

# *Cronobacter* spp.

*Enterobacter sakazakii*  
Famille des *Enterobacteriaceae*  
Bactérie

## Caractéristiques et sources de *Cronobacter* spp.

### Principales caractéristiques microbiologiques

Les *Cronobacter* spp., responsables d'infections humaines, sont des bâtonnets mobiles de 1 à 3 µm de longueur, anaérobies facultatifs, à coloration de Gram négative, asporulés, thermotolérants, oxydase négative et catalase positive. Une particularité phénotypique utile à leur détection est une activité alpha-glucosidase. Aucun schéma de sérotypage n'est connu. Leur capacité à former des biofilms, et leur relative résistance au stress osmotique et à la dessiccation, comparativement aux autres entérobactéries, favorisent leur persistance notamment dans les environnements secs, tels que les poudres de lait et leur environnement de production.

Ces micro-organismes classés initialement dans l'espèce unique *Enterobacter sakazakii*, ont été en 2007 reclassés au sein d'un nouveau genre : *Cronobacter*, comprenant six espèces : *C. sakazakii* (espèce type), *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* (divisée en 3 sous espèces) et *C. genomospecies* I. Exceptée la dernière, toutes ces espèces, isolées chez l'Homme, sont classées comme pathogènes opportunistes. Les isolats associés aux cas de méningites néonatales appartiennent aux espèces *C. sakazakii*, *C. malonaticus* et *C. turicensis*.

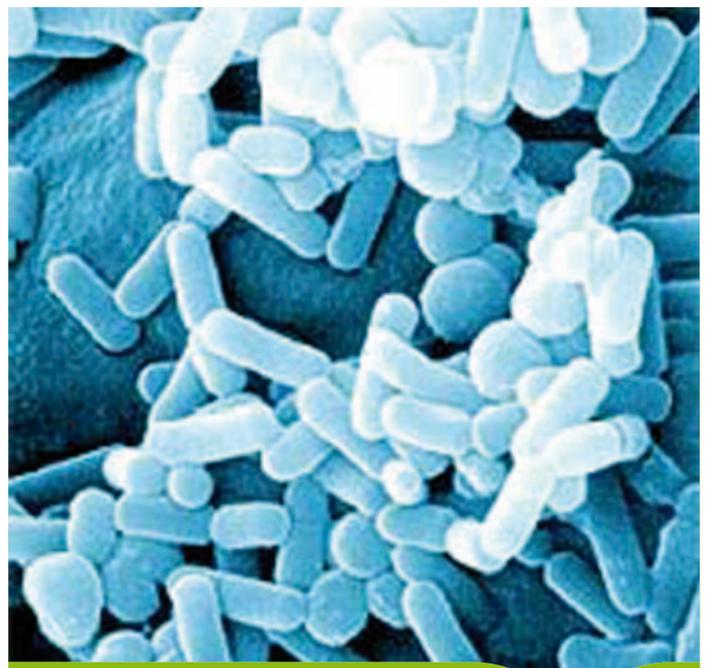
Depuis le premier cas humain en 1958, les connaissances concernant les mécanismes de virulence et le pouvoir pathogène de ce micro-organisme restent très incomplètes et peu de travaux concernent l'existence de toxines produites par *Cronobacter*. De manière générale, la synthèse d'entérotoxines pourrait concerner 22 à 27 % des souches testées et les souches alimentaires seraient moins virulentes que les souches humaines.

Le pathogène peut survivre jusqu'à 2 ans à une  $a_w$  de 0,14-0,27 (produit sec). Le temps de génération est de 300 min à 10 °C, 40 min à 23 °C, et 20 min à 37 °C (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques de croissance

Paramètres	Croissance	
	Optimum	Extrêmes
Température (°C)	Environ 39	5,5 - 47
pH	5-9 selon les souches	3,89 - 10
NaCl	/	1,2 mol.l <sup>-1</sup>

(1) Population sensible: les personnes ayant une probabilité plus forte que la moyenne de développer, après exposition au danger par voie alimentaire [dans le cas des fiches de l'Anses], des symptômes de la maladie, ou des formes graves de la maladie.



*Enterobacter sakazakii*

### Sources du danger

*Cronobacter* est un micro-organisme d'origine tellurique, ubiquitaire, présent à la fois dans l'eau, le sol, les végétaux, les poussières ainsi que chez de nombreux êtres vivants. Les rongeurs et les insectes comme les mouches, peuvent être des vecteurs de contamination. *Cronobacter* a été isolé de nombreux aliments d'origine végétale ou animale, tant déshydratés, fumés, congelés, fermentés, que crus ou cuits.

### Voies de transmission

La transmission à l'Homme s'effectue exclusivement par voie alimentaire. La transmission directe entre Hommes n'a pas été démontrée. Le portage sain et la part des infections nosocomiales sont encore mal connus.

# Maladie humaine d'origine alimentaire

## Nature de la maladie (Tableau 2)

**Populations sensibles<sup>(1)</sup>:** principalement, les nourrissons de moins de deux mois, hypotrophes et/ou prématurés et les très jeunes enfants. À un moindre niveau, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés ou ayant un terrain de pathologies sous-jacentes sévères.

## Relations dose-effet<sup>(2)</sup> et dose-réponse<sup>(3)</sup>

Ces relations sont mal connues même si la relation dose-réponse est supposée linéaire à de faibles doses et que l'ineffectivité par cellule (nombre de cas/nombre d'expositions à un seul organisme) a été estimée à  $8,9.10^{-6}$ . Toutefois cette dernière relation est sans doute surestimée et en cours de réévaluation.

## Épidémiologie

Environ six nouveaux cas d'infections à *Cronobacter* sont rapportés chaque année à travers le monde, mais l'incidence est sans doute sous-estimée. Environ 130 cas d'infections à *Cronobacter*, dont 20 cas chez des adultes, sont documentés dans le monde depuis 50 ans dont 27 cas mortels. Selon FoodNet, le réseau américain de surveillance active des maladies d'origine alimentaire, en 2002, le taux d'infections invasives dues à *Cronobacter* était estimé à 1/100000 chez les nourrissons de moins de 12 mois, et passait à 8,7/100000 chez les nouveau-nés de faible poids.

Il n'existe pas de système de surveillance spécifique pour ce micro-organisme en France et en Europe. Au niveau mondial, la surveillance est assurée par le Centre collaborateur OMS de référence, recherche et formation sur *Cronobacter* (University College, Dublin, Irlande). Ces infections sont cependant recensées indirectement en France par le système de signalement des infections nosocomiales (Décret n° 2001-671 du 26 juillet 2001). Trois cas groupés ou épidémies principales ont été décrits dans le monde: en Belgique en 1998 (12 enfants, 2 morts), aux USA en 2001 (Knoxville, 49 enfants) et en France en 2004. L'épisode de cas groupés français, survenu dans 5 hôpitaux différents, était associé à la consommation d'une préparation de lait en poudre pour nourrissons destinée à des fins médicales spéciales. Neuf cas ont été recensés, parmi lesquels 4 infections (dont 2 méningites mortelles) et 5 colonisations digestives. Le nombre total de cas français enregistré est de 22 à ce jour.

(2) Relation entre la dose (la quantité de cellules microbiennes ingérées au cours d'un repas) et l'effet chez un individu.

(3) Pour un effet donné, relation entre la dose et la réponse, c'est-à-dire la probabilité de la manifestation de cet effet, dans la population.

Tableau 2. Caractéristiques de la maladie

Durée moyenne d'incubation	Populations cibles	Durée d'excrétion	Durée des symptômes
6-15 jours, variable selon la dose ingérée et l'état de l'hôte	Tous consommateurs des aliments impliqués quels que soient l'âge et le sexe (cf. rubriques « Épidémiologie », « Principaux aliments à considérer ») Particulièrement, les nouveau-nés nourris avec des laits maternisés non stériles Personnes âgées plutôt immunodéprimées	Inconnue (une étude montre une excrétion possible jusqu'à 18 semaines)	Variable selon les formes cliniques
Principaux symptômes		Complications	Formes asymptomatiques
Nouveau-nés	Méningites: 41 % Septicémies, bactériémies: 18 % Entérocolites nécrosantes: 16 % Autres (abcès, conjonctivites, etc.): 25 %	Séquelles neurologiques sévères (hydrocéphalie, etc.) Retard de développement Létalité estimée: 40 - 80 %	Existentes
Adultes	Abcès: 10 % Colonisations: 35 % Bactériémies: 20 % Ostéomyélites: 5 % Pneumonies: 20 % Autres (ulcères, etc.): 10 %	Létalité: non estimée	Existentes

# Rôle des aliments

## Principaux aliments à considérer

Toutes les préparations en poudre destinées aux nourrissons ou aux jeunes enfants ou aux personnes âgées, y compris les préparations à des fins médicales spéciales, y compris les additifs ajoutés à ces préparations sont des produits à risque. Seules les préparations liquides stériles sont des produits sûrs.

*Cronobacter* ne survivant pas à la pasteurisation, la contamination des préparations en poudre s'effectue par l'environnement de production. Ainsi, des études de sites de production ont mis en évidence une contamination environnementale fréquente, notamment aéroportée. Les matières premières n'ayant subi aucun traitement préalable par la chaleur, car sensibles à celle-ci, et intégrées aux denrées alimentaires déshydratées en fin de procédé, sont également à l'origine de la contamination du produit final et/ou de son environnement de production.

En dépit du fait que la contamination de l'environnement de production peut être élevée, celle des préparations en poudre est faible: de < 0,001 à quelques ufc par 10 kg dans les poudres commercialisées en France en 2007. C'est après reconstitution et conservation du produit dans des conditions favorables à la croissance de *Cronobacter* que des infections humaines se produisent.

Tableau 3. Traitements d'inactivation en milieu industriel

Désinfectants	Chaleur
Sensible à de nombreux désinfectants: • hypochlorite de sodium à 1 %; • éthanol à 70 %; • glutaraldéhyde à 2 %.	$D_{60^{\circ}\text{C}}$ = 0,9-4,4 min. $D_{70^{\circ}\text{C}}$ = 0,07 min. Certaines souches possèdent une thermotolérance plus élevée ( $D_{58^{\circ}\text{C}}$ : 9,9 min) que la plupart des entérobactéries.
Hautes pressions	Ionisation
600 MPa, 1 min: 3 à 6,8 réductions décimales*. 350-400 MPa, 10-15 min à 25 °C, 7 réductions décimales.	$D_{10}^{***}$ = 0,24 à 0,37 kGy en milieu liquide. Toutefois, l'ionisation n'est pas utilisée sur les préparations déshydratées, en raison des altérations organoleptiques et nutritionnelles qu'elle provoque.

\* Variable selon les souches étudiées.

\*\* D est le temps nécessaire pour diviser par 10 la population du danger microbologique initialement présente.

\*\*\*  $D_{10}$  est la dose (en kGy) nécessaire pour réduire une population à 10 % de son effectif initial.

## Surveillance dans les aliments

Concernant les préparations en poudre pour nourrissons et les aliments diététiques en poudre destinés à des fins médicales spéciales pour nourrissons de moins de six mois, le Règlement (CE) n° 2073/2005 modifié fixe un critère d'hygiène des procédés (absence d'entérobactéries dans 10 g, 10 échantillons analysés par lot), et un critère de sécurité (absence de *Cronobacter* dans 10 g, 30 échantillons analysés par lot). Ce dernier critère est équivalent à celui fixé par le *Codex alimentarius*. Le règlement indique par ailleurs que des essais en parallèle doivent être réalisés pour les entérobactéries et pour *Cronobacter*, sauf si une corrélation peut être établie, par le fabricant, au niveau de son usine. Le Règlement (CE) n° 2073/2005 impose l'utilisation de la spécification technique ISO/TS 22964.

Bien que l'eau soit utilisée pour la reconstitution des préparations en poudre, il n'existe pas de méthodes d'analyse de *Cronobacter* dans le domaine de la microbiologie des eaux.

De nouveaux milieux de culture chromogéniques ont été récemment développés et des méthodes commerciales de criblage des échantillons par biologie moléculaire (PCR temps réel ou point final) existent pour détecter cette bactérie mais ne sont pas toutes validées par rapport à une méthode de référence. D'un point de vue de la surveillance moléculaire de *Cronobacter*, l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) est en cours de normalisation au niveau du réseau international Pulsenet pour devenir la méthode de référence.

### Recommandations aux opérateurs

- Assurer la maîtrise des contaminations environnementales dans les unités de fabrication des préparations en poudre. La prolifération bactérienne dans l'environnement des ateliers doit être maîtrisée par un plan d'hygiène strict, et une absence d'humidité la plus poussée possible ; ainsi, la détection de la présence d'*Enterobacteriaceae* dans les produits et les ingrédients, le zonage (séparation nette des zones humides et sèches) et le remplacement du nettoyage à l'eau par le nettoyage à sec, sont des mesures efficaces.
- Établir des critères d'hygiène très stricts sur les lignes de fabrication des préparations en poudre pour maîtriser les *Enterobacteriaceae*. Sans que la corrélation soit comprise, ceci entraîne une réduction significative de la prévalence de *Cronobacter*.
- Compléter l'échantillonnage préconisé par la réglementation, afin d'en augmenter l'efficacité, en gardant en mémoire que celui-ci ne peut à lui seul garantir l'innocuité des produits. C'est la qualité de la production d'une ligne de fabrication donnée qu'il est utile d'estimer en regroupant les données de surveillance de lots successifs et en faisant des analyses de tendance, comme cela est proposé par le Règlement (CE) n° 2073/2005.
- Éviter le « poolage » (regroupement des prises d'essais à taux de dilution constant pour les analyses microbiologiques) car il a un impact négatif sur les performances de la méthode de détection de *Cronobacter*.
- Établir des critères d'acceptation des matières premières et des ingrédients secs ajoutés aux préparations en poudre.

## Hygiène domestique

Une contamination externe à domicile ou dans les établissements hospitaliers durant la reconstitution des poudres de lait (par transfert de contamination, en utilisant, par exemple, des ustensiles contaminés) est possible. Lors des cas groupés observés en Israël en 2001, une contamination du mixeur était en cause. Par ailleurs, de mauvaises conditions de reconstitution et de conservation peuvent permettre la croissance du pathogène et la survenue d'infections.

L'Afssa en 2005, et l'OMS en 2007, ont publié des recommandations sur la reconstitution, la conservation et la manipulation, dans de bonnes conditions, des préparations en poudre pour nourrissons ; ces documents

sont à destination des structures d'accueil de la petite enfance, des établissements hospitaliers et des particuliers.

L'OMS a conclu qu'une température de reconstitution des biberons supérieure ou égale à 70 °C pourrait efficacement réduire les risques de contamination des préparations en poudre par destruction de *Cronobacter*. Cependant, ce moyen de maîtrise est controversé non seulement du fait des risques de brûlures lors de l'ingestion, en cas de mauvais refroidissement des biberons mais également par une possibilité de destruction de certains nutriments et la germination possible de spores de *Bacillus cereus*.

### Recommandations aux consommateurs

- Se laver les mains avant de préparer les aliments et avant le repas.
- Utiliser des ustensiles et des biberons propres.
- Réduire à une heure au maximum le délai s'écoulant entre la préparation et la consommation si le produit est à température ambiante, et à 30 minutes s'il a été réchauffé.
- Conserver les repas/biberons reconstitués à des températures ne dépassant pas 4 °C et au plus pendant 48 heures.
- Après utilisation : vider le biberon, rincer au robinet à l'eau froide puis plonger le biberon et ses accessoires dans de l'eau chaude additionnée de liquide vaisselle, nettoyer le biberon avec un goupillon et rincer. Laisser sécher sans essuyer. Un nettoyage soigneux et un égouttage suffisent. Il n'est pas indispensable de stériliser le biberon.
- Utiliser de l'eau destinée à la consommation humaine.
- Utiliser de préférence des préparations stériles sous forme liquide pour les nourrissons les plus sensibles à l'infection.

## Références et liens

### Références générales

- Afssa (2005). Recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons. <http://www.afssa.fr/Documents/MIC-Ra-BIB.pdf>
- Afssa (2007). Contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées. <http://www.anses.fr/cgi-bin/countdocs.cgi?Documents/MIC-Ra-PoudresLait.pdf>
- CAC, *Codex Alimentarius* Commission (2008). Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP66-2008. [http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.isp](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.isp).
- CCFH, Codex Committee on Food Hygiene (2009). Alinorm 09/32/13. Agenda item 4. *Codex Alimentarius* Commission. <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.isp?year=09>.
- EFSA (2004). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/113.pdf>
- FAO/WHO (2004). Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva. <http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en/>
- FAO/WHO (2007). Préparation, conservation et manipulation dans de bonnes conditions des préparations en poudre pour nourrissons : directives. [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif\\_guidelines\\_fr.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines_fr.pdf)
- FAO/WHO (2008). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up Formulae. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series 15. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563796\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563796_eng.pdf)

### Liens utiles

- Centre collaborateur OMS de référence, recherche et formation sur *Cronobacter* (College University Dublin, Irlande). <http://www.ucd.ie/cfs/whocollaboratingcentre/>