



Avis 28-2004 - Risques liés à Enterobacter sakazakii. (dossier Sci Com 2004/09)

Le Comité scientifique de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire donne l'avis suivant :

Termes de référence

L'Administrateur délégué de l'AFSCA a posé au Comité scientifique un certain nombre de questions concernant les risques liés à Enterobacter sakazakii dans l'alimentation des nourrissons.

Question 1

Dans quel laps de temps les aliments pour nourrissons doivent-ils être refroidis et à quelle température afin de limiter au maximum le risque d'infection ?

Question 2

Pendant combien de temps le lait préparé pour nourrissons peut-il être conservé au réfrigérateur et à quelle température ?

Question 3

Pendant combien de temps le lait préparé pour nourrissons peut-il être maintenu à température (au bain-marie) avant d'être donné au nourrisson ?

Question 4

Combien de temps peut durer l'administration du lait préparé pour nourrissons et à quelle température ?

Question 5

Est-il permis de réchauffer le lait préparé une deuxième fois au cours du repas ?

Considérations générales

Enterobacter sakazakii est une cause rare mais connue de septicémie néonatale et d'une forme de méningite à évolution grave (Van Acker et al., 2001)¹, provoquant une mortalité de 10 à 80 % (Peter et al., 1999; Agostini et al., 2004). Plusieurs infections ont été mises en rapport avec

¹ Une liste de références est reprise dans l'annexe de l'avis.

la consommation d'aliments pour nourrissons. Le Comité scientifique a réalisé une étude de la littérature scientifique dans le but de recueillir des informations sur la prévalence, les possibilités de croissance et de survie et les risques liés à la présence de *E. sakazakii* dans les aliments pour nourrissons.

Niveau de contamination des laits en poudre

A l'heure actuelle, il n'existe pas, au sein de l'UE, de critère spécifique pour *E. sakazakii* dans le lait en poudre. L'absence de coliforme dans 0,1 g est cependant proposée (< 10/g) (législation de l'UE). Le "code of practice" de la FAO exige < 3 coliformes par gramme dans au moins 4/5 des échantillons avec un maximum de 1/5 des échantillons contenant > 3 mais ≤ 20 coliformes par gr. Plusieurs firmes appliquent un critère d'absence de *E. sakazakii* dans 10 gramme pour, la commercialisation du lait en poudre (Iversen et Forsythe, 2003).

Le procédé de production du lait en poudre comprend une série de différents stades, à savoir la réception et la sélection du lait cru, la clarification, le refroidissement, le stockage du lait cru, la standardisation, le traitement thermique, l'évaporation, l'homogénéisation, la déshydratation par spray, le conditionnement et le stockage. Dans la réalisation d'un processus soumis au système obligatoire d'autocontrôle, les Entérobacteriaceae ne survivront pas au processus de production du lait en poudre. Toutefois, ce groupe de micro-organismes est souvent présent dans l'environnement du processus de production. *E. sakazakii* a été détecté dans l'environnement du processus de production de quatre usines de lait en poudre, mais *Enterobacter* a également été retrouvé dans l'environnement de production d'usines de céréales pour le petit déjeuner, de chocolat et de pâtes (Kandhai et al., 2004).

E. sakazakii s'avère être plus résistant lors du séchage que les autres Entérobacteriaceae, ce qui peut expliquer la persistance de ce micro-organisme dans l'environnement de ce type d'usine (Breeuwer et al., 2003).

Finalement, ces micro-organismes peuvent se retrouver dans le produit fini (lait en poudre) dans le cas d'une contamination postérieure au processus de production.

Des Entérobacteriaceae ont été isolés dans 52 % des 141 échantillons de produit d'aliments pour nourrissons provenant de 35 pays. Les espèces les plus souvent isolées sont *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* et *Klebsiella pneumoniae*. Dans aucun produit, la concentration n'était supérieure à 1 ufc/g et dans 78% de tous les échantillons de produit positifs, la concentration était de 1 ufc/100g ou moins et donc dans les limites des dispositions légales actuelles. La concentration la plus élevée qui a été observée s'élevait à 92 ufc/100g (*Enterobacter cloacae*) (Muytjens et al., 1988). Nazarowec-White et Farber (1997) ont constaté que 8 des 120 échantillons de lait en poudre analysés étaient positifs pour *E. sakazakii*, le niveau s'élevant à 1 ufc par 100g au maximum. Dans du lait en poudre associé à une infection à *E. sakazakii*, un niveau initial de contamination de 4 ufc/100 g (voir procès-verbal) à 8 ufc/100g a été observé (Iversen et Forsythe, 2003).

Température minimale de croissance

La température minimale de croissance de 10 isolats testés varie de 5,5°C à 8°C. Au cours d'une conservation à 4°C, le micro-organisme dépérit lentement. Dans l'étude de Nazarowec-White et Farber (1997), le temps de génération moyen était de 40 minutes (0,67 h) à 23°C et de 4,98 h à 10°C. La phase de latence à 10°C était de 32,8h en moyenne (avec un minimum de 18,96h), et à 23°C elle était de 2,76 h en moyenne (avec un minimum de 1,76 h). Ces valeurs sont faibles en comparaison avec les valeurs d'autres Entérobacteriaceae. La phase de latence a été déterminée avec des souches cultivées dans des conditions optimales de laboratoires. On n'a pas tenu compte d'une éventuelle prolongation de la phase de latence

consécutives à l'exposition préalable à des conditions de stress (par ex. déshydratation dans la poudre de lait).

Iversen et Forsythe (2003) et Iversen et Forsythe (2004) ont signalé des temps de génération respectifs de 13,6h; 2,9h; 1,3 h et 0,5h à des températures respectives de 10°C; 18°C; 21°C et 37°C.

Bien qu'à chaque fois de faibles quantités de *E. sakazakii* soient détectées dans la poudre de lait, cet organisme peut se développer assez rapidement dans une poudre de lait réhydratée non conservée à une température correcte et ce, à cause de sa phase de latence et de son temps de génération relativement courts.

Résistance à la chaleur

En ce qui concerne la résistance à la chaleur, les résultats mentionnés dans les rapports sont divergents.

Nazarowec-White et Farber (1997) ont signalé des valeurs D de 4,20 minutes à 58°C et de 2,50 min à 60°C.

Récemment, Breeuwer et al. (2003) ont démontré que *E. sakazakii* n'a pas une thermotolérance exceptionnelle mais qu'il est bien adapté au stress osmotique et à la déshydratation. La valeur D à 58°C était de 0,39-0,60 minutes.

Edelson-Mammel et Buchanan (2004) ont observé des valeurs D à 58°C pour différentes souches de *E. sakazakii* dans de la poudre de lait réhydratée qui varient de 30,5 sec à 591,9 sec (9,86 min); dans ce contexte, ils ont observé deux phénotypes en rapport avec la résistance à la chaleur. Une valeur z de 5,6°C pour la souche la plus thermorésistante a été constatée. Lorsque la réhydratation de la poudre de lait est réalisée au moyen d'une eau portée à la température d'au moins 70°C, une réduction de 4 log a également été observée pour cette souche. Dès lors, la réhydratation au moyen d'eau portée à une température élevée peut constituer une mesure de gestion mais il n'est pas démontré que cette façon d'agir ne pourrait pas avoir d'effet éventuel sur la valeur nutritive du produit. Par ailleurs, il faut veiller à ce que l'aliment pour nourrissons soit suffisamment refroidi avant d'être donné à l'enfant pour éviter les brûlures.

Sur base de la détermination de la thermotolérance de *E. sakazakii*, on a pu déduire que le temps de réduction décimale du pathogène à 71,2°C est de 0,7 secondes, et donc que le couple standard température élevée et courte durée de pasteurisation (HTST) de 71,7°C durant 15 secondes se traduira par une réduction de +/- 21 log (Iversen et al., 2004).

Dose infectante

La manifestation de la maladie est grave dans les infections néonatales. En particulier, les nouveaux-nés prématurés sont très sensibles et peuvent mourir suite à l'infection. Une mortalité de 40 %, voire même de 80 % est signalée. Aucune référence bibliographique ne donne une description des mécanismes de la pathogénicité, ni des éventuels facteurs de virulence de *E. sakazaki*. *E. sakazakii* produirait des entérotoxines. La pathogénicité a également été démontrée chez des souris lors d'épreuves au cours desquelles *E. sakazakii* a été administré à des souris par voie orale (10^7 cellules pour 2 des 18 souches et plus de 10^8 bactéries pour les autres souches étaient requises pour provoquer l'infection) ou par voie intrapéritonale (10^5 cellules pour 2 des 18 souches étaient nécessaires pour initier l'infection) (Pagotto et al., 2003). La transposition des résultats de ces épreuves sur souris, en terme de dose infectante, pour les nourrissons n'est pas évidente. Il est toutefois clair que les différentes souches de *E. sakazakii* présentent des différences en ce qui concerne la pathogénicité et le pouvoir infectieux.

La littérature ne donne pas d'indications sur la dose infectante de *E. sakazakii*.

Pour définir le profil de risque dû à *E. sakazakii*, Iversen et Forsythe (2003) ont supposé une dose infectante de 1000 cellules (par analogie avec *E. coli* O157 et *Listeria monocytogenes*), mais en rapport avec cette hypothèse, les commentaires et ajouts suivants ont été fournis par Havelaar et Zwietering (2004).

- Sur base d'une étude de Nazarowec-White et Farber (1997) dans laquelle la concentration est en moyenne de 0,36 cellules par 100g (ou 0,065 cellules par biberon préparé avec 18 g de poudre de lait), on a calculé que dans ce cas, 6,5 % des biberons seront contaminés par un maximum de 1 cellule (le faible risque de 0,2 % qu'un seul biberon contienne 2 cellules a été négligé).
- En ce qui concerne la dose infectante qui a été supposée de 1000 cellules, la remarque a été faite qu'une dose infectante n'est jamais une limite absolue mais qu'il est plutôt question d'une courbe dose-réponse où l'on a supposé que même une seule cellule comporterait théoriquement un très petit risque d'infection. Ce risque a été calculé sur base d'un modèle établi dans lequel les auteurs supposent que 1000 cellules est la dose qui provoque une infection chez 50 % des personnes exposées, et il en est ressorti que le risque d'infection pour 1 cellule serait alors de 7×10^{-4} .
- Même s'il n'y avait pas de croissance de la bactérie pendant la préparation et la conservation, et que donc il n'y avait qu'une seule cellule présente, le risque d'infection à la consommation d'un biberon pris au hasard serait, selon les auteurs, égal à $0,065 \times 7 \times 10^{-4} = 5 \times 10^{-5}$ (= risque de base sans croissance du pathogène). Ce risque est relativement élevé, alors qu'en pratique le nombre de cas relaté de *E. sakazakii* est très faible. Ceci laisse entendre, aux dires de Havelaar et Zwietering, que la supposition qu'ils ont faite concernant le modèle de courbe dose-réponse de *E. sakazakii* ne correspond pas à la réalité, et que cela indique vraisemblablement que le caractère infectant de *E. sakazakii* (pour une seule cellule) n'est nullement aussi élevé. Ils font également référence à cet égard à l'observation de Pagotto et al. (2003), où des infections léthales suite à l'administration de *E. sakazakii* à des souris par voie orale ne se produisent qu'à une ingestion de 10^7 cellules pour 2 des 18 souches, et où plus de 10^8 cellules sont nécessaires à une infection pour les autres souches.

Sur base des données bibliographiques précitées et par analogie avec la conclusion de Iversen et al. (2004), on suppose qu'il est peu vraisemblable que les faibles quantités de *E. sakazakii* qui sont détectées dans les poudres de lait puissent provoquer une infection. Une longue conservation de lait en poudre dilué dans l'eau à température ambiante et/ou à température de consommation constitue toutefois le terrain de croissance idéal pour *E. sakazakii*. Par conséquent, il faut éviter l'utilisation de chauffe-biberons pour garder l'aliment préparé longtemps à température. Dans ce contexte, un article allemand recommande de ne pas conserver un aliment préparé pour nourrissons plus de 4 heures à température ambiante (Koletzko, 2004). Une meilleure méthode consiste à conserver l'aliment au réfrigérateur et à le réchauffer juste avant son utilisation.

L'utilisation de laits liquides prêts à l'emploi est une solution alternative mais la question qu'on doit se poser dans ce cas est de savoir si ces laits ont une valeur nutritive équivalente (voir rapport du CSH sur le site internet :

http://www.health.fgov.be/CSH_HGR/Français/Sommaire.htm).

De plus, il n'y a qu'une minorité des aliments qui sont disponibles sous forme liquide.

Réponse aux questions

Question 1

Le temps et la température de préparation des aliments pour nourrissons n'a pas tellement d'effet sur le risque d'infection (contrairement aux mesures d'hygiène prises), mais le temps et la température de préparation ont un effet sur le risque de croissance des *E. sakazakii* éventuellement présents dans la poudre de lait utilisée lors de la préparation. Le mode de préparation a bien un effet sur le risque d'infection. La préparation doit être assurée par du personnel correctement formé et qui est conscient que la poudre de lait n'est pas absolument stérile et qu'une faible contamination due à *E. sakazakii* peut être possible (< 1 ufc par 10 g). Au moment de la préparation, il importe de respecter les mesures d'hygiène requises et les points d'attention et/ou les points critiques de la biberonnerie doivent être identifiés et gérés conformément aux principes HACCP qui sont en même temps d'application pour les "cuisines de collectivités".

En ce qui concerne la croissance de *E. sakazakii* pendant la préparation, on suppose que la poudre de lait est réhydratée à température ambiante au moyen d'eau à température ambiante (la température exacte de préparation varie d'une poudre à l'autre en fonction de la solubilité). On suppose que la poudre de lait satisfait à la norme minimale (absence de *E. sakazakii* dans 10 g) ce qui, vu la faible quantité de poudre de lait utilisée lors de la préparation des biberons pour les nourrissons (15-40 g), revient à supposer une contamination initiale d'environ 1-2 cellules par biberon. Par ailleurs, on suppose également que l'aliment est refroidi immédiatement après la préparation et qu'il n'est pas réchauffé à 37°C (le réchauffement fait l'objet de la question 3). La phase de latence à température ambiante (23°C) étant de 2,76 h en moyenne (1,76 h au minimum), le temps de génération étant de 40 minutes en moyenne et la température minimale de croissance étant de 5,5°C à 7°C, il est recommandé de refroidir à 5°C les laits préparés au plus tard dans les 2 h qui suivent. Les temps de génération et les phases de latence appliqués sont basés sur des données bibliographiques portant sur des souches cultivées au préalable dans des conditions optimales de laboratoire, et il s'avère en effet que des bactéries stressées peuvent présenter un allongement considérable de leur phase de latence. Les valeurs de la littérature appliquent donc un scénario "worst case".

Question 2

La croissance n'étant pas possible à < 5,5°C, il n'y a aucun problème si le lait est conservé pendant 24 h après sa préparation à une température de 5 °C au maximum.

Le transport éventuel des aliments préparés pour nourrissons doit se faire dans des conditions réfrigérées.

A l'étranger, on recommande une durée de conservation de maximum 24 h pour les aliments pour nourrissons (préparés avec du lait en poudre reconstitué). Cette durée est mentionnée dans un rapport néerlandais ('Handhavingsactie Enterobacter sakazakii in zuigelingenvoeding', Heuvelink et al., 2003, hoofdstuk Risicomanagement in Nederlandse ziekenhuizen) ainsi que dans un rapport canadien ('Powdered infant formula and fatal infection with Enterobacter sakazakii', JAMC juni 2002, 166 (12), Canadian Medical Association Erica Weir).

Question 3

On suppose que la température du "bain-marie" (ou d'un moyen de réchauffement équivalent) utilisée pour réchauffer le lait préparé avant de le donner au nourrisson est de 37°C. On part de l'hypothèse qu'à une température de 37°C, il n'y a pas de phase de latence et que le temps de génération est de 30 minutes en moyenne (on admet qu'en raison de la variation observée à

23 °C entre les souches, le temps de génération minimum est de 20 minutes). Ainsi donc, 30 minutes à 37°C donnent lieu à maximum 1-2 multiplications. La concentration initiale dans un biberon de lait préparé est estimée à environ 1-2 cellules (voir question 1) car pendant la préparation et le stockage au froid, on suppose l'absence de croissance si ces opérations sont effectuées dans les conditions mentionnées à la question 1. Donc, les nombres de *E. sakazakii* après 30 minutes seraient de 4 à 8 cellules par biberon d'aliment préparé. Pour répondre à cette 3^e question, on est limité par la méconnaissance de la dose infectante de *E. sakazakii* (1000 cellules ?). Pour un nouveau-né prématuré, la dose infectante pourrait toutefois être encore plus faible, par ex. 100 cellules. Pour garantir une sécurité suffisante étant donné cette incertitude au sujet de la dose infectante, on conseille de limiter à 30 minutes la conservation du lait préparé pour nourrissons au bain-marie à 37°C.

Question 4

Une réponse à cette question a déjà été donnée implicitement à la question 3. Au moment de l'administration du lait préparé pour nourrissons, la température de ce lait variera entre 37°C et la température ambiante (23°C), avec des temps de génération qui varieront respectivement de 30 à 40 minutes. Il est de nouveau recommandé de garantir une sécurité suffisante et de limiter le temps d'administration à 30 minutes, ce qui donnera lieu à 1 multiplication au maximum.

En tenant compte en même temps des réponses aux questions 3 et 4, il y aurait, dans le cas le moins favorable, 3 multiplications (par ex. passage de 1-2 cellules à 8 à 16 cellules, soit une augmentation de ± 1 unité logarithmique) au cours de la préparation, du maintien au chaud et de l'administration du lait préparé pour nourrissons, un processus dont la durée totale est de maximum 1 h.

A condition qu'il ne s'écoule qu'une heure depuis le réchauffement à 37°C du lait en poudre réhydraté jusqu'à la fin du repas, il y a une marge raisonnable entre le nombre de cellules de *E. sakazakii* développées (8 à 16 cellules) et la dose infectante (100 à 1000 cellules ?).

Question 5

La terminologie "réchauffer une deuxième fois" porte à confusion et n'est pas souhaitable car en pratique, on ne peut pas toujours contrôler la période maximale totale autorisée de 1 h à 37°C (telle que déduite des réponses aux questions 3 et 4) lors de telles opérations de réchauffement, première administration, nouveau réchauffement et deuxième administration). Ce que peut éventuellement vouloir dire la question 5, c'est "l'aliment préparé pour nourrissons peut-il être gardé chaud ?". Cela renvoie toutefois aux questions 3 et 4 où on dit qu'il ne peut s'écouler qu'une heure au maximum entre le réchauffement du lait en poudre réhydraté et la fin du repas.

Remarques

Remarque 1

En respectant les directives proposées dans le présent avis, on élimine virtuellement le risque d'infections néonatales par *E. sakazakii*. Ceci n'est toutefois valable qu'à condition de respecter une norme de production préconisant l'absence de *E. sakazakii* par 10g de poudre de lait, ce qui n'est pas légalement obligatoire.

Remarque 2

Dans le cadre du présent avis, il est intéressant de faire référence aux conclusions de l'atelier "Enterobacter sakazakii and other microorganisms in Powdered Infant Formula", Genève, February 2004, du FAO/WHO.

(<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/feb2004/en>).

Outre d'autres aspects, le Comité scientifique mentionne notamment que

- l'utilisation de formulations commerciales liquides stériles d'aliments prêts à l'emploi pour nourrissons ou de formulations qui ont subi un traitement thermique effectif (par ex. par réhydratation au moyen d'eau suffisamment chaude ou par réchauffement suffisant de la poudre de lait réhydratée) est recommandée pour les nourrissons présentant un risque accru d'infection par *E. sakazakii* (prématurés, nourrissons dont la mère est contaminée par le virus du SIDA);
- l'industrie alimentaire doit être encouragée à :
 - 1° produire une gamme plus étendue de laits prêts à l'emploi disponibles dans le commerce, et
 - 2° procéder à un monitoring environnemental effectif sur les sites de production;
- dans le "code of practice" du Codex Alimentarius, il faut davantage tenir compte des risques microbiologiques de la poudre de lait et qu'il faut éventuellement envisager d'ajouter des spécifications adéquates pour *E. sakazakii*.

Remarque 3

Dans le présent avis, la problématique des circuits d'alimentation entérale n'est pas abordée. C'est le cas cependant dans les 2 rapports étrangers, qui comportent les directives suivantes:

- Dans un rapport néerlandais ('Handhavingsactie Enterobacter sakazakii in zuigelingenvoeding', Heuvelink et al., 2003, chapitre Risicomanagement in Nederlandse ziekenhuizen), on préconise de limiter à un minimum le temps de séjour dans les réservoirs remplis (et les circuits d'alimentation entérale) et de ne jamais dépasser une période de 8 heures.
- Dans un rapport canadien et dans une recommandation de la FDA (<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>), il est conseillé de limiter, durant l'alimentation entérale, à un maximum de 4 heures le temps de maintien de l'aliment à température ambiante dans un sac et dans les tuyaux qui y sont attachés. Un avertissement clair au sujet des dépassements de ce laps de temps est mentionné.

Le Comité scientifique n'étant pas familiarisé avec l'alimentation entérale et le temps d'administration normal de ce processus, il est souhaitable de soumettre cette matière à des experts compétents.