http://www.invs.sante.fr/presse/2004/communiqués/pregestimil_1712204/index.html)

- 
59. Institut de Veille Sanitaire, InVS (2004c). Infections à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé du Pregestimil, préparation pour l'alimentation des nourrissons et des enfants en bas âge. Bilan préliminaire de l'investigation nationale et recommandations de signalement.
  60. Iversen C., Forsythe S. (2003a). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci. Technol. 14, 443-454
  61. Iversen C., Druggan P., Forsythe S. (2004a). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. Int. J. Food Microbiol. 96, 133-139
  62. Iversen C., Lane M., Forsythe S. (2004b). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula. Lett. Appl. Microbiol. 38, 378-382
  63. Iversen C., Waddington M., On S.L.W., Forsythe S. (2004c). Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species. J. Clin. Microbiol. 42, 11, 5368-5370
  64. Iversen C., Forsythe S. (2004a). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. Food Microbiol. 21, 771-777
  65. Iversen C., Forsythe S. (2004b). Response to "On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula". Trends Food Sci. Technol. 15, 101-102
  66. Iversen C., Lancashire L., Waddington M., Forsythe S., Ball G. (2006). Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: the use of artificial neural networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. BMC Microbiol. 6, 28
  67. Jimenez E.B., Gimenez C.R. (1982). Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. Clin. Microbiol. Newlett. 4, 30
  68. Joker R.N., Norholm T., Silboni K.E. (1965). A case of neonatal meningitis caused by a yellow *Enterobacter*. Dan. Med. Bull. 12, 128-130
  69. Kandhai M.C., Reij M.W., Gorris L.G.M., Guillaume-Gentil O., Van Schothorst M. (2004a). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. Lancet. 363, 39-40
  70. Kandhai M.C., Reij M.W., Van Puyvelde K., Guillaume-Gentil O., Beumer R.R., Van Schothorst M. (2004b). A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. J. Food Prot. 67, 6, 1267-1270
  71. Kim H., Beuchat L.R. (2005). Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. J. Food Prot. 68, 12, 2541-2552
  72. Kindle G., Busse A., Kampa D., Meyer-Konig U., Daschner F.D. (1996). Killing activity of microwaves in milk. J. Hosp. Infect. 33, 273-278
  73. Kleiman M.B., Allen S.D., Neal P., Reynolds J. (1981). Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. J. Clin. Microbiol. 14, 3, 352-354

74. Kuzina L.V., Peloquin J.J., Vacek D.C., Miller T.A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiol.* 42, 290-294
75. Lai K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Med.* 80, 2, 113-122
76. Leclerc H., Mossel D.A.A., Edberg S.C., Struijk C.B. (2001). Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 201-234
77. Leclercq A., Wanegue C., Baylac P. (2002). Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4, 1631-1638
78. Le cour H., Seara A., Cordiero J., Miranda M. (1989). Treatment of childhood bacterial meningitis. *Infection.* 17, 5, 343-346
79. Lee J.W., Oh S.H., Kim J.H., Yook H.S., Byun M.W. (2006). Gamma radiation sensitivity of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* 69, 6, 1434-1437
80. Lehner A., Stephan R. (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Prot.* 67, 12, 2850-2857
81. Lehner A., Tasara T., Stephan R. (2004a). 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* 4, 43, [en ligne] Adresse URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/4/43>
82. Lehner A., Riedel K., Eberl L., Breeuwer P., Diep B., Stephan R. (2005). Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. *J. Food Prot.* 68, 11, 2287-2294
83. Lehner A., nitzsche S., Breeuwer P., Diep B., Thelen K., Stephan R. (2006a). Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol.* 6, 15
84. Lehner A., Riedel K., Rattei T., Ruepp A., Frishman D., Breeuwer P., Diep B., Eberl L., Stephan R. (2006b). Molecular characterization of the  $\alpha$ -glucosidase activity in *Enterobacter sakazakii* reveals the presence of a putative gene cluster for palatinose metabolism. *Syst. Appl. Microbiol. A l'impression*
85. Le Minor L., Richard C. (1993). Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut Pasteur, Paris, 217 p.
86. Leuschner R.G.K., Baird F., Donald B., Cox L.J. (2004). A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Food Microbiol.* 21, 527-533
87. Liu Y., Cai X., Zhang X., Gao Q., Yang X., Zheng Z., Luo M., Huang X. (2006a). Real time PCR using TaqMan and SYBER green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Microbiol. Methods.* 65, 1, 21-31
88. Liu Y., Gao Q., Zhang X., Hou Y., Yang J., Huang X. (2006b). PCR and oligonucleotide array for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Mol. Cell. Probes.* 20, 11-17

- 
89. Lucas A., Cole T.J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 336, 1519-1523
  90. Mange J.P., Stephan R., Borel N., Wild P., Kim K.S., Pospischil A., Lehner A. (2006). Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* 6, 58, à l'impression
  91. Ministère de la santé (2004). (page consultée le 16 août 2005). Site du ministère de la santé et de la protection sociale. L'eau dans les établissements de santé. Guide technique. [en ligne] Adresse URL : <http://ile-de-france.sante.gouv.fr/santenv/eau/general/guid04.pdf>
  92. Monroe P.W., Tift W.L. (1979). Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* 10, 6, 850-851
  93. Mramba F., Broce A., Zurek L. (2006). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from stable flies, *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *J. Food Prot.* 69, 3, 671-673
  94. Murray M.M., Welch D.F., Kuhls T.L. (1990). *Serratia* osreochondritis after puncture wounds of the foot. *Pediatr. Infect. Dis.* 9, 7, 523-524
  95. Muytjens, H.L., Zanen H.C., Sonderkamp H.J., Kollee L.A., Wachsmuth I.KI, Farmer J.J. (1983). Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* 18, 1, 115-120
  96. Muytjens H.L., Van Der Ros-Van Der Repe J. (1986). Comparative in vitro susceptibilities of eight *Enterobacter* species, with special reference to *Enterobacter sakazakii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29, 2, 367-370
  97. Muytjens H.L., van der Ros-van de Repe J., Druuten H.A.M. (1984). Enzymatic profiles of *Enterobacter sakazakii* and related species with special reference to the a-glucosidase reaction and reproductibility of the test system. *J. Clin. Microbiol.* 20, 684-686
  98. Muytjens H.L., Roelofs-Willems H., Jaspas G.H.J. (1988). Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 26, 4, 743-746
  99. Muytjens H.L., Kollee L.A.A. (1990). *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9, 5, 372-373
  100. Naqvi S.H., Maxwell M.A., Dunkle L.M. (1985). Cefotaxime therapy of neonatal Gram-negative bacillary meningitis. *Pediatr. Infect. Dis.* 4, 5, 499-502
  101. Nassereddin R.A., Yamani M.I. (2005). Microbiological quality of Sous and Tamarind, traditional drinks consumed in Jordan. *J. Food Prot.* 68, 4, 773-777
  102. Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997a). Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 9-13
  103. Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997b). Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Prot.* 60, 3, 226-230
  104. Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997c). *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 103-113

105. Nazarowec-White M., Farber J.M. (1999). Phenotypic and genotypic typing of food and clinical isolates of *Enterobacter sakazakii*. J. Med. Microbiol. 48,6, 559-567
106. Nazarowec-White M., McKellar R.C., Piyasena P. (1999). Predictive modelling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurisation. Food Research International. 32, 375-379
107. Nair M.K.M., Joy J., Venkitanarayanan K.S. (2004). Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by monocaprylin. J. Food Prot. 67, 12, 2815-2819
108. Noriega F. R., Martin M. A., Schwalbe R. S. (1990). Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. Pediatr. Infect. Dis. J. 9, 6, 1990
109. Oh S.W., Kang D.H. (2004). Fluorogenic selective and differential medium for isolation of *Enterobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 9, 5692-5694
110. OMS 2001. (Page consultée le 9 août 2005) Site de l'Organisation mondiale de la Santé, 54ème Assemblée mondiale de la Santé. La nutrition chez le nourrisson et le jeune enfant. WHA 54.2. [en ligne] adresse URL : [http://www.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA54/fa54r2.pdf](http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA54/fa54r2.pdf)
111. Ongradi J. (2002). Vaginal infection by *Enterobacter sakazakii*. Sex. Transm. Infect. 78, 6, 467
112. Pagotto F. J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J.M. (2003). *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. J. Food Prot. 66, 3, 370-375
113. Piyasena P., Liou S., McKellar R.C. (1998). Predictive modelling of inactivation of *Listeria* spp. in bovine milk during high-temperature short-time pasteurisation. Int. J. Food Microbiol. 39, 167-173
114. Postupa R., Aldova E. (1984). *Enterobacter sakazakii*: a tween 80 esterase-positive representative of the genus *Enterobacter* isolated from powdered milk specimens. J. Hygiene Epidemiol. Microbiol. Immun. 28, 4, 435-440
115. Reina J., Parras F., Gil J., Salva F., Alomar P. (1989). Infecciones humanas por *Enterobacter sakazakii*. Consideraciones microbiológicas. Enf. Infec. Y Microbiol. Clin. 7, 3, 147-150
116. Reis M., Harms D., Scharf J. (1994). Multiple cerebrale infarzierungen mit resultierender multizystischer encephalomalazie bei einem frühgeborenen mit *Enterobacter sakazakii*-meningitis. Klein. Pädiatr. 206, 184-186
117. Restaino L., Frampton E.W., Lionberg W.C., Becker R.J. (2006). A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. J. Food Prot. 69, 2, 315-322
118. Richards G.M., Gurtler J.B., Beuchat L.R. (2005). Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. J Appl Microbiol. 99,4, 844-850.
119. Robertson L.J., Johannessen G.S., Gjerde B.K., Loncarevic S. (2002). Microbiological analysis of seed sprouts in Norway. Int. J. Food Microbiol. 75, 119-126

- 
120. Simmons B.P., Gelfand M.S., Haas M., Metts L., Ferguson J. (1989). *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula. *Infect. Control Hosp., Epidemiol.* 10, 9, 398-401
  121. Seo K.H., Brackett R.E. (2005). Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Prot.* 68, 1, 59-63
  122. SHS International (2003a). (Page consultée le 17 août 2005). Site de SHS international. Position statement. [en ligne] Adresse URL : [http://www.shsna.com/html/news/haccp\\_neocate.htm](http://www.shsna.com/html/news/haccp_neocate.htm)
  123. SHS International (2003b). (Page consultée le 17 août 2005). Site de SHS international. Avis : retour au méthode de préparation « 24 heures à l'avance ». [en ligne] Adresse URL : [http://www.shsna.com/html/news/préparation\\_statement-french.htm](http://www.shsna.com/html/news/préparation_statement-french.htm)
  124. Skladal P., Mascini M., Salvadori C., Zannoni G. (1993). Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-lactate biosensor. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 508-512
  125. Société française d'hygiène hospitalière (2002). (page consultée le 10 août 2005). Site de la Société française d'hygiène hospitalière. Recommandations pour l'hygiène des mains, [en ligne] Adresse URL : [http://www.sfh.net/telechargement/recommandations\\_hygiენemain.pdf](http://www.sfh.net/telechargement/recommandations_hygiენemain.pdf)
  126. Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Lemons J.A. (2004). *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* 144, 821-823
  127. Tekkök I.H., Baesa S.S., Higgins M.J., Ventureyra E.C.G. (1996). Abscedation of posterior fossa dermoid cysts. *Child's Nerv. Syst.* 12, 318-322
  128. Telang S., Berseth C.L., Ferguson P.W., Kinder J. M., DeRoin M., Petschow B.W. (2005). Fortifying fresh human milk with commercial powdered human milk fortifiers does not affect bacterial growth during 6 hours at room temperature. *J. Am. Diet Assoc.* 105, 1567-1572
  129. Tenover F.C. (2001). Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 33, 3, 108-115
  130. Tomas B., Thiry E. (2003). Qu'est-ce qu'une maladie émergente? *Epidemiol. Et Santé Anim.* 44, 1-11
  131. Turck D., Aggoune M., Cerf O., Chouraqui J. P., Colas C., Humbert S., Leclercq A., Maubois J. L., Putet G., Rigo J., Verdeil X., Drouvot V., Tenailleau S., Bultel C., Aubry-Damon H., Eliaszewicz M. (2005). Préparation et conservation des biberons. *Afssa. Maison-Alfort.* 62p
  132. Van Acker J., de Smet F., Muyltermans G., Bougateg A., Naessens A. Lauwers S. (2001). Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1, 293-297
  133. Weir E. (2002). Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *JAMC.* 12, 166
  134. Weishcher M., Kolmos H.J. (1992). Retrospective 6-year study of *Enterobacter* bacteremia in danish university hospital. *J. Hospit. Infect.* 20, 15-24

135. Welsh D.T., Herbert R.A. (1999). Osmotically induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 174, 57-63
136. Willis J., Robinson J.E. (1988). *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. Pediatr. Infect. Dis. J. 7, 3, 196-199
137. WHO (2005). (Page consultée le 17 août 2005). Site de la World Health Organisation. Guidelines for drinking-water quality. [en ligne] Adresse URL : [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/GDWQ2004web.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDWQ2004web.pdf)
138. Zogaj X., Bokranz W., Nitz M., Römling U. (2003). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from human gastrointestinal tract. Infect. Immun. 71, 7, 4151-4158



## ANNEXE A : DESCRIPTION DES CAS D'INFECTION A *ENTEROBACTER* *SAKAZAKII* RECENTES

Cette annexe correspond à la description de tous les cas d'infection à *E. sakazakii* que nous avons recensé. Elle permet de mieux comprendre les parties du corps de la thèse portant sur la pathologie et l'épidémiologie. Il est intéressant de la lire en parallèle de la thèse, car cette description chronologique des infections à *E. sakazakii* permet de voir l'**émergence** de la bactérie.

Chaque crise ou infection sporadique est décrite précisément, puis résumée dans un tableau de synthèse.

Il se pourrait que de nombreuses crises soient passées **inaperçues** dans la mesure où avant l'identification d'*Enterobacter sakazakii* comme une espèce bactérienne à part entière, certaines bactéries mises en cause auraient pu être *E. sakazakii* (Farmer *et al.*, 1980). Ainsi, *Praschechia flavescens* a été identifié, à posteriori, comme étant en fait *E. sakazakii* (Farmer *et al.*, 1985).

Il faut également noter que tous les cas de méningites néonatales dues à *Enterobacter sakazakii* ne sont pas publiés (Lehner et Staphan, 2004).

### A / 1958: DEUX CAS DE MENINGITE NEONATALE, ST ALBANS, ANGLETERRE (URMENYI ET AL., 1961)

Ces deux cas sont survenus à l'Hôpital Osterhill, en **Angleterre**, à deux jours d'intervalle. C'est la **première** crise décrite d'infection néonatale certainement due à *Enterobacter sakazakii* (qui est décrit par les auteurs comme une souche d'*E. cloacae* produisant un pigment jaune).

#### I. Description des cas:

##### a Cas I:

##### *α Clinique*

Le patient est un garçon, né le **29 mai 1958**, trois jours avant le terme. Il est sorti de l'hôpital à dix jours, puis est revenu à **onze jours** car son état général se dégradait.

Le patient paraît très malade. Il souffre de jaunisse, et de convulsions. Son foie est hypertrophié, et la fontanelle antérieure est bombée. Le diagnostic de **méningite** est fait et une ponction de LCR au niveau lombaire est réalisée.

Malgré la phénobarbitone puis le paralaldéhyde, les convulsions ne sont pas contrôlées. De même, l'**oxytétracycline** en intramusculaire ne permet pas de juguler l'infection. Le patient **décède 48 heures** après le début des symptômes.

##### *β Lésions*

A l'autopsie les lésions siégeaient au niveau de l'**encéphale** (absence de lésions ombilicales). Le bacille producteur de pigments jaunes a été isolé à partir de l'encéphale, du LCR et des bronches.

b Cas 2:

*α Clinique*

La patiente est une fille de **cinq jours**, né le **5 juin 1958**. Elle est née après **32 semaines** de gestation (la durée normale est de 40 semaines de gestation). Sa mère a été admise en urgence pour une hémorragie antepartum due à un placenta praevia (placenta bas inséré). Son **jumeau** et elle sont délivrés par une césarienne. Son frère n'a souffert d'aucune pathologie.

A cinq jours d'âge, elle souffre de troubles cérébraux, jaunisse et d'érythème prurigineux (**urticarial rash**). Elle **décède quelques heures** après le début des symptômes.

*β Lésions*

A l'autopsie, les lésions siégeaient au niveau de l'**encéphale** et des **poumons**. Le bacille pigmenté est isolé à partir de l'encéphale, des bronches, du foie et de la moelle. *Staphylococcus pyogenes* est également isolé des bronches.

2. Agent responsable

La culture du bacille se fait sur une gélose standard. A **température ambiante** les colonies produisent un **pigment jaune doré qui ne diffuse pas**, et à 37°C, un pigment faiblement jaune. Ce pigment est insoluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme et l'éther.

Les auteurs ont identifié cette bactérie comme étant une souche atypique d'*Enterobacter cloacae* **pigmenté en jaune**. Les souches de isolées chez les deux patients sont identiques.

3. Mode et source de transmission

Le mode et la source de transmission sont **inconnus** dans cette crise. Pour le cas 2, le tractus respiratoire a peut être été la voie d'entrée.

Bien que les patients soient morts à deux jours l'un de l'autres, ils n'ont pas eu de contact, et n'étaient pas dans le même endroit de l'hôpital. Si la source d'infection est commune, elle n'a pas été identifiée par les auteurs. De plus, le fait qu'un seul des deux jumeau soit atteint est remarquable, puisque les deux ont subi le même traitement et côtoyé les mêmes infirmières. Les jumeaux ont été placés dans des incubateurs séparés, ce qui est la seule différence existante entre les deux.

Il se pourrait que les deux patients de l'étude aient été dans le **même incubateur**. Cette hypothèse étant la seule concernant la possibilité de contact entre les deux cas, des analyses bactériologiques de l'incubateur ont été réalisées, plusieurs jours après la mort du deuxième patient. Les écouvillons fait dans l'incubateur et dans les divers endroits de la maternité n'ont permis d'isoler qu'une **flore de contamination banale**.

Les auteurs supposent que la contamination est survenue par **aérosols** dans l'incubateur. Ils n'ont pas réussi à confirmer cette hypothèse, malgré de nombreux prélèvements réalisés dans les incubateurs de l'hôpital et l'eau. Ils conseillent cependant de maintenir l'humidité au sein de ces appareils aussi basse que possible afin d'éviter toute contamination.

## B / 1965 : CAS DE MÉNINGITE NÉONATALE AU DANEMARK (JOKER AT AL., 1965)

### 1. Description du cas

La patiente est une fillette de **six jours**. Lors du premier tiers de gestation, la mère a souffert d'hyperémétisme, et lors du second tiers, elle a eu une infection vaginale traitée avec des antibiotiques. L'accouchement a duré 27 heures, et la patiente faisait **3,150 kg** à la naissance. Aucune anomalie n'est détectée alors.

Lors de son quatrième jour de vie, la fillette devient pâle, frissonne et a du mal à respirer. Deux jours après, elle présente des signes de **méningite**. Elle est ictérique et hypertonique, avec une fontanelle bombée, et des pleurs monotones. Sa température reste normale (en dehors d'un pic d'hyperthermie le septième jour). Une analyse de LCR est effectuée, puis renouvelée deux et cinq jours plus tard. Le LCR est trouble et un traitement antibiotique est entamé. Un **Enterobacter atypique** (jaune) est retrouvé lors de chaque ponction de LCR. Les cultures de sang, des écouvillons de la gorge et de fèces ne permettent pas d'isoler ce même microbe.

L'état général de la patiente s'améliore. Le traitement antibiotique est stoppé au bout de seize jours et elle rentre chez elle à 27 jours d'âge. La seule anomalie notée à cette époque est qu'elle est en opisthotonos lorsqu'elle pleure.

A deux mois d'âge, la patiente est admise de nouveau. Elle souffre de **convulsions** cloniques. Elle a pris du poids, et souffre depuis son premier séjour à l'hôpital d'hypermétrie. A l'admission ses extrémités sont hypertoniques, sa température est normale, la fontanelle non bombée, mais l'électro-encéphalogramme est anormal. Elle est mise sous phénobarbital, et les convulsions rétrocedent.

Dix jours plus tard, la fontanelle devient bombée, et une ponction sub-durale permet d'avoir du liquide jaune et trouble dont aucune bactérie n'est isolée.

Un **abcès cérébral** à gauche est mis en évidence, et une légère **dilatation du ventricule** cérébral gauche, avec lequel l'abcès communique. Une craniotomie est réalisée, et le liquide ponctionné est stérile.

Deux mois plus tard, la patiente souffre d'**hydrocéphalie**. Celle-ci est traitée chirurgicalement, mais l'enfant souffre tout de même de **retards mentaux et locomoteurs**.

### 2. Source et mode de transmission

Les auteurs pensent qu'un **travail de longue durée** favorise l'apparition ultérieure de méningite.

**C / 1979 : SEPTICEMIE A MACON, ETATS-UNIS (MONROE ET AL., 1979)**

Cette étude est le premier cas de septicémie néonatale sans méningite associée à *E. sakazakii*.

Le patient est un garçon de sept jours, né à terme après une gestation sans problèmes. Il est sorti de l'hôpital à quatre jours et revenu trois jours plus tard pour une suspicion de sepsis. Son examen d'entrée ne montrait qu'une légère irritabilité. Son examen clinique est bon, en dehors d'une numération blanche très basse (3 900/mm<sup>3</sup>).

*E. sakazakii* a été isolé à partir d'un échantillon de sang. La technique utilisée est une culture (milieu au sang, puis tryptone de soja) puis identification par tests biochimiques.

Le patient a été traité avec de l'ampicilline (75 mg toutes les 12 heures) et de la gentamicine (7,5 mg toutes les 12 heures). Après antibiogramme, il lui a été administré de l'ampicilline seule pendant dix jours (125 mg en intramusculaire toutes les 12 heures, puis 100 mg toutes les 8 heures). Après dix jours, son état était stabilisé. Le contrôle à deux mois d'âge n'a révélé aucune anomalie.

Les sources et modes de transmission dans ce cas sont inconnus. Les auteurs suspectent une **infection post-natale** du fait de l'incubation de six jours.

Tableau 26: récapitulatif des cas de méningites décrits par Urmenyi *et al.* (1961)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>a</sup>	Devenir
	Date	Age (jours)						
M	5-1958	11		40	Méningite		Oxytétracycline (11)	Décédé
F	6-1958	5		32	Méningite, urticaire	Jumeau, césarienne, placenta praevia		Décédé

Tableau 27: récapitulatif du cas décrit par Joker *et al.* (1965)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age (jours)						
F	1965	6	3,150		Méningite	Hydrocéphalie, abcès cérébral, complications lors de la gestation	?	Rémission (séquelles)

Tableau 28: récapitulatif du cas de septicémie (Monroe *et al.*, 1979)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>a</sup>	Devenir
	Date	Age (jours)						
M		7	2,600	A terme		Septicémie sans méningite	Ampicilline + gentamicine (7), Ampicilline seule	Rémission

<sup>a</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés

D / 1981 : MENINGOENCEPHALITE NECROSANTE A INDIANAPOLIS,  
ETATS-UNIS (KLEIMAN ET AL., 1981)

Le patient est une fille de **cinq semaines** souffrant d'une **méningite nécrosante** sévère. A l'admission, elle souffrait de fièvre, de bombement de la fontanelle et de convulsions. Aucune anomalie congénitale de l'appareil urinaire, digestif et nerveux central n'ont été notées.

L'analyse de LCR donnait les leucocytes à 15 600 par mm<sup>3</sup> (95% de PNN), les protéines à 295 mg/dl, et le glucose à 4 mg/dl. Le patient a été traité pour une méningite avec de l'ampicilline (400 mg/kg/j) et du chloramphénicol (100 mg/kg/j). *Enterobacter sakazakii* a été également isolé à partir de son LCR (culture sur milieu chocolat puis au sang, et identification par méthodes biochimiques). Seule l'ampicilline a alors été continuée par voie intraveineuse.

Le sixième jour, des cultures faites à partir de ponctions subdurales bilatérales ont permis d'isoler *E. sakazakii*. De la gentamicine (7,5 mg/kg/j) a alors été ajoutée.

Après quinze jours une **dilatation** importante des **ventricules** a été notée par tomodynamométrie. Les cultures du liquide ventriculaire étaient toujours positives après vingt et un jours de traitement, et des injections intra-ventriculaires de gentamicine (3 mg/j dans chaque ventricule) sont entreprises pendant dix jours. Cela a permis de négativer les cultures en 24 heures et après l'arrêt des antibiotiques.

A l'arrêt du traitement, le scanner montrait une **compartmentalisation** des ventricules et des abcès. Deux mois après, le diamètre de la tête a rapidement augmenté, nécessitant la mise en place d'un **shunt ventriculo-péritonéal**.

La patiente a survécu, mais a souffert de **retard mental et locomoteur** importants.

Tableau 29: Récapitulatif du cas de méningite nécrosante de Klieman *et al.* (1981)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>a</sup>	Devenir
	Date	Age						
F		5 sem.			Compartmentalisation ventriculaire, abcès, shunt ventriculo-péritonéal		Ampicilline + chloramphénicol (150), Ampicilline seule, + gentamicine (156) <sup>b</sup>	Rémission (séquelles)

<sup>a</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés

<sup>b</sup> La gentamicine a été administrée en intra-ventriculaire pendant 10 jours

## E / 1977-1981 : HUIT CAS DE MENINGITE ET DE SEPTICEMIE NEONATALE AUX PAYS-BAS

Après l'identification d'*Enterobacter sakazakii* comme une espèce à part entière en 1980 par Farmer *et al.*, des échantillons de sang et de LCR de patients, positifs pour *Enterobacter* ont été ré-analysés, pour déterminer si *E. sakazakii*, était isolé.

La culture se fait sur gélose de tryptone de soja, et l'identification par méthode biochimique. Ensuite le biotype et la détermination de la taille du plasmide ADN sont faits.

Vingt souches d'*Enterobacter* isolées d'échantillons de LCR de patients néerlandais de 1977 à 1981 ont été réanalysées. La même chose a été faite avec vingt-cinq souches d'*Enterobacter* isolées sur des échantillons de sang.

Au total, **cinq souches d'*E. sakazakii*** ont été isolées des échantillons de LCR et rien à partir du sang. Au cours de l'étude, trois nouveaux cas ont été identifiés. Ainsi, **huit cas** ont été étudiés (Muytjens *et al.*, 1983).

### 1. Etude des trois cas du cours de l'étude (Muytjens *et al.*, 1983)

#### a Cas 1

La patiente est une fillette de **3 jours**, dont la durée de gestation était de **39 semaines**, et le poids à la naissance de **2,400kg**.

Elle présentait un **méningomyélocoele** au niveau du sacrum. L'analyse du LCR était macroscopiquement trouble, avec un comptage leucocytaire à 37 200 par mm<sup>3</sup> (80% de PNN). Elle a été traitée avec du chloramphénicol (50 mg/kg toutes les 24 heures), puis avec de la gentamicine (5 mg/kg/j) en intraveineux et intra-ventriculaire. Son état a nécessité de la mettre sous ventilation assistée et couveuse, puis de faire une ponction ventriculaire (du pus sagneux est récolté). Elle est **décédée en 3 jours**.

*E. sakazakii* a été isolé à partir de son sang, son LCR, d'une ponction ventriculaire et de son encéphale.

#### b Cas 2

Le cas est un garçon de **5 jours**. Il a une **jumelle**. Tous les deux sont issus d'une **césarienne après 38 semaines** de gestation. Les membranes se sont rompues 45 minutes avec l'opération. Celle-ci s'est bien passée et l'état général des jumeaux est bon.

Le garçon souffrait de **méningo-encéphalite** et de **d'entérocolite nécrosante**. Il présentait une leucopénie (1 500/mm<sup>3</sup> dont 10% de PNN) et une thrombocytopénie. Les radiographies abdominales montraient de l'ascite et de l'air. Le LCR était trouble avec 1 000 leucocytes par mm<sup>3</sup>, majoritairement des neutrophiles.

Il est **décédé** malgré le traitement à base de gentamicine et de chloramphénicol. *E. sakazakii* a été isolé à partir du sang et du LCR.

#### c Cas 3

Au **cinquième jour** de vie, un garçon né après **36 semaines** de gestation, souffre d'une **méningite**. Les leucocytes dans le LCR ont une concentration de 3 300/mm<sup>3</sup>, les protéines 223 mg/dl et le glucose 1,8 mg/dl. *E. sakazakii* est isolé d'un prélèvement hémorragique de LCR, mais pas du

sang. Après l'administration de kanamycine et d'ampicilline, puis de gentamicine pendant deux semaines, le patient a **guéri**. *E. sakazakii* n'était plus isolé de son LCR.

Cependant, les **séquelles** sont graves (hydrocéphalie, retards locomoteurs et mentaux importants aboutissant au décès au bout de deux ans et demi).

Les autres cas de l'étude, trouvés de manière rétrospective sont décrits dans le tableau xx de synthèse de cette crise.

## 2. Epidémiologie

### a Facteurs prédisposants

L'étude de ces cas montre que l'incidence des méningites néonatales est plus importante chez les nouveaux-nés de **faible poids**. D'ailleurs, un des deux patients qui a guéri était le plus lourd du groupe (2,830kg).

Le taux de mortalité est de **80%** (Muytjens *et al.*, 1983).

### b Source et mode de transmission

#### *$\alpha$ Infection ante-natale*

La courte période d'incubation est en accord avec l'hypothèse d'une transmission lors de **l'accouchement**. Cependant des patients issus de **césarienne** n'ont pas eu de passage dans la filière pelvienne. Une infection ascendante est également improbable chez ces individus (d'autant plus pour celui qui est issu d'une césarienne avant même la rupture des membranes ; cf. tableau xx).

Les cultures en provenance de la mère des jumeaux (échantillons vaginaux, cervicaux et fécaux), ainsi que celles des patients (échantillons de peau, nez, oreille externe, ombilic, anus, contenu digestif) se sont révélées négatives pour la recherche d'*E. sakazakii*.

Les auteurs pensent donc que l'infection est **post-natale** (Muytjens *et al.*, 1983).

#### *$\beta$ Préparation en poudre pour nourrissons*

Ainsi, *E. sakazakii* a été isolé de la **brosse** servant à faire la **vaisselle**, la **cuillère** servant à mélanger le lait reconstitué, et du **lait reconstitué**. Cependant, la préparation en poudre pour nourrissons et l'eau utilisée pour préparer le lait, n'ont pas permis la culture de la bactérie.

Aucune différence morphologique, biochimique ou de sensibilité aux antibiotiques n'a été mise en évidence entre ces isolats environnementaux et ceux des patients (sauf une différence de biogroupe chez un des huit patients). Les **profils plasmidiques** indiquent que trois ou quatre des cinq patients d'un hôpital étaient infectés par la même souche. Les profils plasmidiques du dernier patient et des isolats environnementaux sont différents, ce qui prouve que les souches environnementales n'ont pas provoqué l'infection (Muytjens *et al.*, 1983).

A ce stade le mode de transmission est toujours inconnu. Cependant, comme aucun cas n'a ensuite été observé, après le remplacement de la poudre de lait par une formule liquide, les auteurs sont presque sûrs que leur hypothèse est la bonne (Muytjens *et al.*, 1990).

Il se pourrait que les profils des souches isolées chez les patients mettent en évidence une relation épidémiologique. Les auteurs penchent pour un **réservoir commun** de la souche évoluant pendant cette période ou une prévalence locale, justifiée par le fait que cinq patients ont côtoyé le même hôpital et que les infections ont été contractées dans un délai court.

Il faut aussi noter que deux patients de cette étude présentaient à la fois une méningite et une entérocolite nécrosante. L'origine de cette dernière n'est pas connue (pas de porte d'entrée ombilicale

ou autre infection expliquant la pathologie). Les auteurs supposent que la bactérie a atteint les méninges *via* le sang à partir du foyer intestinal (Muytjens *et al.*, 1983).

Tableau 30: Récapitulatifs des cas décrits par Muytjens *et al.* (1983)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>a</sup>	Devenir
	Date	Age (jours)						
M	9-1977	5	2,830	36	Couveuse		Ampicilline + kanamycine (5), gentamicine (15)	Rémission (séquelles) <sup>e</sup>
F	4-1979	3	2,400	39	Méningomyélocoele, couveuse	Septicémie	Chloramphénicol (3), gentamicine (1) <sup>d</sup>	Décédé
F <sup>b</sup>	4-1981	3	1,670	32	Membranes rompues (6j) <sup>c</sup> , couveuse		Ampicilline + gentamicine (7)	Décédé
M	4-1981	4	1,900	32	Membranes rompues (6j), couveuse		Ampicilline + gentamicine (10)	Décédé
F	7-1981	5	2,690	à terme		Septicémie	Ampicilline + gentamicine (1,5) Chloramphénicol + gentamicine (2)	Décédé
M	2-1978	5	2,085	38	Césarienne, jumeaux, couveuse	Septicémie, entérocolite nécrosante	Ampicilline + gentamicine (4), chloramphénicol + gentamicine (1)	Décédé
F	7-1979	5	1,370	prématuré	Césarienne, placenta praevia, couveuse	Septicémie, entérocolite nécrosante, saignement intra-ventriculaire, hémorragie	Ampicilline (10), gentamicine (5)	Décédé
F	9-1979	9	0,850	30	Couveuse	Septicémie		Rémission (séquelles) <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés

<sup>b</sup> Jumelle du garçon suivant

<sup>c</sup> 6j : les membranes se sont rompues 6 jours avant le terme

<sup>d</sup> La gentamicine a été administrée en intraveineux et intraventriculaire

<sup>e</sup> Le patient a eu de l'hydrocéphalie et des retards mentaux et physiques sévères. Il est mort après 2,5 ans

<sup>f</sup> Le patient était atteint d'hydrocéphalie et est mort de bronchopneumonie après 16 mois

F / 1980 : SEPTICEMIE CHEZ UN ADULTE (JIMENEZ ET GIMENEZ, 1982)

Le patient est un homme âgé de 76 ans, qui a été admis en urgence pour un état de choc, avec une pression artérielle basse, et une alcalose respiratoire. *E. sakazakii* a été isolé de son urine et de son sang. Un traitement à base d'ampicilline et de gentamicine a été effectué, ce qui a permis la remissions clinique et microbiologique en quatre jours.

G / 1984 : 11 CAS DE COLONISATION DE NOUVEAUX-NES A ATHENES, GRECE (ARSENI ET AL., 1987)

Cette crise, en Grèce, correspond à l'isolement à partir de onze nouveaux-nés d'*Enterobacter sakazakii* dans une unité de soins intensifs.

L'isolement se fait à partir de **cultures systématiques** d'écouvillons de la gorge et rectaux. Des cultures de sang sont aussi faites. L'identification se fait par méthode biochimique.

1. Description des cas

a Cas 1 :

Le patient est une fille **prématurée** (age non communiqué), qui pesait **1,000kg** à la naissance. Elle a été admise en soins intensifs deux jours plus tôt pour un **Syndrome de Détresse Respiratoire** (SDR). Le 10 septembre 1984, *E. sakazakii* a été isolé de ses écouvillons de la gorge, rectaux et du liquide d'aspiration trans-trachéale. *Pseudomonas* spp. et *Serratia* spp. ont également été isolés. Elle a été traitée avec de la céfoxitine et de la gentamicine et a survécu.

b Cas 2 :

Le patient est un garçon **prématuré** qui pesait **1,500kg** à la naissance. Il a été admis cinq jours plutôt pour un **SDR** également. Le 10 septembre, *E. sakazakii* et *Pseudomonas* spp. ont été isolés de ses écouvillons rectaux et de la gorge. Il a été traité avec de la céfoxitine et a survécu.

c Cas 3 :

Le patient est un garçon qui pesait **1,600kg** à la naissance, admis pour **SDR** le 11 septembre 1984. Le 13 septembre, *E. sakazakii* est isolé de ses écouvillons de la gorge. Il est traité avec de la pénicilline et **décède** dix-huit jours plus tard.

d Cas 4 :

Le patient est un garçon qui pesait **2,040kg** à la naissance. Il est admis le 8 septembre et le 11, *E. sakazakii* et *Pseudomonas* spp. sont isolés de sa gorge de du liquide d'aspiration trans-trachéale. Il présente des symptômes de **sepsis** et est traité avec de la céfoxitine et de la gentamicine. Deux jours plus tard, il **décède**.

e Cas 5:

Le patient est un garçon qui pesait **2,990kg** à la naissance. Le 24 septembre, huit jours après son admission, il présente de l'**anoxie**. *E. sakazakii*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. et *Candida* spp. sont isolés de sa gorge et son rectum. Il est **décédé** malgré un traitement à base d'amikacine et de pénicilline.

f Cas 6:

Le patient est un garçon qui pesait **1,750kg** à la naissance. Il souffre de **SDR**, et le 25 septembre, *E. sakazakii*, *Klebsiella* spp. et *Candida* spp. ont été isolés de ses écouvillons de la gorge. Il a été traité avec de l'amikacine et est décédé.

g Cas 7:

Le patient est une fille qui souffrait de **septicémie**. Le 26 septembre, *Pseudomonas aeruginosa* a été isolé de son sang. *E. sakazakii*, *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. et *Candida* spp. ont été isolés d'écouvillons rectaux. Elle a guéri après un traitement avec de l'amikacine et de la pénicilline.

h Cas 8:

Le patient est un garçon qui pesait **2,680kg** à la naissance. Comme la précédente, il souffrait de **septicémie**, avec isolement d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* à partir de son sang, et d' *E. sakazakii*, *Pseudomonas* spp. et *Enterobacter cloacae* à partir d'écouvillons rectaux. Il a survécu avec un traitement à base d'amikacine.

i Cas 9:

La patiente est une fille qui souffre de **septicémie** le 27 septembre 1984. *E. sakazakii* a été isolée à partir du liquide d'aspiration trachéale. Elle a été traitée avec de l'amikacine et de la céfoxitine et a guéri.

j Cas 10:

Le patient est un garçon qui pesait **2,160kg** à la naissance. Le 4 octobre, il est atteint d'une **méningite**. Les cultures à partir de son sang et LCR sont revenues stériles. *E. sakazakii*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter cloacae* et *aerogenes* ont été isolés à partir des écouvillons de la gorge et rectaux. Il a survécu avec de la céfoxitine et du chloramphénicol.

k Cas 11:

Le patient est un garçon qui pesait **2,580kg** à la naissance. Il souffre de **défauts congénitaux**. Le 17 octobre 1984, *E. sakazakii* et *Pseudomonas* spp. ont été isolés de sa gorge. Il est traité avec de la céfoxitine et guérit

## 2. Source et mode de transmission

*Enterobacter sakazakii* n'a plus été retrouvé pendant un an après cette crise. *E. sakazakii* n'a jamais été isolée à partir de l'environnement ou des mains du personnel soignant. La source et le mode de contamination demeurent **inconnus**.

## 3. Autres cas d'infections à *E. sakazakii* en Grèce

*Enterobacter sakazakii* avait été isolé la première fois en Grèce en 1982, dans les fécès d'enfants thalassemiques. En juin 1984, il a été retrouvé dans la gorge et les fécès de trois nouveau-nés, dont un est mort. Enfin, un an après la crise décrite ici, le microorganisme a été isolé chez une fillette leucémique de trois ans souffrant de septicémie et chez un garçon de quatre ans souffrant de fièvre et de diarrhée. Ces deux derniers ont guéri.

*E. sakazakii* n'a pas été isolé sur le sang, LCR ou pus d'aucun des patients. Cependant, cinq patients avaient des signes de septicémie et quatre sont morts. De plus, les auteurs précisent que l'isolement d'*E. sakazakii* à partir du sang ou du LCR est rare.

Tableau 31: Récapitulatif des 11 cas de colonisation de nouveaux-nés (Arseni *et al.*, 1987)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
F	10-9-1984		1,000	Prématuré		SDR <sup>a</sup>	Cefoxitine + gentamicine	Rémission
M	10-9-1984		1,500	Prématuré		SDR	Cefoxitine	Rémission
M	13-9-1984		1,600			SDR	Pénicilline	Décédé
M	13-9-1984		2,070			Septicémie	Cefoxitine + gentamicine	Décédé
M	24-9-1984		2,990			Anoxie	Pénicilline + amikacine	Décédé
M	25-9-1984		1,750			SDR	Amikacine	Décédé
F	26-9-1984					Septicémie	Pénicilline + amikacine	Rémission
M	26-9-1984		2,680			Septicémie	Amikacine	Rémission
F	27-9-1984					Septicémie	Cefoxitine + amikacine	Rémission
M	4-10-1984		2,160			Méningite	Cefoxitine + chloramphénicol	Rémission
M	17-10-1984		2,580			Affection congénitale	Cefoxitine	Rémission

<sup>a</sup> Syndrome de Détresse Respiratoire

H / 1984 : DEUX CAS DE MENINGITES NEONATALES A BOSTON ET LA NOUVELLE ORLEANS, USA (WILLIS ET ROBINSON, 1988)

Willis et Robinson (1988) décrivent deux cas de méningites néonatales provoquées par *E. sakazakii*. Ils n'ont pas cherché à identifier la source ou le mode de transmission, mais seulement décrit avec précision leurs cas cliniques.

1. Cas 1 :

Le patient est un garçon né à terme de quatre semaines. Il est en détresse respiratoire et peu alimenté. Il a de la fièvre, est irritable et a une fontanelle antérieure bombée.

Le LCR contient 4 200 leucocytes par mm<sup>3</sup> (85% de PNN), 20 000 globules rouges par mm<sup>3</sup>, le glucose est à 8 mg/dl, et les protéines à 685 mg/dl. A l'examen microscopique, aucun micro-organisme n'est observé, mais *E. sakazakii* est cultivé du sang et du LCR. Un traitement à base d'ampicilline (250 mg/kg/j en quatre fois) et de gentamicine (7,5 mg/kg/j en trois fois).

Au troisième jour, le patient souffre de **convulsions**, contrôlées avec du phénobarbital. L'évolution est favorable le quatrième jour.

Le huitième jour, le patient souffre de fièvre, d'irritabilité, et de remplissage de la fontanelle antérieure. Une ponction lombaire est effectuée, et le LCR contient 8 200 cellules nucléées par mm<sup>3</sup> (98% de PNN), le glucose est inférieur à 1 mg/dl, et les protéines à 720 mg/dl. A l'examen microscopique des bacilles gram négatifs sont visibles. La gentamicine est alors remplacée par du moxalactam (100 mg/kg en dose d'attaque, puis 50 mg/kg toutes les 4 heures).

L'examen tomodynamétrique montre de grandes lésions bilatérales et frontales de faible densité siégeant dans la substance blanche et le cortex. Elles sont évocatrices d'**infarctus cérébral** massif.

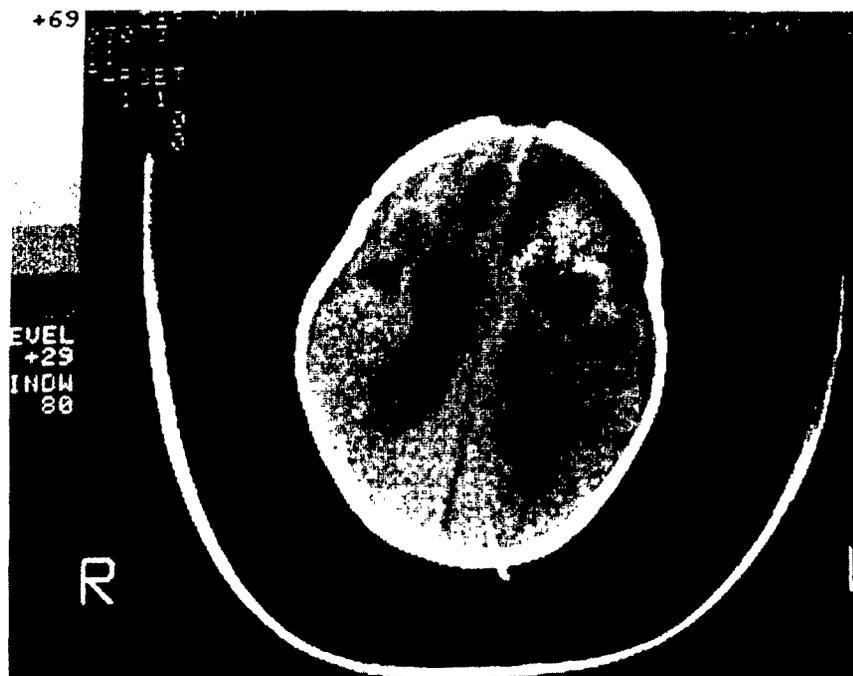


Figure 12: Scanner cérébral du cas 1 décrit par Willis et Robinson

*E. sakazakii* est isolé de nouveau. La culture est négative trois jours plus tard, mais le scanner montre une destruction des lobes frontaux avec des altérations kystiques adjacentes des ventricules latéraux (cf. figure 1).

Au vingtième jour d'hôpital, une récurrence est notée (fièvre et fontanelle bombée). 50 ml de liquide étant jaune trouble est aspiré d'un kyste frontal. Les cultures de LCR et du liquide d'aspiration sont négatives. Une dose de 3 mg de gentamicine est administrée en intra-ventriculaire, et l'état de l'enfant s'améliore.

A l'âge de 3 mois et demi, le patient développe une **hydrocéphalie** et un shunt ventriculo-péritonéal est réalisé. A 9 mois et demi, il a une audition et une vision diminuées, et souffre de **tétraplégie spastique**.

## 2. Cas 2 :

Le patient est un garçon de **huit jours**, né après **37 semaines** de gestation, et pesant alors **2,040 kg**.

A l'âge de huit jours, il est léthargique, a peu d'appétit et de la fièvre. Son LCR contient 3 030 cellules nucléées par mm<sup>3</sup> (96% PNN), plus de 3 000 globules rouges par mm<sup>3</sup>, 11 mg/dl de glucose et 900 mg/dl de protéines. Des bacilles gram négatifs sont visibles après coloration, et *E. sakazakii* est identifié biochimiquement à partir du sang et du LCR.

De l'ampicilline et de la gentamicine sont administrées en intraveineux. Le troisième jour, l'état du patient s'aggrave, et du moxalactam remplace la gentamicine. Après six jours, la fièvre tombe.

Le onzième jour une culture de LCR est négative. A trois semaines, un scanner cérébral montre des zones étendues de faible densité et des ventricules très dilatés. Le traitement antibiotique est stoppé, mais le vingt-quatrième jour, le patient est en hypothermie, en détresse respiratoire et en bradycardie. Une ventriculostomie d'urgence est entreprise. Le liquide obtenu est trouble, xanthochromique, et aucune bactérie n'est visible ou cultivée. Etant donné le caractère purulent du liquide, de l'ampicilline et de la gentamicine sont administrées pendant 14 jours.

Le patient demeure afebrile mais présente une hémiplégié droite, et un regard dévié à droite persistants. Le mois suivant l'hospitalisation, plusieurs ventriculostomies sont réalisées, à cause d'occlusions répétées par un liquide épais et purulent. Après 10 semaines un examen tomographique révèle une large lésion kystique dans le lobe frontal gauche, dont le liquide d'aspiration est purulent, mais stérile.

Du chloramphénicol est administré pendant 6 semaines supplémentaires par voie orale. De la gentamicine est ajoutée à la septième semaine d'hospitalisation et continuée 6 semaines. Le liquide ventriculaire devient limpide progressivement en trois mois et la ventriculostomie est finalement remplacée par un shunt ventriculo-péritonéal.

L'enfant rentre chez lui à cinq mois, avec une **tétraplégie spastique** et un **développement mental très retardé**.

## 1 / 1986-1987 : TROIS CAS DE MENINGITES NEONATALES 0 REYKJAVIK, ISLANDE

Trois cas d'infection dues à *Enterobacter sakazakii* ont eu lieu, au département de soins intensifs de l'hôpital de Reykjavik en Islande, au cours des années 1986 et 1987, pendant neufs mois (Biering *et al.*, 1989).

## 1. Etude des cas

### a Cas 1 :

Le patient est un garçon **prématuré**, né en mars 1986, pesant **3,144kg** à la naissance. Il est nourri avec le lait de sa mère et du lait reconstitué. **Cinq jours** après sa naissance, son état est évocateur d'une **septicémie**. Son LCR contient beaucoup de PNN, et *E. sakazakii* est isolé de son sang et LCR.

Le patient est mis sous ampicilline et gentamicine en intraveineuse, puis céfuroxime après 12 heures. Après deux semaines de traitement, *E. sakazakii* est toujours isolé des cultures faites à partir du liquide ventriculaire. En conséquence, de la gentamicine est ajoutée en intra-ventriculaire, et du chloramphénicol en intraveineux. L'enfant est sorti de l'hôpital après trois mois de traitement.

Le scanner permet de mettre en évidence des cavités liquidiennes dans l'encéphale. Le patient souffre de **retards mentaux et locomoteurs** très marqués. Il est tétraplégique.

### b Cas 2 :

Le patient est un garçon né **à terme**, de **cinq jours**, qui pesait **2,508kg** à la naissance. Il souffre du syndrome de Down et d'une imperforation anale. Le lendemain de sa naissance, une anoplastie est effectuée. Il est alimenté avec du lait reconstitué.

A l'âge de cinq jours, l'état général du patient se dégrade. Une anomalie cardiaque congénitale avec une insuffisance cardiaque associée. Le LCR contient de nombreux PNN, et des germes Gram négatif sont visibles. *E. sakazakii* est isolé du LCR, mais *E. coli* est isolé du sang. Un traitement à base d'ampicilline et de céfoxatine est mis en place. Malgré cela, l'état général du patient s'est dégradé rapidement et il est **décédé** cinq jours après sa naissance.

L'autopsie a révélé une **méningite aiguë** et des hémorragies dans les deux ventricules latéraux.

### c Cas 3 :

Le patient est un **jumeau** garçon **prématuré**, né en janvier 1987 et pesant **3,308kg** à la naissance. Il est en bonne santé et nourri avec du lait maternel associé à du lait reconstitué.

Le cinquième jour, son état se dégrade. Il est somnolent, a de la fièvre. Sa ponction de LCR révèle un liquide trouble, contenant beaucoup de leucocytes, principalement des PNN. *E. sakazakii* est isolé de son LCR, mais pas de son sang.

Le patient est traité avec de l'ampicilline et de la céfotaxime. Son état général s'améliore rapidement et les cultures de LCR se négativent. Les antibiotiques sont arrêtés après trois semaines.

L'examen tomographique met en évidence une cavité liquidienne dans le lobe frontal gauche, alors qu'il n'y a pas de signes cliniques de déficience neurologique.

Depuis, l'enfant a développé un léger **retard mental** et est **épileptique**.

## 2. Source et mode de transmission

La recherche de la source de contamination est effectuée par culture sur gélose au sang et gélose de MacConkey. L'identification se fait ensuite par méthode biochimique.

### a Source d'*E. sakazakii*

*E. sakazakii* a ainsi été isolé d'une **bouteille de lait reconstitué** qui était stockée dans le réfrigérateur depuis un temps indéterminé, mais dans aucun spécimen reconstitué récemment et immédiatement mis en culture. **Après incubation** à 36°C pendant 4 heures, vingt-trois souches d'*Enterobacter sakazakii* ont été isolées des échantillons faits à partir de cinq paquets de poudre de lait. Deux autres paquets n'ont pas permis la culture d'*E. sakazakii*.

La bactérie a aussi été isolée d'écouvillons anaux d'un enfant en bonne santé. Les souches isolées des quatre nouveaux-nés, et vingt-deux des vingt-trois souches isolées de la poudre de lait avaient un profil plasmidique et un antibiogramme identique (Clark *et al.*, 1990).

### b Mode de transmission

#### *α Lait reconstitué*

Comme dans les crises précédentes, l'hypothèse d'une infection intra-utérine est peu probable, du fait du temps d'incubation. Biering et al (1989) suspectent le **lait reconstitué**. En effet, tous les enfants malades ont été nourris à partir de poudre de lait. Cependant, d'autres enfants, non malades, et notamment le jumeau d'un des patients, également et n'on pas souffert de méningite... De plus, l'isolement d'*E. sakazakii* dans les écouvillons anaux d'un enfant mettent en évidence une colonisation sans invasion.

#### *β Protocoles de reconstitution du lait*

La bactérie est présente dans la poudre de lait en faible nombre, puisque seules les formules reconstituées qui ont été incubées permettent sa mise en évidence. Deux des patients étaient bien portants à la naissance, et il semble peu probable qu'ils aient été réceptifs à un si petit nombre de bactéries. Les auteurs suspectent que les **protocoles de reconstitution du lait** à partir de la poudre ne soient pas toujours respectés. Il a d'ailleurs été trouvé que les bouteilles de lait reconstitué sont parfois maintenues pendant des laps de temps assez conséquents à 35-37°C.

#### *χ Préparation en poudre pour nourrisson*

L'étude de Clark *et al.* (1990) a permis de mettre en évidence de façon certaine que la source de contamination était la préparation en poudre pour nourrisson.

### 3. Importance relative d'*E. sakazakii*

Biering et al (1989) soulignent enfin le fait que seule *Enterobacter sakazakii* a été recherché dans le lait, mais que d'autres *Enterobacteriaceae* ont été retrouvés (*E. cloacae* et *E. agglomerans* entre autres). Il convient donc de s'interroger sur quelques éléments. *E. sakazakii* est-il fondamentalement différent des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont aussi retrouvés dans les poudres de lait, ou bien son mode de transmission a t'il seulement été mis en évidence parce que c'est un pathogène inhabituel ? Dans ce cas, est-il possible que d'autres espèces des *Enterobacteriaceae* causant des infections néonatales, soient aussi transmises par la poudre de lait ?

Tableau 32: récapitulatif des cas de Willis et Robinson (1988)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
M	1984	28 j			Méningite	Hydrocéphalie	Ampiciline + gentamicine + moxalactam	Rémission (séquelles)
M	1984	8 j	2,040	37	Méningite		Ampiciline + gentamicine + moxalactam	Rémission (séquelles)

Tableau 33: Récapitulatif de Biering *et al.*(1989)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux <sup>a</sup>	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
M	3-1986	5	3,144	36	Septicémie, méningite		Ampicilline + gentamicine + céfuroxime (5), + chloramphénicol (19)	Rémission (séquelles)
M	12-1986	5	2,508	A terme	Méningite	Malformation cardiaque	Apicilline + céfotaxime (5)	Décédé
M	1-1987	5	3,308	38	Méningite	Jumeau	Apicilline + céfotaxime (5)	Rémission (séquelles)

<sup>a</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés

## J / 1988: QUATRE INFECTIONS NEONATALES A MEMPHIS, USA)

La crise a eu lieu dans l'unité de soins intensifs de l'Hôpital de Memphis, dans le Tennessee, pendant une période de six semaines en février et mars 1988. Les quatre nouveau-nés atteints présentaient une culture positive d'*Enterobacter sakazakii* dans leur matière fécale. A partir de cette constatation, une analyse de procédures d'alimentation, et une étude rétrospective de colonisation de patients par *E. sakazakii* ont été faites (Simmons *et al.*, 1989).

### 1. Description des cas (Simmons *et al.*, 1989)

#### a Cas 1:

Le patient est né après **28 semaines** de gestation, et pesait **0,780kg** à la naissance. Il a été nourri avec du lait reconstitué à partir de poudre dès son sixième jour de vie.

A l'âge de **28 jours**, le patient présente une **septicémie**, une distension abdominale et une diarrhée sanglante.

*E. sakazakii* est isolé de son sang et de ses fécès. *Enterococcus* et *Pseudomonas maltophilia* sont aussi isolés de fécès.

#### b Cas 2:

Le patient, né après **29 semaines et demi** de gestation, pèse **0,950kg** à la naissance. Il a été nourri avec du lait reconstitué dès son quatrième jour de vie.

A l'âge de **57 jours**, il souffre de distension abdominale, accompagnée d'hémochésis, et de septicémie.

Aucune culture à partir de son sang a été effectuée. *E. sakazakii* a été isolé de ses fécès et de son urine (obtenue par cystocentèse).

#### c Cas 3:

Le patient est un enfant pesant **0,850kg** à la naissance. Il est **prématuré** (27 ou 28 semaines de gestation), et alimenté avec du lait reconstitué depuis qu'il a sept jours.

**Cinquante deux jours** après sa naissance, le patient est atteint de septicémie et de diarrhée. *E. sakazakii* est isolé de son sang et de ses matières fécales. *P. maltophilia* est isolé de son LCR (ce pathogène étant très rare à ce niveau, les auteurs pensent que c'est un contaminant).

#### d Cas 4:

Le patient, né après **34 semaines et demi** de gestation, pesait **1,270kg** à la naissance et a été nourri avec du lait reconstitué à partir de son cinquième jour de vie.

A l'âge de **13 jours**, il présente une diarrhée sanglante. *E. sakazakii* est isolé de ses fécès.

#### e Autres cas antérieurs:

Après la crise décrite au dessus, les auteurs ont cherché des cas rétrospectifs. **Trois autres nouveau-nés** ont été identifiés. Tous les cas recensés provenaient du service de soins intensifs

néonatal. Le premier cas datait de février 1988. Sur ces trois patients, deux avaient été alimentés par la poudre de lait mise en cause. Le troisième enfant présente un mode de contamination inconnu (ou bien des données d'alimentation inexactes).

## 2. Analyse épidémiologique

### a Source de transmission

Les quatre patients (cas 1 à 4) ont été alimenté avec la **même préparation de poudre de lait**: un hydrolysate de protéine en poudre mélangé dans un mixeur avant utilisation. Les écouvillons du **mixeur** ont permis l'isolement d'*E. sakazakii*, *Pseudomonas fluorescens* et *P. maltophilia*. Après la crise, le mixeur a été retiré du procédé de reconstitution du lait, jusqu'à ce qu'une méthode de stérilisation de la machine entre les utilisations soit mise en place. *E. sakazakii* n'a plus été responsable de pathologie dans l'unité (Simmons *et al.*, 1989).

### b Facteurs de risque

Les facteurs de risques d'infections causées par *E. sakazakii* ont été cherchés. La **préparation de lait reconstituée** en cause est celle spécifiquement donnée au enfants **prématurés**, ou à ceux intolérants aux autres formules. Ainsi les enfants alimentés avec ce produit sont très sensibles et prématurés. Quatre enfants parmi cinq recevant cette préparation ont présenté une culture positive pour *E. sakazakii*, alors qu'aucun de quarante enfants ne recevant pas ce produit présentaient une culture positive. L'enfant ayant une culture négative alors qu'il recevait la préparation en cause était en fait né à terme, mais souffrait de l'hépatite B (Simmons *et al.*, 1989).

### c Mode de transmission

Dans cette crise, le mode de transmission d'*E. sakazakii* est de nouveau mis en évidence. La **relation** de causalité est **significative** entre l'exposition à la poudre de lait et la présence d'*E. sakazakii* ( $p=0,00059$ ). De plus, *E. sakazakii* a été isolé d'une boîte de préparation de poudre de lait pour nourrissons entamée (Simmons *et al.*, 1989).

Clark *et al.* (1990) ont mis en évidence de la même façon que dans la crise de Biering *et al.* (1989) que les **souches** isolées dans la poudre de lait et celles isolées chez les patients sont les **mêmes**.

De plus, Simmons *et al.* (1989), ont démontré qu'une fois que le lait était reconstitué, *E. sakazakii* **se multipliait et survivait mieux** que les autres contaminants de la poudre (notamment *E. cloacae*).

La contamination des poudres de lait étant fréquente, Simmons *et al.* (1989) conseillent de respecter scrupuleusement les **protocoles de préparation** des laits reconstitués.

## K / 1988 : QUATRE INFECTIONS A ENTEROBACTER SAKAZAKII EN ESPAGNE (REINA ET AL., 1989)

Ces quatre cas concernent deux enfants et deux adultes, et présentent un clinique assez atypique.

### 1. Description des cas

#### a Cas 1 :

Le patient est un garçon de **dix jours**, souffrant d'une **conjonctivite**. Il est né **prématuré**. *E. sakazakii* est isolé du liquide conjonctival en quantité abondante. Le traitement se fait avec de l'ampicilline et de la gentamicine et le patient guéri.

#### b Cas 2 :

Le patient est un garçon de **sept ans** n'ayant pas de pathologie sous-jacente, et souffrant d'une **appendicite suppurée**. *E. sakazakii* est isolé en grande quantité du liquide péritonéal. Il est soigné avec de la céfoxitine et de la gentamicine et guéri.

#### c Cas 3 :

Le patient est un homme âgé de **20 ans**, et ne souffre pas de pathologie intercurrente. Il a une **plaie** à l'aine et *E. sakazakii* est cultivé en petite quantité de l'exsudat. Après traitement (céfoxitine et gentamicine), le patient se remet.

#### d Cas 4 :

La patiente est une femme de **32 ans** souffrant de **leucémie**. Elle a une **plaie** à un doigt, dont l'exsudat permet la culture abondante d'*E. cloacae*, et faible d'*E. sakazakii* et de *S. epidermidis*. L'association de l'amikacine et de la carbenicilline permet la guérison.

### 2. Source et mode de contamination

Les auteurs pensent que le mode de contamination du premier cas est le passage dans l'**incubateur**, du deuxième cas est d'origine **alimentaire** et des ceux cas de plaie est une **contamination secondaire** (une épine de rose pourrait être en cause dans le cas).

Tableau 34: Récapitulatif des cas de Simmons *et al.* (1989)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
M	1988	28	0,780	28	Septicémie, diarrhée sanglante			
M	1988	57	0,950	29,5	Septicémie, hémochésis			
M	1988	52	0,850	27 ou 28	Septicémie, diarrhée			
M	1988	13	1,270	34,5	Diarrhée sanglante			

Tableau 35 : Récapitulatif de cas de Reina *et al.* (1989)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
M	1988 ?	10 jours		Prématuré	Conjonctivite		Ampicilline + gentamicine	Guérison
M	1988 ?	7 ans			Appendicite suppurée		Céfoxitine + gentamicine	Guérison
M	1988 ?	20 ans			Plaie		Céfoxitine + gentamicine	Guérison
F	1988 ?	32 ans			Plaie	Leucémie	Amikacine + carbenicilline	Guérison

Tableau 36: Cas décrit par Noriega *et al.* (1990)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
F	1990 ?	6 mois			Septicémie (+ <i>L. mesenteroides</i> )	Atrésie jéjunale congénitale	Vancomycine + ampicilline + gentamicine	Guérison

## L / 1990 : INFECTION NOSOCOMIALE A BALTIMORE, USA (NORIEGA ET AL., 1990)

Les auteurs décrivent ici un cas sporadique d'une **septicémie** conjointe à *E. sakazakii* et à *Leuconostoc mesenteroides* résultant d'une contamination extrinsèque de la préparation pour nourrissons (cf. tableau xx).

### 1. Description du cas

La patiente est une fillette de **six mois**, qui avait subi une chirurgie digestive pour atrésie congénitale du jéjunum à l'âge de un jour. Après cette opération, elle avait été alimentée par voie parentérale, puis a subi une laparotomie à l'âge de 52 jours à cause d'adhérences provoquant des obstructions intestinales. Depuis qu'elle a trois mois, elle est nourrie avec une préparation pour nourrisson par voie orale.

A l'âge de six mois, son état se dégrade, avec des vomissements, de la fièvre et de l'irritabilité. Des cultures sanguines permettant d'isoler *Enteococcus faecium* sont faites, et de la vancomycine est commencée. Comme l'état clinique ne s'améliore pas, une nouvelle culture sanguine est effectuée, ce qui permet d'isoler *E. sakazaki* et *L. mesenteroides*. De l'ampicilline et de la gentamicine sont ajoutées. Deux jours plus tard, les cultures de sang reviennent stériles.

Le traitement est continué dix jours, et la patiente retourne chez elle sans problème.

### 2. Source et mode de transmission

Comme il a été démontré que la source d'*E. sakazakii* est la préparation en poudre pour nourrissons, les auteurs ont analysé celle qui avait été utilisée chez la patiente. Quand celle-ci était reconstituée dans un bouillon de culture, celle-ci revenait négative. Cependant, les écouvillons provenant du **mixeur** servant à la préparer, et la **formule reconstituée** au sein de l'unité de pédiatrie donnaient des cultures positives pour les deux micro-organismes. Les profils biochimiques étaient semblables, ce qui laisse penser que ce sont bien les mêmes isolats.

Huit autres patients de l'unité recevaient cette même poudre, et aucune culture n'est revenue positive, chez aucun d'entre eux.

Bien que les bactéries n'aient pas été isolées de la préparation de poudre de lait pour nourrissons, la **contamination extrinsèque par le mixeur**, laisse présager que celui-ci a été contaminé en premier lieu par une préparation pour nourrissons.

### 3. Protocole de reconstitution des poudres de lait

Les auteurs conseillent de prendre particulièrement garde lors de la reconstitution des poudres de lait. Après avoir vérifié que cela ne modifiait pas ses propriétés, ils ont décidé de **pasteuriser** à nouveau la préparation une fois reconstituée, et de la conserver au réfrigérateur. Ils ont aussi fait nettoyer manuellement le mixeur après chaque usage. Depuis, ils n'ont plus eu de cas.

Ils pensent que l'utilisation de **formule stérilisée liquide** pourrait être une solution, mais cela présente le désavantage de limiter de manière importante la gamme nutritionnelle disponible. C'est également une solution plus coûteuse et nécessitant un capacité de stockage supérieure.

### M / 1990 : OSTÉOMYÉLITE DU PIED DANS L'OKLAHOMA

Murray *et al.* (1990) décrivent un cas d'ostéomyélite due à *E. sakazakii* et *Serratia liquefaciens* chez un garçon de 16 ans après une plaie ponctiforme du pied.

Le patient s'est blessé le pied avec une **brindille de bois** au travers de sa chaussure. La plaie se situe sur la plante du pied gauche, un peu latérale. Elle est initialement jolie, et une prophylaxie antitétanique est réalisée, et de la céphalexine sur dix jours. Six semaines après la blessure, la plaie produit un liquide purulent jaunâtre, et de l'ostéolyse est visible à la radiographie (figure 2).



Figure 13: Ostéomyélite due à *E. sakazakii* et *Serratia liquefaciens* (Murray *et al.*, 1990)

Un débridement chirurgical est effectué. Aucun corps étranger n'est retrouvé, mais *E. sakazakii* et *S. liquefaciens* sont cultivés à partir de l'os. De la ticarcilline et de la tobramycine sont administrées en intraveineux pendant trois semaines, puis du sulfamide-triméthoprime par voie orale.

La plaie suppure de nouveau deux semaines plus tard, et le patient subit un second débridement chirurgical. Les mêmes bactéries sont isolées. Du sulfamide-triméthoprime est administré pendant huit semaines par voie orale. Le suivi effectué six mois plus tard ne montre plus de signes d'ostéomyélite.

*Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus* sont les germes les plus souvent isolés lors d'ostéomyélite. Il faut remarquer que les deux organismes isolés dans ce cas sont ubiquistes (Murray *et al.*, 1990).

### N / 1990 : INFARCTUS CEREBRAL A CINCINNATI, USA

Une étude rétrospective de cinq ans (janvier 1984 à décembre 1988) des bactériémies à *Enterobacter* a été menée chez les patients de l'unité pédiatrique de cet hôpital. Sur les trente-trois patients qui rentraient dans l'étude, une seule infection à *E. sakazakii* a été mise en évidence (Gallagher, 1990).

Ce cas est survenu dans l'Ohio aux Etats-Unis. Les auteurs ont surtout porté leur attention sur l'importance de l'**imagerie médicale**, et les conséquences d'une infection par *E. sakazakii* sur le système nerveux central.

Le patient est un garçon de **deux jours**, né après **35 semaines** de gestation. Il présente de la léthargie, de l'apnée et de la bradycardie. La culture de sang permet d'isoler *E. sakazakii*, et un traitement avec de l'ampicilline et de la céfotaxime est débuté. Une échographie crâniale réalisée le sixième jour de vie, montre une échogénicité augmentée bilatérale et pariéto-occipitale. Elle est plus importante à gauche et pourrait être consistante avec une hémorragie ou un infarctus cérébral. Un scanner, fait deux jours plus tard, confirme la présence de cette lésion qui peut être soit un œdème ou un infarctus cérébral.

L'état clinique du patient ne pose pas de problèmes pour les trois semaines suivantes. Les antibiotiques sont arrêtés, et il est renvoyé chez lui.

Douze jours plus tard, il revient pour léthargie, fièvre et anorexie. Une **méningite** est diagnostiquée par ponction lombaire, et les antibiotiques sont recommencés. L'examen tomodensitométrique de la tête montre une aire de faible atténuation augmentée à droite, et une diminution supplémentaire de l'atténuation à gauche (cf. figure xx). Les cultures de sang et de LCR sont négatives.

Trois semaines et demi plus tard, un scanner montre une zone bien délimitée, située dans le lobe droit, dont les contours sont renforcés. Les auteurs suspectent un abcès (cf. figure xx).



**Figure 14: Evolution d'une suspicion d'infarctus cérébral du à *E. sakazakii* (Gallagher et Ball, 1991). La partie 1 correspond au scanner montrant l'atténuation à droite et surtout à gauche, et la partie 2 montre le renforcement autour de la lésion**

L'aspiration et le drainage de ce kyste ont permis d'isoler un contaminant uniquement. Les auteurs pensent que la lésion cérébrale est un **infarctus cérébral**, en l'absence de modifications pathologiques et inflammatoires, et d'aires de nécrose périvasculaire ou de fragmentation axonale (Gallagher et Ball, 1991).

### O / 1991: SEPTICEMIE CHEZ UN ADULTE DANS LE MARYLAND, USA

La patiente est une femme âgée de **75 ans**, venue aux urgences pour des vertiges et des quasi-syncope. Elle allait bien jusque deux jours avant la consultation, quand elle a commencé à souffrir de nausée modérées sans vomissement associés, et de petits malaises. Elle décrit deux semaines de maux de tête intermittents, accompagnés de temps à autre par une vision floue et une raideur du cou modérée. Elle ne décrit pas d'autres signes (fièvre, toux, diarrhée...).

Parmi ses antécédents médicaux, il est à noter de l'hypertension, de la fibrillation atriale chronique, des attaques d'apoplexie et une fracture de la hanche droite traitée chirurgicalement cinq ans auparavant. Elle est sous traitement à base de lisinopril, hydrochlorothiazide, nifédipine et coumadine. Elle confirme ne pas avoir consommé de lait en poudre ou des suppléments diététiques. Elle n'a subi aucune intervention médicale ou chirurgicale récente.

A l'examen d'entrée, la patiente est alerte, pas angoissée. Ses paramètres vitaux sont tous normaux, excepté un rythme cardiaque irrégulièrement irrégulier. Aucun souffle n'est objectivé.

Quelques heures après son admission, sa température augment jusqu'à 39,2°C, sans modification de l'examen clinique associé.

Des examens complémentaires sont effectués. La numération formule sanguine, les examens biochimiques de base, le scanner de la tête et l'analyse de LCR sont dans les limites usuelles. Des cultures à partir de son sang, son urine, ses fécès, des écouvillons de la gorge et d'expectorations sont réalisées. Un traitement à base de céfuroxime (1,5 g/8 heures en IV) est initialisé.

Les **cultures sanguines** sur milieu standard sont positives pour un bacille gram négatif au bout de 18 heures. Le traitement est modifié: de la cétriaxone (1 g/12 heures en IV), est faite. Le microorganisme est identifié comme étant *Enterobacter sakazakii* par des méthodes biochimiques. Les autres cultures se sont révélées négatives (urine) ou contenant une flore banale.

Après 36 heures d'antibiothérapie la température de la patiente est de nouveau dans les limites usuelles. Les cultures sanguines redeviennent négatives. Aucune source de la septicémie n'a pu être identifiée (échographie abdominale, cardiaque, scanner abdominal et osseux...). Seule un transit baryté a permis de mettre en évidence un polype rectal, qui a été retiré chirurgicalement. La cétriaxone est continuée une semaine en intra-veineux, puis de la ciprofloxacine per os pendant encore une semaine. Au contrôle réalisé à un mois, tous les paramètres se sont révélés dans les normes (Hawkins *et al.*, 1991).

### P / 1993 : INFARCTUS CEREBRAUX MULTIPLES EN ALLEMAGNE

Le patient est un nourrisson de 8 jours, qui pesait 1, 420 kg à la naissance, survenue après 31 semaines de gestation. Il a présenté des signes de méningite, qui était due à *E. sakazakii*. L'imagerie médicale (scanner) a permis de mettre en évidence des lésions de faible densité dans la substance blanche et le cortex, compatible avec la formation d'abcès. Des hémorragies cérébrales étaient également visibles. A plus d'un an, l'enfant est tétraplégique et présente de nombreux retards psychomoteurs (Ries *et al.*, 1994).

## Q / 1993 : ABCÈS DERMOÏDE EN ONTARIO, CANADA

La patiente est une fillette de 20 mois, qui a été admise pour des signes cliniques de méningite. La tomодensitométrie a permis de diagnostiquer un abcès dermoïde localisé au niveau de la fosse postérieure. Les cultures du pus récupéré dans les abcès de l'hémisphère gauche ont permis d'isoler *Corynebacterium aquaticum*, *E. sakazakii* et *E. cloacae*. Le traitement antibiotique a duré six semaines et était à base de ceftriaxone (800 mg/jour), de pénicilline G (2 400 000 U/jour) et de gentamicine (75 mg/jour). Il semble que l'enfant n'ait pas subi de séquelles particulières (Tekkök *et al.*, 1996).

## R / 1995-1996 : INFECTIONS A BOSTON, USA (LAI, 2001)

L'auteur a effectué une étude rétrospective de tous les cas d'infections à *E. sakazakii* à l'hôpital de l'université du Massachusetts entre janvier 1995 et décembre 1996. Lors de son étude, Lai (2001) a montré que 3,6% des infections sanguines du centre médical étaient dues à des *Enterobacteriaceae*. *E. sakazakii* fait partie des agents étiologiques uniquement lors de l'année 1996 et n'est responsable que de 0,4% des infections sanguines. Lors de cette période, la bactérie n'a été isolée que du sang ou des expectorations des patients. Aucun groupement d'infections n'a été mis en évidence, seulement cinq cas sporadiques.

### 1. Description des cas

Dans la période de janvier 1995 à décembre 1996, cinq cas d'infections nosocomiales dues à *E. sakazakii* concernant un enfant et quatre adultes ont été notées. Trois patients sont décédés suite à leur maladie, et les septicémies causées par *E. sakazakii* ont contribué à deux d'entre elles.

#### a Cas 1.:

Le patient est un garçon de **trois ans** souffrant d'un rhabdomyosarcome embryonnaire de la prostate métastasant au lobe temporal. Il a subi une **radiothérapie** et six cycles de **chimiothérapie** pendant quatre mois au travers d'un cathéter.

Il a été admis pour fièvre et neutropénie (100 PNN par mm<sup>3</sup>). A l'admission, les cultures sanguines sont positives pour *E. sakazakii* et *Serratia marcescens*. Le cathéter est retiré immédiatement, et le patient est traité avec de la nafcilline et de la céftazidime, puis de la gentamicine et céfoxatime. Dès le cinquième jour, la fièvre disparaît et les cultures se négativent. A sa sortie le traitement est poursuivi avec de la gentamicine et de la ceftriaxone pendant deux semaines.

#### b Cas 2.:

Le patient est un homme de **39 ans** ayant subi une résection d'un carcinome amygdalien un an auparavant, et étant sous **chimiothérapie** pour les métastases.

Il est admis à l'hôpital pour une mise en place d'une sonde de gastrotomie, et a ensuite nécessité une trachéotomie d'urgence. La radiographie pulmonaire montre une **bronchopneumonie** probablement due à une fausse déglutition.

Ses expectorations sont purulentes et permettent l'isolement d'*E. sakazakii* et de *Staphylococcus aureus* (qui est plus vraisemblablement l'agent étiologique). Il est traité avec de la céftazidime et de la clindamycine pendant cinq jours, puis de la cefuroxime et de la clindamycine pendant deux jours supplémentaires par la sonde de gastrotomie.

Le patient a guéri et ses radiographies de contrôle ne montraient plus d'infiltration.

c Cas 3 :

La patiente est une dame de **73 ans** admise pour l'évaluation d'une jaunisse. Une striction des canaux biliaires est mise en évidence et traitée. Une **tumeur** de Klatskin est mise en évidence sur le canal biliaire commun.

En **post-opératoire**, la patiente est en hypotension, hypoxémie et insuffisance rénale. *E. sakazakii* est isolé de la bile (avec *Serratia marcescens* et des entérocoques) et du sang. Un traitement avec de la pipéracilline et du tazobactam est entamé avec de la gentamicine, puis remplacé par de l'imipenem le quatrième jour mais la patiente **décède**.

d Cas 4 :

La patiente est une dame de **82 ans** qui a subi une réparation d'anévrisme de l'aorte abdominale en urgence. L'évolution est compliquée par la formation d'un troisième secteur abdominal, avec un syndrome de détresse respiratoire, de la fièvre, de l'acidose métabolique et de l'oligurie.

Neuf jours après l'opération, les cultures sanguines sont positives pour *E. sakazakii*. Elle est traitée avec de l'ofloxacine, puis le deuxième jour de la pipéracilline et tazobactam. Elle est **décédée** le sixième jour.

e Cas 5 :

La patiente est une femme de **76 ans** trouvée inconsciente et intubée d'urgence. Elle subit une chirurgie pour volvulus caecal, avec résection du caecum. Elle reste intubée et développe une infection sanguine à *Candida albicans* traitée avec de l'amphotéricine B. Trois semaines après l'opération, une radiographie pulmonaire met en évidence une infiltration et *E. sakazakii* est isolé des expectorations purulentes, ainsi que *S. aureus*. Deux souches différentes d'*E. sakazakii* sont trouvées. L'auteur pense qu'*E. sakazakii* n'est pas l'agent responsable de l'affection respiratoire.

Le traitement initial se fait avec de la tobramycine et de la ceftazidime, qui est remplacée le deuxième jour par de l'ofloxacine pendant dix jours. L'évolution est compliquée par de l'hypotension, et le développement d'abcès intra-abdominaux. Elle **décède** un mois après l'intervention chirurgicale.

S / 1998: DOUZE CAS D'ENTEROCOLITE NECROSANTE (ECN) EN BELGIQUE (VAN ACKER ET AL. 2001)

Cette crise présente un intérêt particulier dans la mesure où elle est la première décrivant des **entérocrites nécrosantes** chez tous les patients, associées à l'utilisation de lait en poudre reconstitué et de l'isolement d'*E. sakazakii*.

Elle a eu lieu en juin et juillet 1998, dans l'unité de soins intensifs néonatale d'un hôpital de Bruxelles. Douze cas ont été décrits, dont deux sont décédés. Des recherches d'*E. sakazakii* sont effectuées systématiquement sur le sang, le contenu stomacal et les écouvillons anaux des patients (seules les recherches positives seront indiquées).

## 1. Description des cas:

### a Cas 1:

Le patient est un garçon né après **27 semaines** de gestation et pesant **0,850kg** à la naissance. Il est nourri dès son quarante-cinquième jour avec du lait reconstitué de type Alfaré®, et présente des signes de ECN de type I dix jours plus tard. *E. sakazakii* est isolé du contenu stomacal.

### b Cas 2:

La patiente est une fille de **17 jours**, née après **31 semaines** de gestation et qui pesait **1,930kg** à la naissance. Elle était nourrie avec du lait reconstitué à partir de la poudre Prématal® depuis un jour, avant de souffrir d'ECN de type II. *E. sakazakii* n'est pas isolé de son sang (non cherché dans le contenu stomacal ou les écouvillons anaux).

### c Cas 3:

Le patient est un garçon né après **27 semaines** de gestation avec son **jumeau** (cas 4) et pesant **0,995 kg** à la naissance. Son alimentation est à base d'Alfaré® depuis son cinquième jour. Les signes de ECN de type III sont apparus **41 jours** après sa naissance. Il est **décédé** le lendemain. Aucune recherche d'*E. sakazakii* n'a été effectuée.

### d Cas 4:

Le patient est le **jumeau** du précédent (cas 3). Il pesait **0,965kg** à la naissance, et a été nourri avec de l'Alfaré® à 30 jours. Quatre jours plus tard, il souffre d'ECN de type III. *E. sakazakii* est isolé de son sang (deux morphologies différentes sont isolées). Il **décède** à 63 jours de vie.

### e Cas 5:

La patiente est une fille né après **29 semaines** de gestation, pesant **0,815kg** à la naissance et nourrie avec de l'Alfaré® à partir de son vingtième jour de vie. Trois jours plus tard, elle a une ECN de type II. *E. sakazakii* n'est pas recherché.

### f Cas 6:

La patiente est une fille de **1,200 kg** à la naissance (**28 semaines** de gestation). Elle est alimentée avec de l'Alfaré® à cinq jours de vie. L'ECN de type III apparaît à **23 jours** d'âge. *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* sont isolés d'écouvillons anaux.

### g Cas 7:

Le patient est un garçon de **dix jours**; il est prématuré (**28 semaines** de gestation), et pesait **1,100 kg** à la naissance. Il était nourri depuis trois jours avec de l'Alfaré®, lorsque l'ECN de type III est apparue. *E. sakazakii* est isolé d'écouvillons anaux.

**h** Cas 8:

La patiente est une fille née après **27 semaines** de gestation, qui pesait **0,590 kg** à la naissance. Elle est nourrie avec de l'Alfaré à partir du jour 37 après sa naissance et souffre d'ECN de type II trois jours plus tard. *E. sakazakii* est isolé du contenu stomacal et des écouvillons anaux.

**i** Cas 9:

La patiente est une fille de **18 jours**, née après **31 semaines** de gestation et qui pesait alors **1,350 kg**. Dès son septième jour elle est alimentée avec de l'Alfaré®. Elle est atteinte d'ECN de type I. *E. sakazakii* est isolé de son contenu stomacal et des écouvillons anaux.

**j** Cas 10:

La patiente est née après **32 semaines** de gestation, et pesait **1,490 kg**. Elle est alimentée avec de l'Alfaré à partir de son quatrième jour, et souffre d'ECN de type I au septième jour. Aucune culture n'est effectuée.

**k** Cas 11:

Le patient est un garçon de **8 jours** ayant une ECN de type I. Il est né après **32 semaines** de gestation, et pesait **1,290 kg**. Il était nourri avec de l'Alfaré® depuis son deuxième jour. *E. sakazakii* est isolé de ses écouvillons anaux.

**l** Cas 12:

Le patient est un garçon prématuré (**30 semaines** de gestation), qui pesait **1,550 kg** et a été alimenté avec du Prématal® dès son quatrième jour de vie. Le lendemain, il est atteint d'ECN de type I.

## **2. Source et mode de transmission**

Dans cette crise, *E. sakazakii* a été isolé chez six des patients.

### **a Préparations en poudre pour nourrissons**

#### *α Relations épidémiologique*

Après analyse des procédures d'alimentation, une **relation significative** a été mise en évidence entre le développement d'ECN, la **consommation de lait reconstitué** à base de poudre, et l'isolement d'*E. sakazakii*. En effet, six patients sur douze souffrant d'ECN avaient des cultures positives pour *E. sakazakii*, contre zéro sur trente-huit patients ne souffrant pas d'ECN ( $p < 0,0001$ ). Six des quatorze nouveau-nés nourris avec Alfaré® avaient des cultures positives pour *E. sakazakii*, comparé à aucun sur les trente-six ne recevant pas cette recette ( $p < 0,0002$ ).

### *β* **Typage moléculaire**

La bactérie a été isolée de plusieurs **boîtes** non encore ouvertes du même lot de la poudre de lait en cause (quatorze souches isolées au total du lait Alfaré®).

Le typage moléculaire par PCR a confirmé la similitude entre les souches des isolats de la poudre de lait et celles de trois patients.

Le typage moléculaire des souches d'*E. sakazakii* isolée est très discriminatoire. Les quatorze souches isolées de la poudre de lait (boîtes non ouvertes et échantillon de lait reconstitué) sont de type Ia. Les neuf souches isolées des patients étaient de type Ia (pour 3 d'entre elles), II (") et III (3). Les dix souches de contrôle (isolée de patients de l'hôpital de 1989 à 1996), présente huit profils différents (dont une de type Ib).

Une autre source de contamination que le lait semblant peu probable pour un pathogène aussi rare qu'*E. sakazakii*, les auteurs pensent que la poudre en cause est aussi l'origine des trois types moléculaires différents isolés chez les patients. Le type isolé dans le lait serait alors seulement le type dominant.

A l'arrêt de l'utilisation de cette poudre de lait, les cas d'ECN se sont arrêtés. Un patient (cas 8) a été alimenté avec cette poudre après que l'utilisation a été stoppée et a été colonisé par *E. sakazakii*.

Tous ces éléments permettent aux auteurs de conclure qu'il y a une forte relation (voire relation de causalité) entre la contamination intrinsèque des poudres de lait et le développement d'ECN.

La présence du type Ib chez une patiente hors de la cohorte de cas étudiée laisse présager d'une **contamination de long terme** avant l'éclatement de la crise (la patiente était alimentée avec de l'Alfaré®).

### **b** Rôle des préparations en poudre pour nourrissons dans les ECN

Il ne faut pas sous-estimer le rôle du lait reconstitué dans le développement d'ECN. Le lait reconstitué peut à la fois servir de **substrat** idéal pour la croissance bactérienne, mais aussi de **source potentielle** de pathogènes (la plupart des poudres sont contaminées intrinsèquement). Des cas d'ECN dus à la poudre de lait, pourraient être manqués si le pathogène est un pathogène moins rare qu'*E. sakazakii*. Les auteurs pensent que le lait maternel est moins souvent contaminé que le lait reconstitué (en plus de la présence protectrice d'IgA).

### **c** Qualité microbiologique des poudres de lait

Les auteurs recommandent l'utilisation de **normes plus drastiques** concernant la qualité microbiologique des poudres de lait.

Ils conseillent l'utilisation de **produits liquides stérilisés**, qui permettent d'éviter les contaminations intrinsèques, puis extrinsèques lors de la réhydratation. Cependant, ces formules sont plus chères, et nécessitent un espace supérieur, aussi bien pour le transport que pour le stockage. De plus il faut, dans une unité de soins intensifs, des petites quantités et des recettes de concentration variables, pour s'adapter aux besoins des patients.

Tableau 37: Récapitulatif du cas décrit par Gallagher et Ball (1991)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
M	1991 ?		2,520	35 sem.	Infarctus cérébral	Méningite	Ampicilline + Céfotaxime	

Tableau 38: Récapitulatif des cas d'Entérocolite Nécrasante (ECN) décrits par Van Acker *et al.* (2001)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age						
M	5-1998	55	0,850	27	ECN type I			Rémission
F	5-1998	17	1,930	31	ECN type II			Rémission
M	5-1998	41	0,995	27	ECN type III	Jumeau du patient 4		Décédé
M	5-1998	34	0,965	27	ECN type III	Jumeau du patient 3		Décédé
F	5-1998	42	0,815	29	ECN type II			Rémission
F	6-1998	23	1,200	28	ECN type III			Rémission
M	6-1998	10	1,100	28	ECN type III			Rémission
F	6-1998	40	0,590	27	ECN type II			Rémission
F	6-1998	18	1,350	31	ECN type I			Rémission
F	6-1998	10	1,490	32	ECN type I			Rémission
M	6-1998	8	1,290	32	ECN type I			Rémission
M	7-1998	5	1,550	30	ECN type I			Rémission

T / 1999: ABCES CEREBRAL EN CAROLINE DU NORD (BURDETTE ET SANTOS, 2000)

1. Description du cas:

La patiente est une fillette née après 35 semaines de gestation et pesant 3,000kg à la naissance.

A l'âge de six jours, elle présente des signes d'irritabilité et de l'hyperthermie (37,8°C). A l'admission, sa température est de 39,5°C. Une septicémie est suspectée, des cultures de sang, d'urine et de LCR sont mises en œuvre.

*E. sakazakii* est isolé du sang et du LCR de la patiente. Un traitement à base d'ampicilline et de céfotaxime est commencé, puis du bactrim est ajouté.

Cinq jours après son admission, la patiente a des convulsions. Un examen tomodensitométrique de la tête est effectué. Une large zone de diminution de contraste est observée au niveau du lobe antérieur gauche, associée à un effet de masse et un renforcement gyriforme partiel (cf. figure xx, parties 1)). Ces éléments sont évocateurs d'une inflammation cérébrale. Les images obtenues par résonance magnétique (IRM) le jours suivant montrent une lésion de 4 centimètre de diamètre dans le lobe frontal gauche, contenant du liquide et compatible avec un abcès dans le parenchyme (cf. figure xx, partie 2).

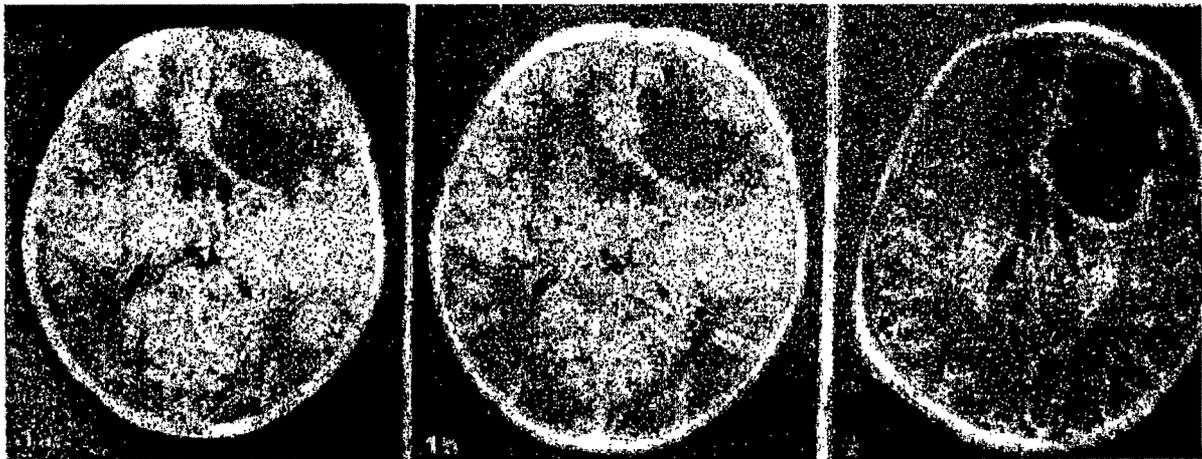


Figure 15: Abscès cérébral causé par *E. sakazakii* (Burdette et Santos, 2000). Les parties 1a et 1b sont des scanners sans et avec produits de contraste, et la partie 2 est un IRM.

Deux jours après l'IRM, une craniotomie du lobe frontal gauche est entreprise. Elle permet l'évacuation de 20ml de liquide purulent de la cavité de l'abcès. Celle-ci est irriguée avec du liquide physiologique et de la bacitracine diluée, puis drainée. La culture du liquide purulent recueilli a révélé la présence d'*E. sakazakii*.

Une semaine après la chirurgie un nouvel IRM met en évidence une réaccumulation de liquide dans la cavité. Celle-ci est de nouveau drainée et le liquide obtenu est stérile.

La patiente sort de l'hôpital après cinq semaines de soins. A cette période, aucun déficit neurologique n'est noté (mais aucun suivi n'est rapporté par les auteurs).

## 2. Conclusions à tirer du cas

Cette description de cas tient son importance du fait que c'est la première mise en évidence réelle du rôle d'*E. sakazakii* dans la formation d'**abcès cérébraux** (il a été isolé du liquide formant l'abcès). En effet, jusqu'à présent, l'interprétation des éléments obtenus par l'imagerie médicale était variable suivant les auteurs. Willis et Robinson (1988) et Gallagher et Ball (1991) pensaient plutôt que les images tomodensitométriques représentaient les évolutions associées à l'infarctus cérébral, les biopsies à l'aiguille ne donnant pas de résultats.

Burdette et Santos (2000) conseillent d'effectuer systématiquement un scanner ou mieux une IRM pour mettre en évidence les abcès cérébraux aussitôt qu'*E. sakazakii* est isolé d'un patient.

### U / 1999-2000 : CRISE DANS UN HOPITAL DE JERUSALEM, ISRAEL

Dans un hôpital de Jérusalem, en 1999, deux enfants ont été cliniquement atteints par *E. sakazakii*, tandis que trois autres se sont révélés être porteurs asymptomatiques. Une étude rétrospective des cas d'infection à *E. sakazakii* a été ensuite effectuée par Block *et al.* (2002).

#### 1. Description des cas

##### a Cas rétrospectifs (Block *et al.* 2002)

En 1993, une **septicémie néonatale** due à *E. sakazakii* chez un enfant né à terme et nourri avec du lait reconstitué est décrite.

En 1995, une fillette a développé une **conjonctivite**. Elle est née après 36 semaines de gestation par césarienne. En dehors de cette affection, elle ne souffrait d'aucune anomalie.

En 1997 une culture pure d'*E. sakazakii* a été obtenue à partir d'un **cathéter** provenant d'un garçon de six ans. Il avait subi trois ans auparavant une transplantation de moelle osseuse à cause d'une leucémie aiguë.

Enfin, le quatrième cas est une fille souffrant d'une **méningite** à son sixième jour de vie, en décembre 1998. Elle était née à terme.

##### b Cas 1 :

La patiente est une fillette née à **36 semaines** de gestation sans problèmes. Une **césarienne** est réalisée pour détresse fœtale. Elle pèse alors **2,155 kg**, et l'examen clinique est normal. Elle est nourrie avec du lait reconstitué.

Au cours de son **quatrième jour de vie**, elle devient irritable et a une température de 38°C. Des cultures de sang et de LCR sont faites, et *E. sakazakii* sera isolé des deux. En attendant des résultats, elle est mise sous céfotaxime (200 mg/kg/j) et gentamicine (5 mg/kg/j). L'examen du LCR révèle 2 400 PNN par mm<sup>3</sup> et 2,8 g de protéines par litre.

Le jour suivant elle est léthargique et a des crises convulsives de plus en plus fréquentes et évoluant vers une généralisation. L'échographie crâniale met en évidence une large zone frontale hyperéchogène, pouvant être un infarctus ou une hémorragie. Un traitement anticonvulsif est commencé, et les crises sont maîtrisées après trois jours.

Au bout de 48 heures, les cultures de LCR deviennent négatives. Le comptage des PNN donne 10 650 par mm<sup>3</sup>, 2,4g protéines par litre et 2,0mmol/l de glucose.

Plusieurs échographies crânielles, des examens tomodensitométriques et des IRM sont réalisés et sont consistants avec un **infarctus** évoluant en nécrose, liquéfaction et cavitation. Finalement, la lésion communique entre la corne frontale et le ventricule latéral droit. A l'âge de trois semaines, un renforcement annulaire autour de la lésion est noté, imitant un abcès. Le LCR aspiré de la lésion et le sang donnent des cultures négatives. L'enfant n'a pas de symptômes, mais le comptage de PNN et de protéines du LCR ne diminue pas.

Lors de la quatrième semaine, une augmentation de volume des ventricules est notée, nécessitant des ponctions répétées. La gentamicine est stoppée à deux semaines et la céfoxatime à quatre.

Après une baisse du comptage lymphocytaire du LCR, un shunt ventriculo-péritonéal est effectué à deux mois d'âge, puis un second deux semaines plus tard (Bar-Oz *et al.*, 2001).

#### c Cas 2 :

La patiente est une fille de **neuf jours**, née après **27 semaines** de gestation, par **césarienne** pour détresse fœtale. Elle pesait **0,620 kg**, et son état général était normal. A trois jours de vie, elle est mise sous ventilation assistée. Son alimentation se fait par voie parentérale, avec du lait reconstitué à base de poudre.

A neuf jours d'âge, une tendance aux **saignements** est notée : une hémorragie du segment gastro-intestinal supérieur est présente, ainsi que des temps de coagulation augmentés. Une thrombocytopenie (23 000 par mm<sup>3</sup>) est trouvée. Un traitement antibiotique est démarré (céfotaxime 100mg/kg/j pendant 10 jours), une fois les prélèvements de sang et de LCR effectués pour les cultures. L'analyse de LC est la suivante : 1,7 g/l de protéines, et 2,6 mmol/l de glucose. Seule la culture de sang est positive.

Les plaquettes son progressivement revenues à la normale, La patiente est retournée chez elle à trois mois, avec un examen neurologique normal (Bar-Oz *et al.*, 2001).

#### d Cas 3 :

Le patient est un garçon de **cinq semaines**, né après **26 semaines** de gestation, et pesant **0,460 kg** à la naissance. *E. sakazakii* est isolé de ses **fécès**, et la culture est toujours positive à deux mois, malgré un traitement à base de céfotaxime (Bar-Oz *et al.*, 2001).

#### e Cas 4 :

Le patient est un garçon, né deuxième **jumeau** après **33 semaines** de gestation. Il pesait **1,430 kg** à la naissance. *E. sakazakii* est isolé de ses **fécès** à deux semaines d'âge, puis encore à quatre au moment de sa sortie de l'hôpital. Il est, lui aussi, traité avec de la céfotaxime (Bar-Oz *et al.*, 2001)

#### f Cas 5 :

Le patient est un garçon qui pesait **1,300 kg** à la naissance (**30 semaines** de gestation). *E. sakazakii* est isolé de ses **fécès** de six à quatorze semaines d'âge, bien qu'il soit traité avec de la céfotaxime (Bar-Oz *et al.*, 2001).

## 2. Source et mode de transmission

### a Préparation en poudre pour nourrissons et lait reconstitué

Après les deux cas cliniques dus à *Enterobacter sakazakii*, des prélèvements de fèces systématiques ont été réalisés dans la maternité, ce qui a permis de mettre en évidence les trois derniers cas de portage (Cas 3 à 5), qui sont aussi des enfants **nourris avec du lait reconstitué**. La recherche de la bactérie se fait par culture sur gélose MacConkey sans enrichissement préalable, et l'identification se fait par méthode biochimique (Block *et al.*, 2002). *E. sakazakii* a été isolé d'un **échantillon de lait reconstitué**, mais pas de la poudre directement, même après incubation.

### b Mixeur

Le microorganisme a été cultivé à partir d'écouvillons provenant du **mixeur** servant à reconstituer le lait. Celui-ci présentait une **fissure**. Il a été enlevé de la nurserie après cette crise, mais les cultures étaient toujours positives après cinq mois. Les auteurs pensent que cette fissure a été la niche qui avait été contaminée par un lot de poudre contenant *E. sakazakii*. Cette hypothèse expliquerait l'absence d'isolement de la bactérie des boîtes de poudres présentes dans l'unité de soins intensifs au moment de la crise (Block *et al.*, 2002).

### c Relation entre les isolats

L'électrophorèse sur gel pulsé de toutes ces souches et de celles des cinq cas de la crise a montré qu'elles étaient identiques. Seule la souche du patient de 1998 (méningite) était encore testable au moment de la crise. Elle était différente des précédentes (Block *et al.*, 2002). Block *et al.* (2002) précisent que les isolats de la crise de 1999-2000 étaient **nitrate négatifs**, alors qu'environ 99% des isolats d'*E. sakazakii* sont en règle générale nitrate positifs.

## 3. Evolution du service de néonatalogie

La crise a été rapidement maîtrisée en remplaçant la poudre de lait par des **formules prêtes à l'emploi**, l'élimination du mixeur et l'isolement des individus porteurs (Block *et al.*, 2002).

Bar-Oz *et al.* (2001) conseillent d'utiliser précocement l'échographie crâniale pour la détection des ventriculites, infarctus cérébraux et hydrocéphalies.

Il convient également de noter que parmi les cas, il y a deux patients d'un poids très faible (Bar-Oz *et al.*, 2001).

Tableau 39: Abscès cérébral décrit par Burdette et Santos (2000)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>a</sup>	Devenir
	Date	Age						
F	1999	6	3,000	35	Septicémie, méningite		Ampicilline + céfoxatime + bactrim (6) Bacitracine dans l'abcès (13)	Rémission (sans séquelles ?)

Tableau 40: Récapitulatif de la crise de Jérusalem (Bar-Oz *et al.*, 2001; Block *et al.*, 2002)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>b</sup>	Devenir
	Date	Age (j)						
F	1-2000	4	2,155	36	Méningite	Césarienne	Céfotaxime + gentamicine (4) Cefotaxime (9)	Rémission (séquelles)
F	12-1999	9	0,620	27	Septicémie et trouble coagulation	Césarienne	Céfotaxime (35)	Rémission
M	2000	35	0,460	26		Portage fécal	Céfotaxime (15)	Rémission
M	2000	15	1,430	33		Portage fécal	Céfotaxime (42)	Rémission
M	2000	42	1,200	30		Portage fécal		Rémission

<sup>a</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés<sup>b</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés

## V / 1998-2001 : ETUDE RETROSPECTIVES AU SEIN DU NICHD (STOLL ET AL., 2004)

L'équipe de recherche du National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) aux Etats-Unis a mené une étude rétrospective sur les nouveaux-nés de faible poids à la naissance (entre 0,401 et 1,500 kg), de septembre 1998 à décembre 2001, pour déterminer le taux d'infection à *E. sakazakii*.

Sur les 10 660 enfants étudiés, 6 825 (64%) ont eu une ou plusieurs cultures de sang ou de LCR faite. 20% des cultures de sang et 6% des cultures de LCR étaient positives pour des agents bactériens ou fongiques. 2% des cultures étaient positives pour *Enterobacter* (soit 1% de tous les nourrissons), et une seule culture positive pour *E. sakazakii* (75% des *Enterobacter* sont des *E. cloacae*, 15% des *E. aerogenes*).

### 1. Description du cas :

Le patient est un garçon né après **28 semaines** de gestation et qui pesait **1,091 kg**. A son **douzième jour** de vie, il présente des épisodes d'apnée et de bradychardie, nécessitant la mise sous ventilation assistée. Les leucocytes sanguins sont augmentés, et l'analyse de LCR ne révèle rien d'anormal. *E. sakazakii* est isolé de son sang. Une septicémie est diagnostiquée.

Le traitement est d'abord effectué avec de la gentamicine et de la céfotaxime, qui est remplacée par de l'imipenem après antibiogramme. Cette thérapie dure 18 jours, mais dès le premier jour la culture sanguine est négative.

L'enfant **guérit** et ne présente pas de séquelles neurologiques visibles à trois semaines de vie. Aucun suivi n'est réalisé par la suite.

### 2. Mode de contamination

Le patient a été nourri de façon parentérale les quinze premiers jours de sa vie, puis de façon entérale avec du lait maternel et des préparations prêtes à l'usage.

La source de contamination est **inconnue**. Les auteurs pensent même qu'*E. sakazakii* pourrait avoir été un contaminant.

## W / 2001 : INFECTION NEONATALE DANS LE TENNESSEE

Après un cas clinique avéré d'infection due à *Enterobacter sakazakii*, dans l'unité de soins intensifs néonatale, la bactérie a été recherchée chez les nouveaux-nés présents (culture de fécès et recherche dans les dossiers d'une culture positive du microorganisme à partir d'un liquide biologique). Un cas est défini par un patient infecté, suspecté d'être infecté ou colonisé par *E. sakazakii* (Himmelright *et al.*, 2002).

### 1. Description des cas (Himmelright *et al.*, 2002)

#### a Infection confirmée

L'infection confirmée (culture positive d'*E. sakazakii* d'un site normalement stérile, ici LCR) a été le point de départ de la recherche. Il n'y a eu qu'un seul cas.

Le cas a lieu en avril 2001. Le patient est un garçon pesant **1,270 kg** à la naissance. Il est né par **césarienne** après **33 semaines et demi** de gestation, et a été hospitalisé dans l'unité de soins intensifs néonatale pour prématurité, poids faible et détresse respiratoire.

L'enfant souffre de fièvre, tachycardie, mauvaise perfusion tissulaire et d'anomalie neurologique (des crises épileptiques sont suspectées) à l'âge de **onze jours**.

L'analyse de LCR révèle un comptage leucocytaire élevé (32 par mm<sup>3</sup> pour une norme de 0 à 0,5 par mm<sup>3</sup>), la présence de globules rouges (27 par mm<sup>3</sup>, normalement absence), 292 mg de protéines par dL (15-45 mg/dL) et 1 mg de glucose par dL (40-70 mg/dL). *E. sakazakii* est cultivé à partir du LCR.

Le patient est traité avec les antibiotiques usuellement utilisés lors de méningite (nature des médicaments non précisée par les auteurs), mais les dommages neurologiques s'aggravent progressivement, et il **décède** neuf jours plus tard.

### **b** Infection suspectée

Deux cas d'« infection suspectée » (culture positive d'*E. sakazakii* d'un site non stérile associée à la détérioration documentée de l'état clinique du patient dans les 24 heures précédant le prélèvement) sont ainsi identifiés.

La bactérie est isolée du liquide d'aspiration trachéale et associée à de la tachypnée, sans autre signe associé.

### **c** Colonisation

Sept cas de « colonisation » (culture positive d'*E. sakazakii* d'un site non stérile non associée à une détérioration de l'état clinique dans les 24 heures précédant le prélèvement) ont été mis en évidence. Six cultures positives ont été faites à partir des fécès et une à partir de l'urine. Un patient été colonisé à la fois dans l'urine et dans les fécès.

## **2.** Source et mode de transmission

### **a** Facteur de risque

Une étude de cohorte a été réalisée sur 49 patients pour déterminer les facteurs de risques d'une colonisation ou infection due à *E. sakazakii*. Neuf des 49 patients font partie des cas décrits plus haut. Le seul facteur associé significativement avec les infections ou colonisations par *E. sakazakii* est une **poudre de lait** spécifique (**Portagen®**). Tous les patients atteints ont été alimentés avec cette formule, contre seulement 21 sur 40 des témoins ( $p < 0,01$ ).

### **b** Source de l'infection

Les analyses microbiologiques usuelles sont faites. *E. sakazakii* est isolé d'un **lot de poudre de lait** Portagen®, aussi bien des boîtes entamées que de celles qui étaient fermées (deux lots étaient en cours d'utilisation dans l'hôpital au cours de la crise). Les cultures environnementales et de l'eau se révèlent négatives. L'électrophorèse en gel pulsé permet de mettre en évidence que l'isolat du LCR du patient ayant eu la méningite et les isolats du lot de poudre de lait sont indifférenciables (Himmelright *et al.*, 2002).

Le lot impliqué a été rappelé par le fabricant. C'est le premier cas d'infection à *E. sakazakii* associé à une poudre de lait décrit aux Etats-Unis, qui provoque un **retrait d'un produit commercial**. Portagen® est un type de produit recommandé par le fabricant pour les enfant ayants des problèmes de malabsorption, et à utiliser sous la surveillance de personnel médical. Le lot incriminé a été rappelé volontairement par le fabricant (Mead Johnson Nutritionals) le 29 mars 2002 (FDA, 2002d). Il a également fait une note à l'attention du personnel soignant sur les risques des poudres de lait.

### **3. Evolution du service de soins intensifs**

Les pratiques du service concernant la reconstitution des poudres de lait ont été analysées. Aucune anomalie majeure n'a été mise en évidence.

La formule était reconstituée suivant les instruction du fabricant, la poudre mixée avec de l'eau stérile, et immédiatement mise dans le réfrigérateur et consommée dans les 24 heures. L'enfant atteint de méningite était nourri en continu, le temps de nourrissage par poche de lait reconstitué n'excédant pas huit heures.

En prévention, l'hôpital a changé certaines procédures suite à cet épisode. La poudre de lait a été remplacée par des **formules stériles liquides**. Portagen® n'est plus utilisée, et les autres poudres de lait sont utilisées pour des indications très spécifiques et réduites. Dans ce cas, elles sont reconstituées dans une salle spécifique. Le temps d'administration maximal a été réduit à **quatre heures**.

Depuis, aucun cas supplémentaire n'a été reporté (Himmelright *et al.*, 2002).

Tableau 41 : Cas décrit par Stol *et al.* (2004) dans leur étude rétrospective de 1998 à 2001

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques <sup>a</sup>	Devenir
	Date	Age (j)						
M		12	1,091	28	Septicémie		Gentamicine (12) + céfotaxime (12) + imipeneme (16)	Guérison

Tableau 42: récapitulatif du cas dans le Tennessee en 2001 (Himmelright *et al.*, 2002)

Sexe	Début		Poids naiss. (kg)	Durée de gestation (sem)	Complication(s)	Autres éléments médicaux	Antibiotiques	Devenir
	Date	Age (j)						
M	4-2001	11	1,270	33,5	Méningite	Détresse respiratoire	Non précisés	Décédé

<sup>a</sup> Le numéro entre parenthèses correspond au jour de vie à partir duquel les antibiotiques ont été administrés

## X / 2001 : INFECTION VAGINALE (ONGRADI, 2002)

### 1. Description du cas

La patiente est une femme de **26 ans**, qui a consulté à l'hôpital de Budapest en août 2001 pour prurit vulvaire et écoulements vaginaux durant depuis deux semaines. Le seul facteur de risque trouvé est des **baignades** dans le lac de Baladon une semaine avant le début des symptômes, alors que l'eau était **chaude** (26-28°C).

L'examen clinique a révélé une vulvovaginite avec décharge muqueuse et un pH à 5,5. La cytologie vaginale a montré un grand nombre de PNN, des bactéries gram négatif, mais pas de lactobacilles. Après culture sur gélose au sang, la bactérie isolée s'est révélée être *E. sakazakii* (identifiée par méthode biochimique).

Le traitement antibiotique topique a été fait avec de la natamycine, de la néomycine et de l'hydrocortisone pendant une semaine. Le guérison s'est faite en deux semaines, lorsque le vagin a été de nouveau colonisé par *Streptococcus agalactiae*, puis une semaine plus tard par *Lactobacillus*.

### 2. Source de l'infection

L'auteur pense que la source de l'infection est **l'eau de surface du lac**.

Bien que l'infection soit vaginale, elle n'est pas en faveur d'un mode de transmission, chez les nouveau-nés par le passage dans la filière pelvienne.

L'auteur remarque que la hausse de pH vaginal est favorable au développement de l'infection à *E. sakazakii*. L'effet délétère de la bactérie est aussi mis en évidence par le fait que la recolonisation par la flore normale et l'acidification du pH se fait graduellement.

Ceci est à mettre en relation avec le fait que l'estomac des enfants prématurés a un pH plus élevé que celui d'un adulte. L'ingestion de lait reconstitué ne permet pas l'acidification et permet par conséquent la survie et la multiplication des pathogènes.

## Y / 2002 : INFECTION DE PLAIES CHEZ UN ADULTE

Ce cas présente un intérêt particulier dans la mesure où la souche d'*E. sakazakii* isolée est **résistante à de multiples antibiotiques**. Il met en évidence l'émergence des antibiorésistances.

Le patient est un homme de **64 ans**, souffrant d'une maladie vasculaire périphérique relativement grave. Il est transféré à l'hôpital pour complications post-opératoires.

Les antécédents pathologiques comprennent de l'athérosclérose, de l'hypertension, du diabète de l'hypercholestérolémie, et un infarctus du myocarde datant de 27 ans. Le patient fumait à cette époque et a arrêté depuis.

Trois semaines auparavant, il avait présenté une ischémie de la jambe gauche secondaire à une occlusion d'un greffon de l'artère aorto-fémorale gauche. Une tentative de lyse du thrombus par de l'urokinase a été entreprise, mais n'a pas réussi. Un thrombus de l'artère fémorale gauche s'est développé et a nécessité une amputation sous le genou. La plaie opératoire s'est infectée, et une semaine plus tard le patient a été amputé au dessus du genou.

De plus, lors du traitement thrombolytique, une insuffisance vasculaire de la jambe droite s'est développée, et un pontage fémoro-poplitéal a été fait. Les deux plaies opératoires se sont infectées. *Staphylococcus aureus* a été cultivé de la plaie du genou gauche, et *Enterococcus faecium* de la plaie de l'aine droite.

A l'admission, de la vancomycine, de la gentamicine et de la ciprofloxacine sont administrées. Les **plaies** sont réouvertes et irriguées. *E. sakazakii* et *S. aureus* sont isolés de la plaie d'amputation à gauche, et *E. sakazakii* et *Staphylococcus epidermidis* de la plaie de l'aîne droite. *E. sakazakii* est résistant à l'ampicilline, la gentamicine et la céfoxatime.

Le patient a reçu de la gentamicine, de la vancomycine, et de temps à autre de l'imipenem en intra-veineux pendant six semaines. Ses plaies cicatrisent correctement, et il sort de l'hôpital avec de la ciprofloxacine et de l'amoxicilline avec de l'acide clavulanique par voie orale (Dennison et Morris, 2002).

## Z / 2002 : MENINGITE A GAND EN BELGIQUE

Le patient est un garçon de **5 jours** né en bonne santé à l'hôpital d'Alost en Belgique et nourri avec du **lait industriel pour nourrissons** « Béba1 » de Nestlé®. Juste après sa sortie de l'hôpital, à cinq jours, ses parents l'ont ramené. Il est **décédé** quelques heures plus tard d'une **méningite**. *E. sakazakii* était la cause de la mort.

Presque 7 semaines après la mort du nourrisson, l'Agence Fédérale belge pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire a demandé à Nestlé Belgilux de retirer du marché, par mesure de précaution, deux lots de boîtes de 900 grammes de Béba1 (IBFAN, 2002).

## AA / 2004 : EPIDEMIE EN FRANCE

Entre le 25 octobre et le 13 décembre 2004, **5 infections**, dont **2 décès**, et **5 colonisations digestives** à *E. sakazakii* ont été diagnostiquées chez des nouveaux-nés prématurés ou hypotrophes hospitalisés en néonatalogie dans cinq hôpitaux différents. Neuf des dix nouveaux-nés avaient consommé une **préparation pour alimentation des nourrissons et enfants en bas âge**. (Pregestimil® ; InVS, 2004c), le dixième avait été en contact étroit avec un des malades (InVS, 2004a).

Le retrait des lots incriminés de cette préparation a fait suite à la crise (InVS, 2004b).

## ANNEXE B : FICHE DE SYNTHÈSE POUR LE DOMICILE

Cette fiche est tirée du rapport de l'Afssa intitulé « Préparation et Conservation des biberons » (Turck *et al.*, 2005).

RECUEIL, CONSERVATION ET TRANSPORT DU LAIT DE MERE	
<b>RECUEIL</b>	<p>L'<b>allaitement direct au sein</b> doit être privilégié. En cas d'impossibilité d'allaitement direct, 2 méthodes de recueil du lait maternel sont possibles : expression manuelle, ou encore tire-lait manuel ou électrique (chaque marque propose des tire-lait avec biberons adaptés).</p> <p>Avant toute manipulation, un <b>lavage</b> soigneux des mains est indispensable. Outre cette étape indispensable, une douche quotidienne avec lavage des seins et des mamelons est recommandée.</p> <p>Si le volume souhaité de lait est recueilli en une seule fois, verser le lait recueilli dans le biberon de conservation, fermer le biberon (obturateur et capuchon) et placer le biberon directement dans une enceinte réfrigérée.</p> <p>Si le volume souhaité de lait n'est pas recueilli en une seule fois, verser le lait recueilli à chaque extraction dans le biberon de recueil, le refroidir puis verser le lait dans le biberon de conservation, fermer le biberon (obturateur et capuchon) et placer le biberon dans un réfrigérateur tant que le volume souhaité n'est pas atteint.</p>
<b>CONSERVATION</b>	<p>Avant toute conservation du lait maternel, noter le nom et le prénom de l'enfant, ainsi que la date et l'heure du 1er recueil de lait sur le biberon.</p> <p>Le lait doit être mis dans un <b>réfrigérateur</b> à une température inférieure ou égale à <b>4°C</b> immédiatement après recueil et peut y être stocké pendant <b>48 heures</b> après le 1er recueil.</p> <p>En cas de conservation du lait maternel plus de 48 heures, il convient de le congeler. Veiller à ne remplir le biberon qu'aux trois-quarts. Le lait stocké peut être conservé pendant 4 mois au congélateur (-18°C), et ne doit pas être placé dans un freezer (bac à glaçons du réfrigérateur).</p> <p>Le lait décongelé ne doit pas être recongelé. Il ne faut pas ajouter de lait de femme fraîchement recueilli à un biberon de lait congelé.</p>
<b>TRANS-PORT</b>	<p>Le lait maternel doit être transporté du domicile au lieu de consommation dans une glacière ou dans un sac isotherme avec pack eutectique (pack de glace, etc.).</p>
<b>RECOMMANDATIONS D'HYGIENE POUR LA PREPARATION ET LA CONSERVATION DES BIBERONS</b>	
<b>PREPA-RATION</b>	<p>Endroit <b>propre</b> sur un plan de travail préalablement nettoyé</p>

<b>RECONSTITUTION</b>	<p><b><u>Pour un lait en poudre</u></b>  Il est possible d'utiliser l'eau de distribution publique (eau du robinet) si :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. après ouverture du robinet, un temps d'écoulement (quelques secondes) de l'eau est respecté avant de la recueillir,</li> <li>. seule l'eau froide est exclusivement utilisée (attention à la position du mitigeur),</li> <li>. le robinet fait l'objet d'un entretien régulier (nettoyage, détartrage),</li> <li>. à proximité du point d'eau, le plan de travail et les accessoires font l'objet d'un entretien régulier avec des produits détergents,</li> <li>. elle n'a pas subi de filtration ou d'adoucissement.</li> </ul> <p>A défaut, utiliser une eau embouteillée : eau minérale naturelle ou eau de source permettant une consommation pour les nourrissons et les enfants en bas âge (avis de l'Afssa du 2 décembre 2003 en Annexe C).</p> <p>Remplir le biberon avec N x 30 mL d'eau. Mettre N cuillères-mesure arasées de poudre de lait (s'assurer que la reconstitution écrite sur la boîte est bien 1 cuillère-mesure dans 30 mL d'eau et que la cuillère-mesure est bien celle de la boîte de lait. Le volume obtenu est égal ou supérieur à N x 30 mL).  La boîte de lait doit être soigneusement refermée après chaque usage.  En cas de consommation d'un lait acheté dans un pays étranger, vérifier les instructions précisées sur l'emballage.</p>
<b>CONSOMMATION DU BIBERON</b>	<p><b><u>Pour un lait liquide</u></b>  Remplir le biberon de la quantité de lait désirée.</p> <p>Le biberon ne doit être sorti du réfrigérateur qu'<b>immédiatement</b> avant son utilisation. Tout biberon sorti du réfrigérateur doit être utilisé dans un délai d'<b>1 heure</b>.</p> <p>Il n'est pas indispensable de réchauffer la préparation lactée qui peut être consommée par le nourrisson à température ambiante.</p> <p>Le réchauffement éventuel du biberon doit être effectué soit au bain-marie, soit au chauffe-biberon, en aucun cas en le laissant à température ambiante, en raison du risque de développement microbien.</p> <p>En cas d'utilisation d'un chauffe-biberons à eau ou à sec, suivre les indications du fabricant.</p> <p>L'utilisation du four à micro-ondes est proscrite.</p> <p>Il est essentiel d'<b>agiter</b> le biberon pour homogénéiser la température du lait et de vérifier cette dernière en mettant quelques gouttes sur la face interne de l'avant-bras de la personne qui alimente l'enfant avant de proposer le biberon à l'enfant.</p> <p>Tout biberon non terminé dans un délai de 60 minutes qui suit le début de sa consommation par l'enfant doit être jeté.</p> <p>Lorsque le biberon a été réchauffé, ce délai est réduit à 30 minutes.</p>
<b>DES BIBERONS, DES ANNEXES (BAGUES, TETINES ET CAPUCHONS) ET DU REFRIGERATEUR</b>	<p>Après utilisation, <b>vider</b> le biberon, <b>rincer</b> au robinet à l'eau froide et laver en <b>lave-vaisselle</b> en utilisant un cycle spécifique complet.</p> <p>En l'absence de lave-vaisselle, immerger le biberon et les annexes dans de l'eau chaude additionnée de liquide-vaisselle, nettoyer avec un goupillon, et rincer.</p> <p>La conservation du biberon doit se faire dans un réfrigérateur propre, qui doit être lavé au moins une fois par mois avec de l'eau savonneuse, rincé à l'eau puis à l'eau javellisée.</p>

## ANNEXE C : AVIS DE L'AFSSA RELATIF A LA FIXATION DE QUALITE DES EAUX



LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Afssa – Saisine n° 2001-SA-0257

Maisons-Alfort, le 2 décembre 2003

### AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à la fixation de critères de qualité des eaux minérales naturelles et  
des eaux de source embouteillées permettant une consommation sans  
risque sanitaire pour les nourrissons et les enfants en bas âge**

Par courrier reçu le 29 octobre 2001, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 23 octobre 2001 conjointement par la Direction générale de la santé et par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, d'une demande d'avis concernant les critères de qualité des eaux minérales naturelles et des eaux de source embouteillées permettant une consommation sans risque sanitaire pour les nourrissons et les enfants en bas âge.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Eaux » les 2 juillet, 10 septembre, 8 octobre 2002 et 9 septembre 2003, l'Afssa rend l'avis suivant :

Considérant que les dispositions d'étiquetage de l'article R 1321-80 du Code de la Santé Publique concernant les eaux conditionnées indiquent qu'il peut être fait état de mentions particulières concernant l'étiquetage d'une eau minérale naturelle ou d'une eau de source destinée à la préparation des aliments pour les nourrissons sous réserve que ces eaux respectent certains critères de qualité microbiologiques et physico-chimiques des eaux de source, qu'elles ne soient pas effervescentes et que leurs teneurs en nitrates et en nitrites demeurent respectivement inférieures à 15 mg/L et 0,05 mg/L ;

Considérant que les articles R 1321-95 et R 1321-97 du Code de la Santé Publique relatifs à l'importation des eaux conditionnées prévoient la libre circulation des eaux produites dans un Etat membre de l'Union européenne ;

Considérant que les articles R 1321-83 et R 1321-85 du Code de la Santé Publique relatifs aux eaux minérales naturelles et aux eaux de source soumettent à autotisation les traitements :

- de séparation des éléments instables, par décantation ou filtration, éventuellement précédée d'une oxygénation,
- de séparation des composés du fer, du manganèse ou du soufre, ainsi que de l'arsenic, à l'aide d'air enrichi en ozone,
- de séparation des constituants indésirables,
- d'élimination totale ou partielle du gaz carbonique libre par des procédés exclusivement physiques,
- d'incorporation ou de réincorporation du gaz carbonique provenant du gisement ;

Considérant que les articles R 1321-2 et R 1321-3 du Code de la Santé Publique, relatifs aux eaux destinées à la consommation humaine, apportent de nombreuses modifications concernant les limites et références de qualité des eaux par rapport au décret du 3 janvier 1989 modifié, ainsi que des dispositions sur les matériaux de conditionnement ;

27-31, avenue  
du Général Leclerc  
BP 19 94701  
Maisons-Alfort cedex  
Tel 01 49 77 13 50  
Fax 01 49 77 26 13  
www.afssa.fr

REPUBLIQUE  
FRANÇAISE

DERNS/Enr 22/nd.F

1/5

Considérant l'avis de l'Afssa du 10 juillet 2001 relatif à la proposition de fixation de valeurs limites pour certains constituants des eaux minérales naturelles embouteillées (arsenic, baryum, bore, fluor, manganèse et sélénium) ;

Considérant les avis de l'Afssa des 26 juin et 26 juillet 2001 relatifs à des demandes d'autorisation d'exploiter en tant qu'eau minérale naturelle, à l'émergence et après transport à distance, l'eau de captages contenant notamment des teneurs en sulfates et en fluor respectivement supérieures à 250 mg/L et 1,5 mg/L ;

Considérant l'avis de l'Afssa du 20 décembre 2001 concernant la qualité radiologique des eaux de consommation humaine et des eaux minérales naturelles ;

Considérant les résultats des enquêtes récentes sur les habitudes alimentaires des nourrissons ainsi que les travaux récents concernant les apports nutritionnels conseillés ;

Considérant que la directive 80/777/CEE relative à l'exploitation des eaux minérales naturelles, modifiée par la directive 96/70/CE, indique que chaque Etat membre de l'Union européenne peut fixer des dispositions particulières concernant les eaux conditionnées présentées comme pouvant être utilisées pour l'alimentation des nourrissons ;

Considérant les normes du *Codex Alimentarius* concernant les eaux minérales naturelles (CODEX STAN 108-1981 – rev.1 – 1997 – modif. 2001) et les eaux en bouteilles autres que minérales naturelles (CODEX STAN 227-2001) ;

Considérant que le décret n° 98/638 du 20 juillet 1998 relatif à la prise en compte des exigences liées à l'environnement dans la conception et la fabrication des emballages reprend les obligations de la directive 94/62/CEE du 20 décembre 1994 relative à tous les emballages et déchets d'emballages en prévoyant à terme l'utilisation de 25 à 45 % des déchets, dont 15 % minimum par matériau et que cette disposition concerne notamment les matériaux utilisés pour le conditionnement des eaux ;

Considérant les avis de l'Afssa du 14 juin 2002 concernant l'enrichissement en calcium et en magnésium d'eaux embouteillées ;

Considérant l'avis de l'Afssa en date du 28 octobre 2002 concernant la fixation des valeurs limites pour les paramètres cyanures, nitrates, nitrites et bromates dans les eaux minérales naturelles embouteillées ;

Considérant la directive 2003/40/CE de la Commission du 16 mai 2003 fixant la liste, les limites de concentration et les mentions d'étiquetage pour les constituants des eaux minérales naturelles, ainsi que les conditions d'utilisation de l'air enrichi en ozone pour le traitement des eaux minérales naturelles et des eaux de source ;

Considérant que l'article 2 point 3 de la directive 2003/40/CE précitée indique que « les autorités compétentes des Etats membres peuvent se référer à une valeur guide plus basse pour les nitrates et les nitrites, sous réserve qu'une même valeur guide soit appliquée à toutes les demandes qui leur sont soumises » ;

Considérant le rapport de l'Afssa de septembre 2002 sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau : évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp .

Considérant que l'Organisation mondiale de la santé a publié en 1994 et en 1998 des recommandations sur la qualité des eaux de boisson et a adopté une méthode pour élaborer les limites de qualité applicables aux substances chimiques pouvant être présentes dans une eau ;

Considérant que pour certains paramètres comme les nitrates ou le bore, l'ensemble de leurs effets sur la santé des nourrissons est encore mal connu et qu'il est proposé d'appliquer des règles de consommation proches de la réalité, les éléments apportés par l'eau représentant 50 % des apports quotidiens ;

Considérant qu'un étiquetage approprié des eaux conditionnées doit permettre au consommateur de distinguer les eaux conditionnées dont la consommation régulière par des nourrissons ne présente aucun risque pour leur santé, des eaux ayant des caractéristiques physico-chimiques ou des éléments susceptibles d'avoir des effets sur la santé à la suite d'une consommation importante et répétée ;

Considérant que les eaux minérales naturelles et les eaux de source ne doivent pas être soumises à des opérations qui auraient pour but de modifier leurs caractéristiques microbiologiques ;

Considérant les principes généraux d'hygiène alimentaire du *Codex Alimentarius* - Code d'usages international recommandé (CAC/RCP 1 - 1969, Rév. 3-1997) prévoyant notamment l'application des principes généraux en matière d'assurance qualité et la mise en place d'un système d'analyse de risques type HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) ;

Considérant les codes d'usage en matière d'hygiène du *Codex Alimentarius* pour les eaux minérales naturelles (CAC/RCP 33-1985) et pour les eaux mises en bouteilles conditionnées autres que minérales naturelles (CAC/RCP 48-2001) ;

Considérant le rapport joint en annexe,

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments :

- 1) estime qu'une mention d'étiquetage du type « **eau pouvant être utilisée pour l'alimentation des nourrissons** » ne devrait être utilisée pour les eaux minérales naturelles conditionnées ainsi que pour les eaux de source conditionnées que si :
  - au titre de la qualité, elles respectent au moins les dispositions des articles R 1321-2 et R 1321-3 du Code de la Santé Publique ;
  - au titre de la sécurité sanitaire, elles respectent les dispositions suivantes :
    - ne pas contenir de micro-organismes pathogènes et notamment de *Cryptosporidium sp.* et de *Giardia*,
    - ne pas être effervescentes (teneur en CO<sub>2</sub> inférieure à 250 mg/L),
    - avoir une teneur en fluor inférieure ou égale à 0,3 mg/L s'il y a supplémentation médicale en fluor ou à 0,5 mg/L en l'absence d'une telle supplémentation,
    - avoir une teneur en sulfates inférieure ou égale à 140 mg/L,
    - avoir une teneur en calcium inférieure ou égale à 100 mg/L,

- avoir une teneur en magnésium inférieure ou égale à 50 mg/L,
- sur le plan radiologique, avoir une activité alpha totale inférieure ou égale à 0,1 Bq/L, une activité bêta totale inférieure ou égale à 1Bq/L, une dose totale indicative inférieure ou égale à 0,1 mSv/an, une teneur en tritium inférieure ou égale à 100 Bq/L.
- au titre de la protection de la ressource, elles respectent les dispositions suivantes :
  - teneur en nitrates (exprimée en NO<sub>3</sub>) inférieure ou égale à 10 mg/L,
  - teneur en nitrites (exprimée en NO<sub>2</sub>) inférieure ou égale à 0,05 mg/L,
  - teneur en bore inférieure ou égale à 0,3 mg/L,
  - teneur en cyanures inférieure ou égale à 0,01 mg/L,
- au titre de la vérification de l'absence de contaminants provenant des systèmes de distribution et d'installation d'embouteillage, elles respectent les dispositions suivantes :
  - teneur en cadmium inférieure ou égale à 0,003 mg/L,
  - teneur en cuivre inférieure ou égale à 0,2 mg/L,
  - teneur en nickel inférieure ou égale à 0,002 mg/L,
  - teneur en plomb inférieure ou égale à 0,010 mg/L,
  - teneur en zinc inférieure ou égale à 0,1 mg/L,
  - teneur en chrome inférieure ou égale à 0,005 mg/L,
- au titre de la vérification de l'absence de traitement de désinfection, elles respectent des limites concernant les sous-produits de désinfection qui devraient être inférieures au seuil de quantification de la méthode de mesure correspondante, s'il était envisagé de fixer des limites de qualité pour permettre de vérifier que ces eaux ne font pas l'objet d'un tel traitement ;

2) estime :

- concernant l'aluminium, qu'il convient d'attendre les résultats de l'évaluation en cours avant d'envisager de fixer une valeur différente de celle fixée dans la réglementation des eaux de consommation humaine,
- que s'il apparaissait nécessaire de fixer une valeur sur la minéralisation de l'eau afin d'éviter l'ingestion d'une trop grande quantité d'éléments minéraux d'origine hydrique, une minéralisation totale inférieure ou égale à 1 000 mg/L pourrait être retenue,
- que l'attention du consommateur doit être attirée par une mention spécifique d'étiquetage pour les eaux contenant du fluor et/ou des sulfates en quantités supérieures aux valeurs indiquées, signalant que l'eau contient des éléments susceptibles de présenter un risque pour les nourrissons en cas de consommation importante et régulière,
- que dans l'attente des résultats de l'évaluation concernant le recyclage du polyéthylène téréphtalate (P.E.T.) pour le conditionnement des boissons et des eaux et l'élaboration de lignes directrices, l'usage d'une mention spécifique pour les nourrissons ne doit pas être permis pour les eaux qui utiliseraient du P.E.T. recyclé,

Afssa – Saisine n° 2001-SA-0257

3) attire l'attention sur les risques qui pourraient à terme résulter, pour les nourrissons, des eaux produites dans ou en provenance de l'un des pays de l'Union européenne et conditionnées avec du matériau recyclé et sur l'intérêt d'une harmonisation européenne de la qualité de ces matériaux recyclés,

4) estime que si la réutilisation après lavage de récipients consignés fabriqués en matériaux organiques pour conditionner de l'eau était envisagée, il conviendrait de faire une évaluation prenant en compte l'usage particulier de l'eau pour l'alimentation des nourrissons, du fait notamment de la capacité de ces matériaux à retenir des contaminants susceptibles d'être placés à leur contact,

5) concernant l'assurance qualité, estime que la mise en place de règles d'assurance qualité avec application d'un système d'analyse de risques de type HACCP ainsi qu'une autosurveillance de la ressource jusqu'au conditionnement, sont des éléments de nature à renforcer la sécurité sanitaire de l'eau,

6) estime qu'un contrôle spécifique devrait permettre de s'assurer du respect des critères retenus,

7) rappelle qu'en attendant que des dispositions françaises relatives aux bonnes pratiques d'hygiène soient adoptées, il est souhaitable que les producteurs d'eaux conditionnées se conforment aux codes d'usages du *Codex Alimentarius*,

8) estime :

- que la fixation de critères de qualité permettant une consommation sans risque sanitaire pour les nourrissons et les enfants en bas âge devrait être appliquée aux eaux de distribution publique,
- qu'une information claire et précise du consommateur doit attirer l'attention du consommateur sur les risques qu'une consommation importante et répétée d'eaux de distribution publique peut faire courir aux nourrissons lorsqu'elles ont des teneurs en sulfates supérieures à 140 mg/L et en fluor à 0,5 mg/L.

9) indique par ailleurs que pour des raisons sanitaires liées à la protection des ressources des eaux minérales naturelles, une valeur guide de 10 mg/L concernant les nitrates (exprimée en NO<sub>3</sub>) pourrait être fixée au titre du 3<sup>ème</sup> alinéa de l'article 2 de la directive 2003/40/CE du 16 mai 2003 relative aux limites de concentration dans les eaux minérales naturelles, cette valeur concernant alors toutes les eaux minérales naturelles conditionnées et ceci quels que soient leurs usages,

Martin HIRSCH

---

## ANNEXE D : REFERENCES LEGISLATIVES UTILISEES OU CITEES

---

Arrêté du 1er juillet 1976 relatif aux aliments destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge.

Arrêté du 10 février 1995 du Ministre délégué à la Santé, relatif aux conditions techniques de fonctionnement des lactariums

Arrêté du 10 mars 1977 relatif à l'état de santé et l'hygiène du personnel appelé à manipuler les denrées animales ou d'origine animale.

Arrêté du 29 septembre 1997 relatif aux conditions d'hygiène applicables dans les établissements de restauration collective à caractère social.

Arrêté du 20 septembre 2000 relatif aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales.

Arrêté du 5 juin 2003 relatif aux substances qui peuvent être ajoutées dans un but nutritionnel spécifique aux denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière.

Article R 1321-2 du Code de la Santé Publique.

Article R 1321-2 du Code de la Santé publique (annexe 13-1) « eaux vendues en bouteille ou en conteneurs ».

Article R 1321-20 du Code de la Santé Publique.

Article R 1321-70 du Code de la Santé Publique « eaux minérales naturelles ».

Article R 1321-72 du Code de la Santé Publique « exigences pour les eaux de sources préemballées et les eaux minérales naturelles ».

Article R 1321-84 du Code de la Santé Publique « eaux de source préemballées ».

Circulaire DGS/SP2 n°97/785 du 17 décembre 1997 relative au don de lait personnalisé d'une mère à son enfant hospitalisé et rappel des dispositions en vigueur en matière d'allaitement maternel.

Circulaire DGS/SD5C-DHOS/E2 n°21 du 22 janvier 2004

Décret n°92-143 du 14 février 1992.

Décret n°98-899 du 9 octobre 1998 modifiant le titre Ier du livre VII du Code de la santé publique et relatif aux établissements de santé publics et privés pratiquant l'obstétrique, la néonatalogie ou la réanimation néonatale.

Décret d'août 2000 relatif aux établissements et services d'accueil des enfants de moins de 6 ans et modifiant le code de la santé publique.

Décret du 22 décembre 2000 relatif à la pharmacie à usage intérieur.

Décret n°2001-671 du 26 juillet 2001

Loi n°93-121 du 27 janvier 1993

Commission Directive 91/321/EEC of 14 May 1991 on infant formulae and follow-on formulae. Official Journal of the European Communities, 04.07.1991, L 175, p 35.

Commission Directive 96/4/EC of 16 February 1996 amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae. Official Journal of the European Communities, 28.02.1996, L 49.

Commission Directive 1999/21/EC of 25 March 1999 on dietary foods for special medical purposes. Official Journal of the European Communities, 07.04.1999, L 91/29.

Commission Directive 1999/50/EC of 25 May 1999 amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae. Official Journal of the European Communities, 02.06.1999, L 139.

NF V 01-001 . Hygiène des denrées alimentaires et des aliments pour animaux - Méthodologie pour l'élaboration des guides de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes de la démarche HACCP, 2005. :  
[http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=//DOCREP/005/W8088F/w8088f00.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=//DOCREP/005/W8088F/w8088f00.htm)

Principes généraux d'hygiène alimentaire du Codex alimentarius, révision 4, 2003.

Règlement 178/2002 :  
[http://europa.eu.int/eur-lex/fr/oj/dat/2002/l\\_031/l\\_03120020201fr00010024.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/fr/oj/dat/2002/l_031/l_03120020201fr00010024.pdf).

Règlement 852/2004/CE du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004.  
[http://europa.eu.int/eur-lex/fr/archive/2004/l\\_13920040430fr.html](http://europa.eu.int/eur-lex/fr/archive/2004/l_13920040430fr.html)

**NOM PRENOM :** GUST Marion

**TITRE :**

*Enterobacter sakazakii* : un pathogène émergent en santé publique ?

**Thèse Vétérinaire :** Lyon (29 Août 2006)

**RESUME :**

*Enterobacter sakazakii* est une bactérie, présente dans les préparations de lait en poudre pour nourrissons qui affecte surtout les nouveaux-nés prématurés. Les premiers cas décrits datent de 1958, avec la mort, suite à des méningites de deux nouveaux-nés. Depuis, presque une centaine de cas est rapportée.

La découverte effective d'*E. sakazakii* date de 1980. Ce microorganisme présente les caractéristiques des *Enterobacteriaceae*, bien que plus résistante (chaleur, dessiccation, stress osmotique), ce qui lui permet de coloniser des niches écologiques particulières. Les méthodes de détections sont nombreuses, mais relativement longues, et aucune ne sert encore de référence.

La pathogénie et les facteurs de virulence sont mal connus. *E. sakazakii* cause principalement des méningites, des colonisations digestives, des septicémies et des entérocolites nécrosantes chez les nouveaux-nés. D'autres symptômes peuvent exister. Le traitement est à base d'antibiotique, mais des résistances émergent. C'est un pathogène émergent.

La population sensible est constituée des nouveaux-nés prématurés de faible poids à la naissance ou immunodéprimés. Le seul réservoir identifié d'*E. sakazakii* sont des mouches, mais ses sources sont nombreuses (environnementales, alimentaires...), notamment les poudres de lait. La contamination des nourrissons se fait d'ailleurs par leur consommation. Cependant, la contamination est faible, et il faut qu'il y ait des erreurs dans les protocoles de reconstitution et de consommation des biberons.

La prévention des infections à *E. sakazakii* passe par une maîtrise de l'environnement de fabrication (usine), et par des protocoles rigoureux de préparation et de consommation des biberons. Des démarches de type HACCP sont à appliquer.

**MOTS CLES :**

*Enterobacter sakazakii*  
Pathogène émergent  
Santé publique  
Poudre de lait  
Nourrisson

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur **ETIENNE**

1er Assesseur : Madame le Professeur **VERNOZY**

2ème Assesseur : Monsieur le Docteur **BURONFOSSE**

**DATE DE SOUTENANCE :**

29 Août 2006.

**ADRESSE DE L'AUTEUR :**

La Cotte  
07200 St Etienne de Boulogne