



Lactarium

Recommandations pour la surveillance bactériologique Le point de vue du bactériologiste

Pierrette Melin

Microbiologie, Université de Liège

Microbiologie clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Liège

Introduction

Balance risques - bénéfiques

- **Rôles essentiels du lait maternel**
 - Anti-infectieux
 - Immuno-modulateur
 - Métabolique
 - Probiotique potentiel
- **Microbiome ou écosystème complexe du lait maternel**
 - Prédominance de staphylocoques, streptocoques, bactéries lactiques, *Propionibacterium sp*, *Bifidobacterium sp*
 - Flore normale transitoire des glandes mammaires
 - De fin de grossesse → fin allaitement avec variations
 - En moindre quantité: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, ...
- **Contamination < manipulation à récolte**

L Fernandez, S Langa et al, Pharmacological Research 2012

Delgado et al., 2009; Heikkila & Saris, 2003

Introduction

Balance risques - bénéfiques

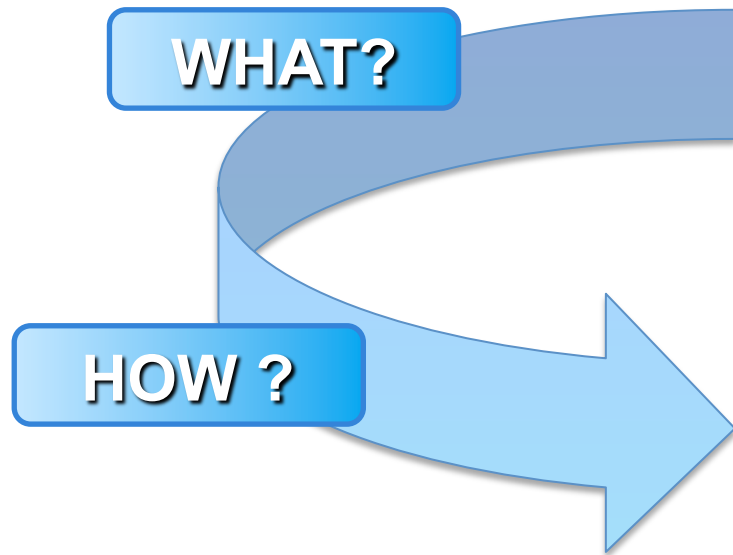
- **Description d'infections et épidémies néonatales liées à consommation lait maternel cru**
 - ***E.coli***
 - ***Serratia marcescens***
 - ***Pseudomonas aeruginosa***
 - ***Enterobacter cloacae***

- **Pas/peu d'évidence de seuil critique de contamination, de sécurité, relation dose /risque infectieux**
- **Standards utilisés souvent // industrie agro-alimentaire concernant le lait de vache**
- **Limites utilisées variables**
- **Pas de standards microbiologiques**

Divers critères

- **NICE clinical guidelines 2003 (UK) for pasteurisation in milk bank** (issue date : 2010)
 - **Jeter les échantillons avec un dénombrement excédant:**
 - **$\geq 10^5$ CFU/ml de flore viable totale et/ou**
 - **10^4 CFU/ml *enterobacteriaceae* et/ou**
 - **10^4 CFU/ml *Staphylococcus aureus* et/ou**
 - **Présence de *Bacillus sp.***

- **Proposition de recommandations pour prématurés de moins de 32 semaines à discuter (CSS 2014)**
 - **Lait cru acceptable pour les échantillons avec**
 - **$< 10^4$ CFU/ml de flore viable totale**
 - **$< 10^3$ CFU/ml *enterobacteriaceae***
 - **$< 10^3$ CFU/ml *Staphylococcus aureus* et/ou**
 - **Absence de *Bacillus sp***



CULTURE, MILIEUX, ENSEMENCEMENT, INCUBATION, IDENTIFICATION

Culture de lait maternel

Procédures

- **Milieux de culture**
- **Dénombrement**
 - Microorganismes viables totaux
 - Microorganismes spécifiques exclus ou limités
- **Procédures d'ensemencement**
- **Identification**

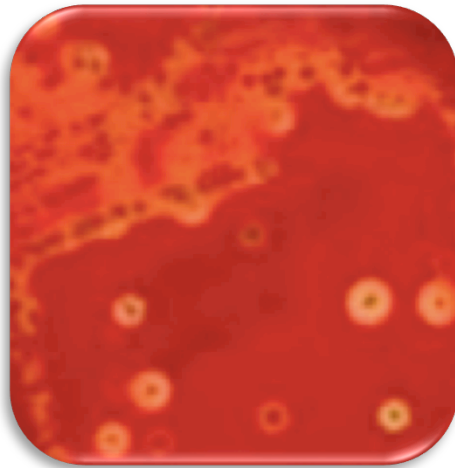
Milieux de culture

- **Milieu nutritif**
 - **Gélose au sang**
- **Milieux différentiels**
 - **Gélose MacConkey**
 - **Gélose au sang + CNA**
 - **Gélose mannitol, gélose chromogène *S.aureus***
 - **Gélose « GBS » (Granada, chromogène)**

Milieux de culture

Milieux	Microorganismes
Nutritifs <ul style="list-style-type: none">• Gélose au sang	<ul style="list-style-type: none">• Flore totale, <i>Bacillus</i> sp.
Différentiels <ul style="list-style-type: none">• Gélose MacConkey• Gélose au sang + CNA• Gélose mannitol ou chromogène <i>S.aureus</i>• Gélose « GBS » (Granada, chromogène GBS)	<ul style="list-style-type: none">• Bacilles Gram négatif (<i>enterobacteriaceae</i>, <i>Pseudomonas</i> sp, ...)• Cocci et bacilles Gram positif (y compris <i>S.aureus</i> et <i>Bacillus</i> sp.)• <i>Staphylococcus aureus</i>• <i>Streptococcus agalactiae</i>

Milieux de culture



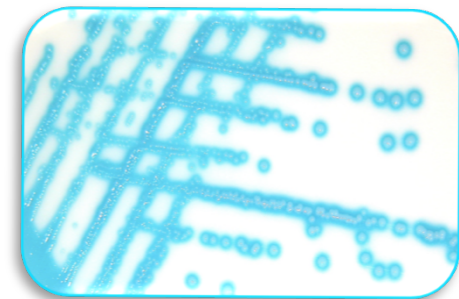
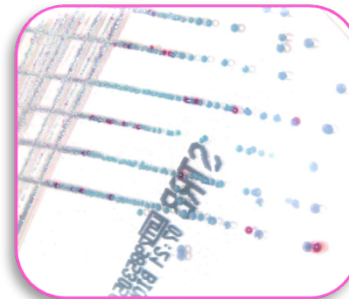
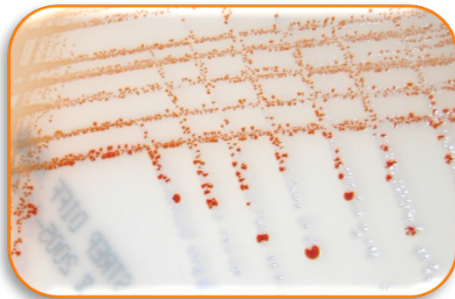
Gelose au sang



MacConkey

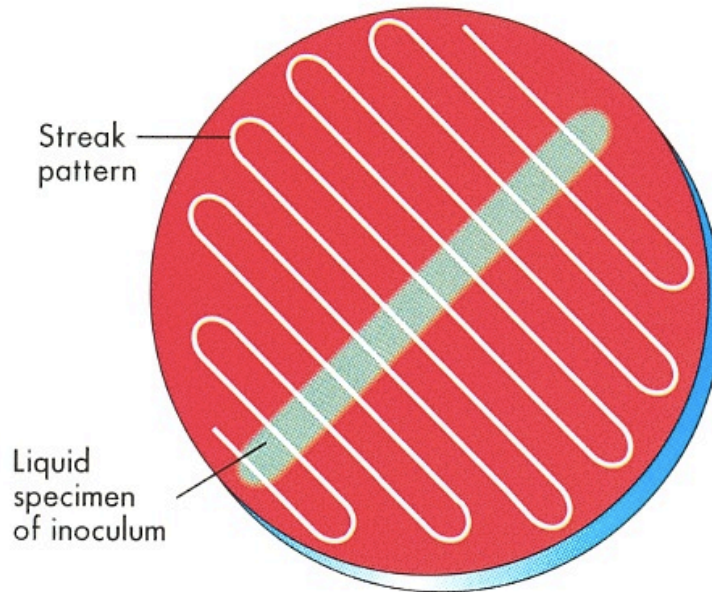


Agar Mannitol



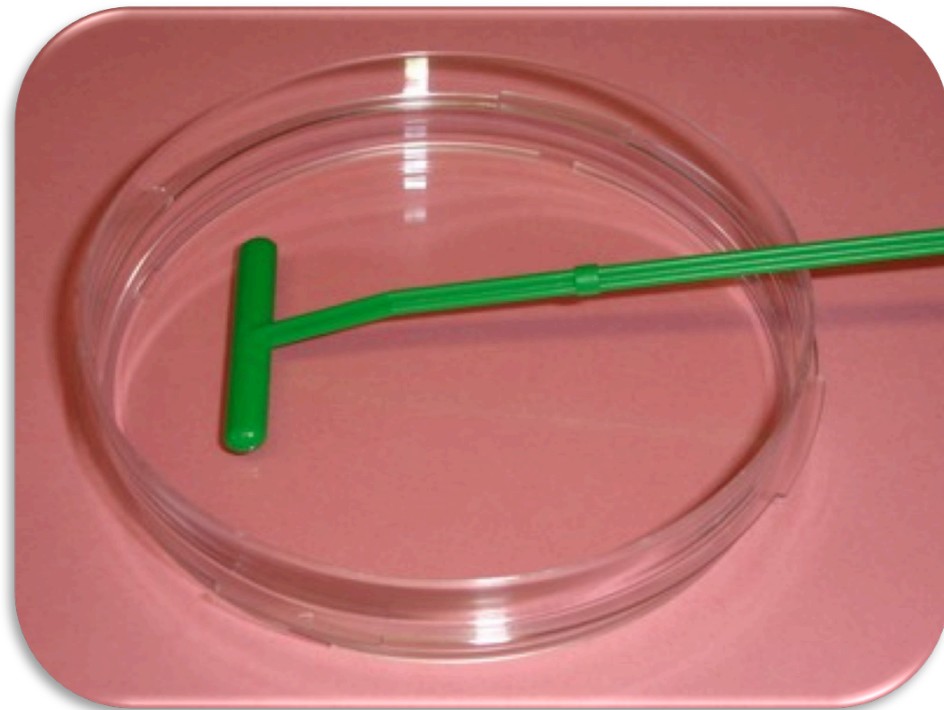
Différents agars différentiels pour GBS

Mise en culture quantitative d'échantillon liquide - anse calibrée



1 μl (ou 10 μl) par ex. \rightarrow 1 CFU observée correspond à 1.000 (ou 100) CFU/ml de suspension, échantillon de départ.

Mise en culture quantitative d'échantillon liquide - micropipette



10 μ l (ou 100 μ l) par ex., étalement à l'anse ou au râteau → 1 CFU observée correspond à 100 (ou 10) CFU/ml de suspension, échantillon de départ.

Mise en culture quantitative d'échantillon de lait maternel

- **Reproductibilité**
 - **Coefficient de variation « important »**
 - **Viscosité variable, différente d'une urine !**
- **Incubation 24-48 h en aérobie +/- CO₂**
 - **24 h le plus souvent suffisant pour les pathogènes et microorganismes importants à détecter et à dénombrer**
- **Nécessité de recommandations pour**
 - **Recueil hygiénique,**
 - **Conservation**
 - **Transport**

Critères proposés à discuter (CSS 2014)

■ Acceptable pour consommation cru

- $\leq 10^4$ CFU/ml de flore viable totale
- $\leq 10^3$ CFU/ml *enterobacteriaceae*
- $\leq 10^3$ CFU/ml *Staphylococcus aureus**
- Absence de *Bacillus sp*

* Risque libération d'entérotoxine

■ Acceptable pour pasteurisation

- $> 10^4$ à $\leq 10^5$ CFU/ml de flore viable totale
- $> 10^3$ à $\leq 10^4$ CFU/ml *enterobacteriaceae* 10^4 CFU/ml
- $> 10^3$ à $\leq 10^4$ *Staphylococcus aureus*
- Absence de *Bacillus sp**

* résiste à la pasteurisation et croissance favorisée

Critères proposés à discuter (CSS 2014)

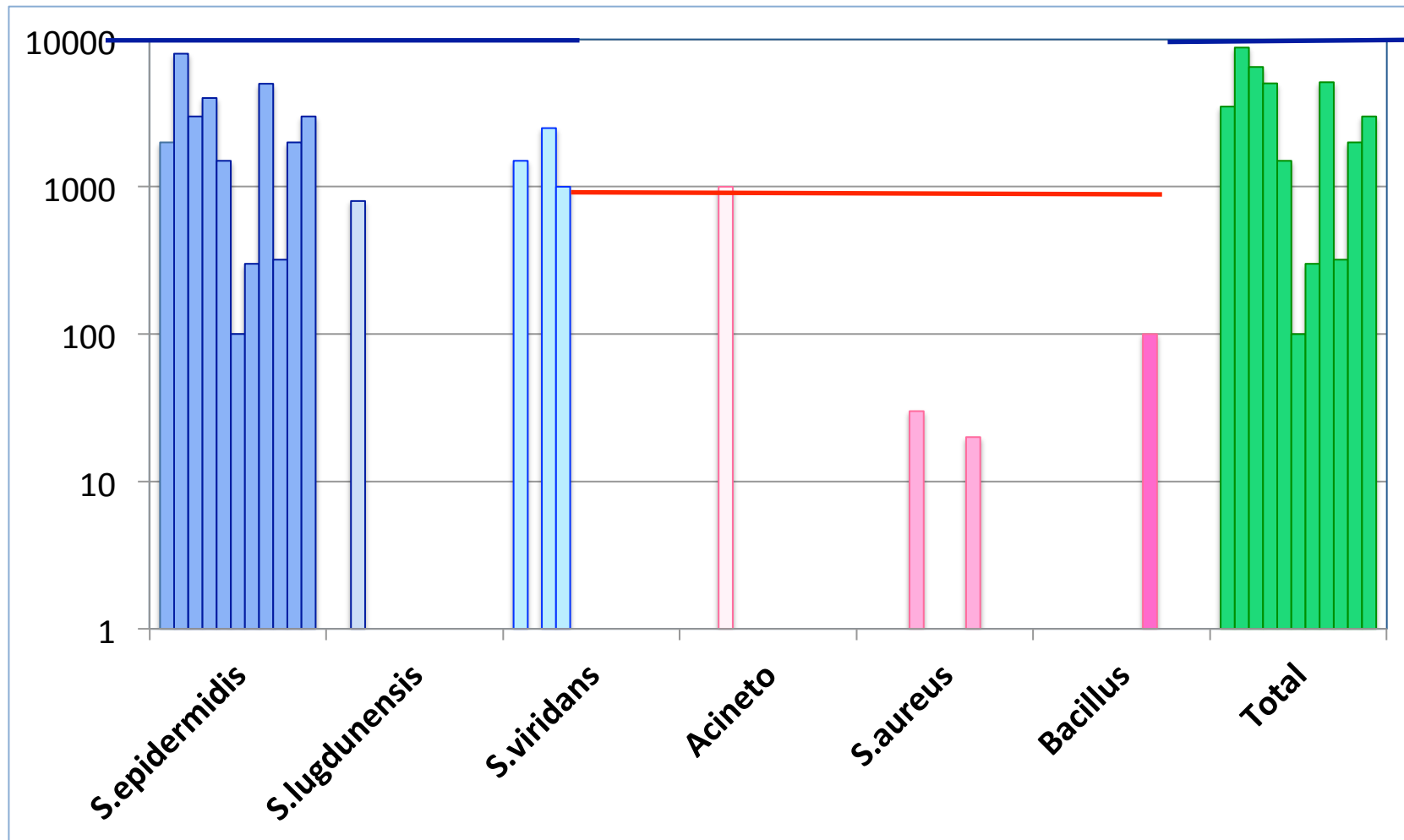
■ À éliminer

- $> 10^5$ CFU/ml de flore viable totale et/ou
- $> 10^4$ CFU/ml *enterobacteriaceae* et/ou
- $> 10^4$ CFU/ml *Staphylococcus aureus* * et/ou
- Présence de *Bacillus sp.*

* Risque libération d'entérotoxine thermostable

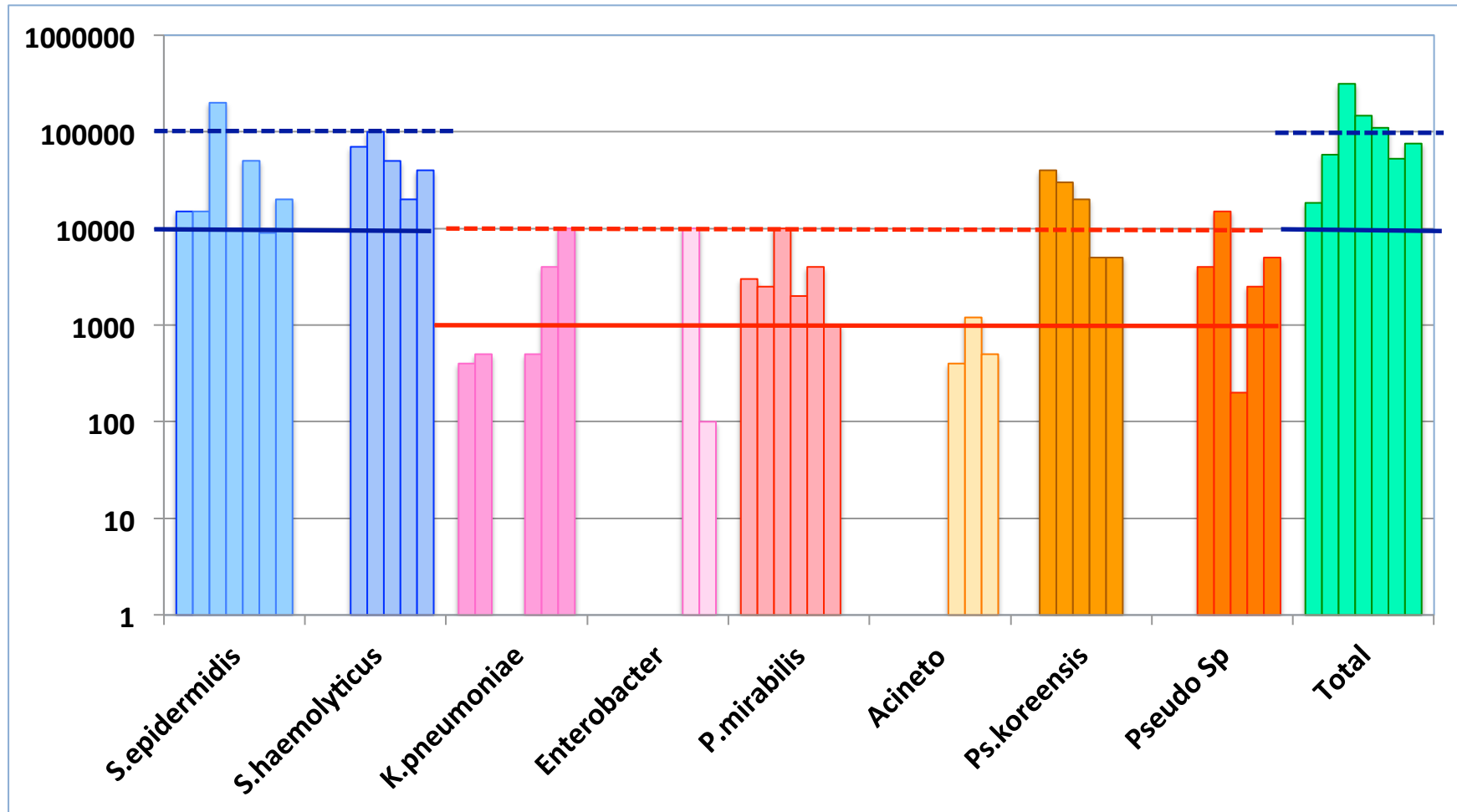
Cas clinique: mère 1

CFU/ml; 12 laits sur période de 8 jours



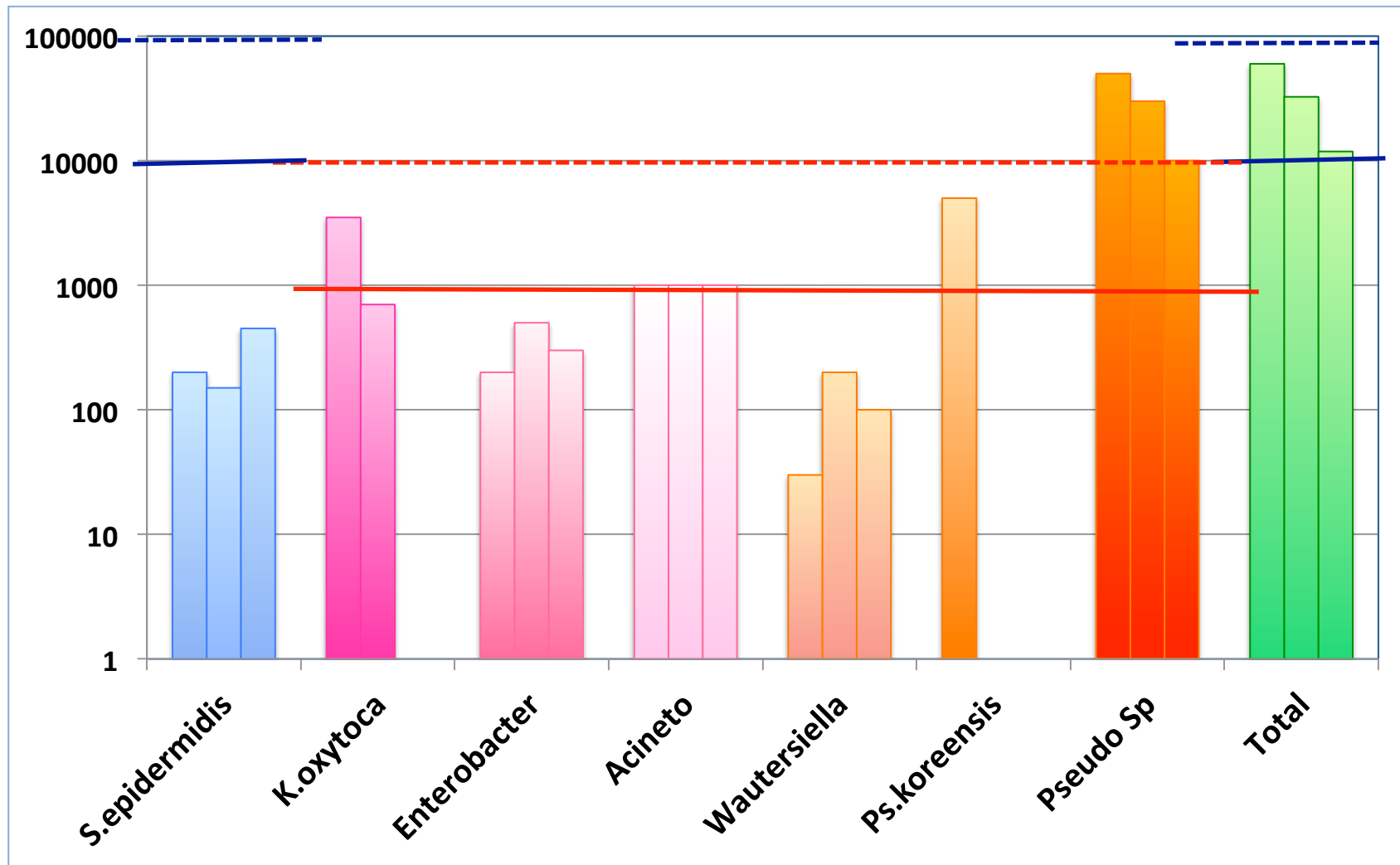
Cas clinique: mère 2

CFU/ml; 7 laits sur période de 3 jours



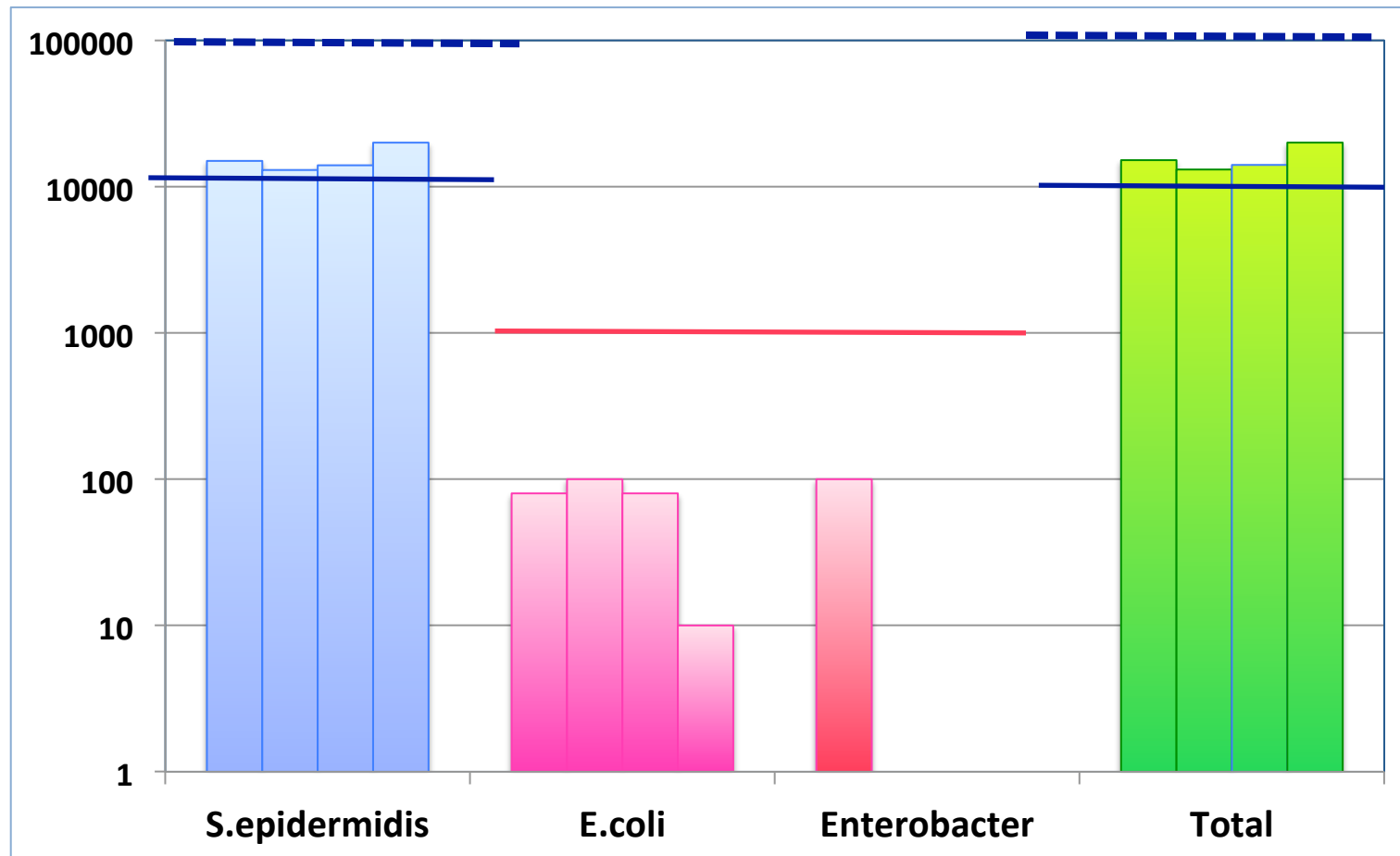
Cas clinique: mère 3

CFU/ml; 3 laits sur période de 4 jours



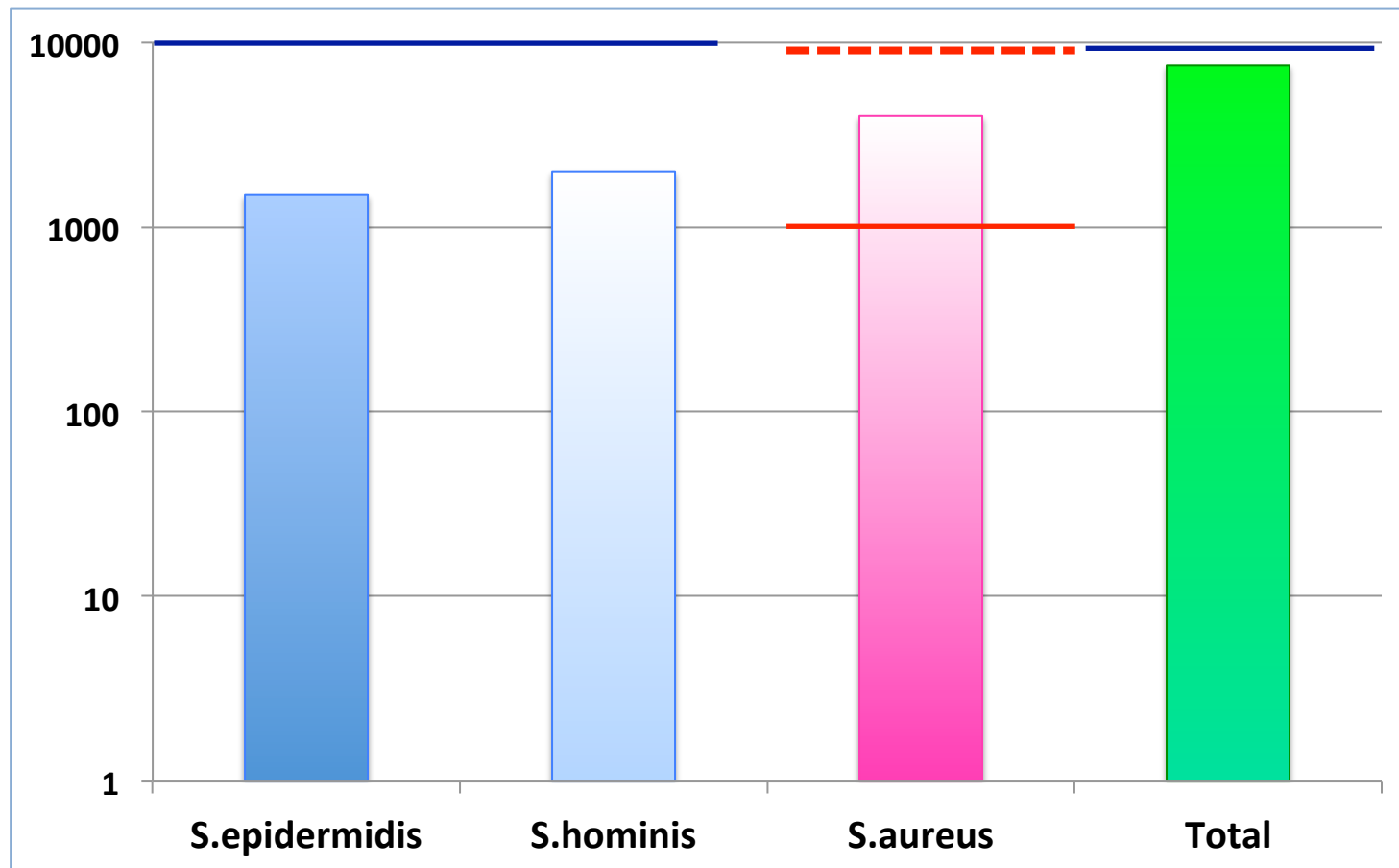
Cas clinique: mère 4

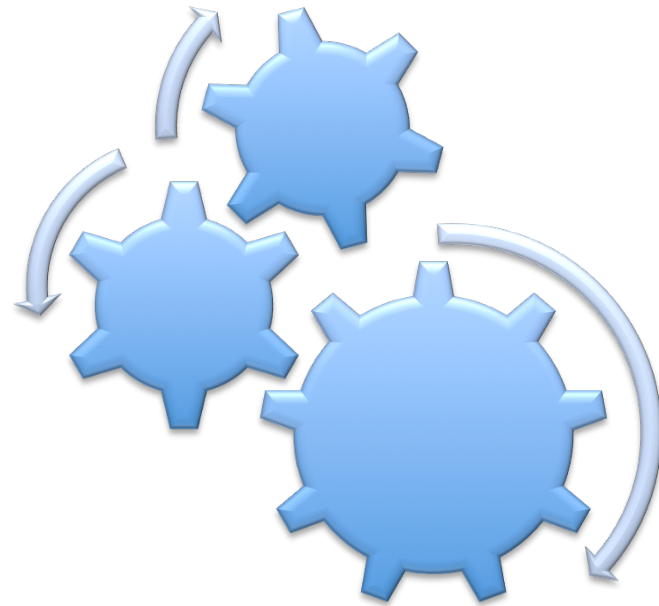
CFU/ml; 4 laits sur période de 1 jour



Cas clinique: mère 5

CFU/ml; 1 lait





“Take home messages”

Résumé

- **Absence de critères de décision**
- **Besoin de guidelines**
- **Inoculation minimum**
 - **10 µl sur gélose au sang(GS) +/- CNA**
 - **100 µl sur gélose MacConkey**
 - **+/- 100 µl sur gélose *S.aureus* ?**
 - **+/- 100 µl sur gélose *GBS* ?**
- **Identification**
 - **Pas nécessaire sur MacConkey, mil SA et GBS**
 - **Oui sur GS**