

Compte-rendu

Direction : Direction de l'inspection
Pôle : Inspection des produits biologiques 2
Personne en charge : Olivier PALLUY

Contrôle microbiologique du lait maternel issu des lactariums – CSST248 Séance du 27 janvier 2020

Ordre du jour

Points	Sujets abordés	pour audition, information, adoption ou discussion
	Présentation introductive	
1.	Techniques de contrôle microbiologique des eaux	
1.1	Présentation de l'organisation du contrôle microbiologique des eaux dans le laboratoire d'hygiène du groupement hospitalier du sud Francilien	Information
1.2	Discussion	Information et avis
2.	Évaluation de la détectabilité dans l'analyse de risque microbiologique du lait maternel issu des lactariums	
2.1	Évaluation des échelles de détectabilité	Information
2.2	Détection des bactéries déterminées comme étant à risque par l'analyse de risque du CSST	Avis
3.	Les entérovirus, parechovirus et flavivirus au regard du lait maternel	
3.1	Exposé du Professeur Bruno Lina	Information
3.2	Discussion	Information et avis
4.	Évaluation des modalités réglementaires des contrôles existants et propositions d'évolution	
4.1	Seuil du contrôle en post-pasteurisation	Avis
4.2	Seuils des contrôles en pré-pasteurisation	Avis
4.3	Milieus pour les contrôles pré-pasteurisation	Avis
6.	Conclusion : rappel des principales décisions de la réunion	

Participants

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent	Absent /excusé
Membres			
ADJIDE Crespin	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BREHIN Camille	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DOUCET-POUPLAIRE Florence	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FIRMESSE Olivier	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FISCHER-FUMEAUX Céline (par visio conférence)	Membre	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
HADDAD Nabila	Membre	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
LAKHDARI Yasmine	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LECOINTRE Didier	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PICAUD Jean-Charles	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RIGOURD Virginie	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Expert(s)

Professeur Bruno LINA Responsable du Centre National de Référence Entérovirus, Parechovirus et flavivirus	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--	-------------------------------------	--------------------------

ANSM

STERN Cyril		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PALLUY Olivier	Secrétaire	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEGESSIER Pascal		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BROUSSIN Anneline		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
HAAG Jean-Claude		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CHARLIER-BRET Natacha		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ROGEAU Brigitte		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
OUALIKENE-GONIN Wahiba		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MESLIER Yann		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Introduction

Point sur les DPI et les situations de conflits d'intérêts

Le secrétaire, vérifie que les membres n'ont pas de nouveaux liens à déclarer et que les DPI sont à jour.

X Aucun lien n'a été identifié pour les membres et les experts

Rappel des principaux points de la dernière séance et objectifs de la présente séance

Après avoir ciblé la population soumise à des risques de contamination microbiologique et avoir initié une première partie de l'analyse de ces risques, il apparaît que le danger provient principalement des germes, *Bacillus cereus* (Bc) *Staphylococcus aureus* et ceux de la famille des *Clostridiaceae*. Le risque doit être précisé pour les bactéries telles que les streptocoques B et *Acetivobacter*. Le comité a demandé à entendre un spécialiste des entérovirus et des parechovirus, connaissant également les flavivirus, dans le but d'avoir des informations sur les risques les plus fréquents engendrés par ces virus, au regard d'une bibliographie dont les données sont assez contradictoires.

Parmi les domaines abordés dans cette séance, une grande partie des débats porte sur la validation des méthodes et notamment la phase pré-analytique, qui consiste à s'assurer que l'échantillon est représentatif de l'ensemble du lot examiné (homogénéisation et volume de prélèvement notamment). La détermination des milieux utilisés et la détermination des seuils de non-conformité sont des paramètres plus techniques à discuter en fonction de ces éléments de validation.

En préparation de cette séance, un questionnaire permettant notamment de recueillir des connaissances sur l'évolution des techniques a été envoyé à chacun des membres.

La première présentation traite de l'organisation à mettre en place dans les laboratoires pour standardiser et ainsi pouvoir qualifier et quantifier la fiabilité dans le rendu de résultats.

1. Techniques de contrôle microbiologique des eaux

1.1. Présentation de l'organisation du contrôle microbiologique des eaux dans le laboratoire d'hygiène du groupement hospitalier du sud Francilien

Supports : présentation : « Techniques de contrôle microbiologique de l'eau »

Principaux points

- Pour le contrôle de l'eau, des normes définissent précisément les méthodes devant être appliquées pour choisir et utiliser les milieux de culture et les diluants (ISO 11133) ainsi que pour calculer les incertitudes de mesure (ISO 13843). Des lignes directrices de ces normes décrivent la validation pré-analytique ou la caractérisation des performances des méthodes utilisées dans le laboratoire.
- Les différentes techniques d'ensemencement en milieu solide (incorporation, étalement et filtration) ainsi que le principe d'ensemencement en milieu liquide sont présentés.
- Le dénombrement peut être réalisé sur des milieux de culture non spécifiques (décompte exhaustif de 30 à 300 colonies pour des boîtes de Petri standard (90 mm) ou des milieux spécifiques (décompte minimum de 10 colonies et le cas échéant, de 3 spécimens par type de colonies).
- La réalisation d'au moins 2 dilutions différentes est nécessaire pour évaluer les incertitudes de mesure et pour témoigner du maintien de la performance de la technique.
- La performance de la méthode est établie par les paramètres de sensibilité, spécificité, taux de faux positifs, de faux négatifs, linéarité et robustesse (capacité à donner des résultats identiques lors de variation de paramètre de la méthode comme la température ou la durée d'incubation), l'efficacité de récupération, la répétabilité, la reproductibilité et l'évaluation de l'incertitude lors de la numération.

- Pour évaluer la standardisation et la performance d'une technique, il est nécessaire de disposer :
 - d'échantillons d'une valeur établie et stable dans le temps (Contrôle de Qualité Interne -CQI) comparables aux échantillons à contrôler et qui sont à utiliser au moins une fois pour chaque série de tests.
 - de témoins positifs, mais aussi des témoins négatifs et des blancs. Pour le dénombrement, une valeur quantitative étant attendue, des outils statistiques adaptés (comme les cartes de contrôle) doivent être utilisés.
 - d'échantillons d'une valeur établie et stable dans le temps qui sont envoyés et testés périodiquement en aveugle par différents laboratoires (Contrôle de Qualité Externe-CQE ou comparaisons inter-laboratoire).
- Pour information, au sein du groupement hospitalier du Sud Francilien le taux de rejet de lait maternel a diminué en moyenne de plus de 60%, en conséquence du changement de méthode d'ensemencement et du passage d'un ensemencement par stries à une technique par étalement.
- Les fournisseurs de CQI n'ayant pas développé de produits pour le lait maternel, il faudra établir de façon consensuelle des CQI si possible dérivés de CQI utilisés dans d'autres domaines (eau, alimentaire...) pour pouvoir standardiser les techniques entre les lactariums. Dans un second temps, il faudra mettre en place des comparaisons inter-laboratoires.

1.2. Discussions

Tous les experts s'accordent pour dire que la standardisation doit être promue dans l'objectif d'assurer la sécurisation et de disponibilité des produits. Des démarches similaires sont suivies dans le domaine de l'alimentaire.

Néanmoins, les coûts supplémentaires apportés par le passage de CQI et surtout la réalisation de duplicas et de dilutions, seront un frein certain à la mise en place de cette démarche. Le président de l'ADLF rappelle que les coûts déterminés il y a peu, variaient selon les lactariums, de 2 à 140 euros par tests. Les 2 représentants des laboratoires travaillant pour des lactariums font valoir que cette démarche est réalisable car déjà en place dans leur laboratoire en lien pour l'un, avec un lactarium à usage intérieur et l'autre, un lactarium à usage intérieur et extérieur. De plus, que ce soit pour les laboratoires d'hygiène ou les laboratoires de biologie médicale, la certification et l'accréditation rendent obligatoire cette démarche. Tous les membres s'accordent sur le fait que cette démarche devra être mise en place progressivement.

Les membres du CSST se prononcent unanimement lors du vote pour recommander la standardisation sur la base d'une validation des méthodes à partir d'un référentiel commun et l'utilisation de CQI. Dans un second temps, une évaluation externe de la qualité devra être mise en place avec notamment la mise en place de contrôles de comparaison inter-laboratoire.

Dans l'optique de la définition d'un référentiel, Mme Charlier-Bret de l'ANSM signale que la pharmacopée dont s'occupe l'ANSM, est un moyen moins lourd que le système normatif, pour établir et faire valoir au niveau national et international, des référentiels techniques. Ce moyen a été utilisé pour le domaine assez proche des tissus et cellules (contrôle microbiologique des greffons cornéens).

2. Évaluation de la détectabilité dans l'analyse de risque de contamination microbiologique du lait maternel issu des lactariums

2.1. Evaluation des échelles de détectabilité

Évaluation des échelles de notation :

- 1** : Détection et quantification dans le lait maternel,
- 3** : Détection, malgré une quantification non validée (absence de CQI par exemple),
- 10** : Détection du danger incomplète (absence de moyen pour prendre en compte les spores ou les toxines par exemple),
- 50** : Absence de contrôle (contrôle trop complexe ou trop onéreux).

2.2. Détection des bactéries déterminées comme étant à risque par l'analyse de risque

Pour *Bacillus cereus* (Bc), la gélose au sang permet de mettre en évidence les formes végétatives mais ne permet pas de récupérer les spores. Dans les laboratoires collaborant avec le lactarium d'Île-de-France et de Normandie, des techniques d'amplification des acides nucléiques des Bc ont été mises en place, mais qui ne permettent pas d'apporter une démonstration formelle que toutes les spores ont bien été revivifiées. Il existe des milieux spécifiques pour revivifier les spores.

L'intérêt de revivifier les spores est questionné. En effet, les doses infectieuses de Bc chez le nourrisson ne sont pas connues. Le seul élément établi est que, jusqu'à preuve du contraire, les normes actuelles qui *de facto*, ne prennent en compte que les formes végétatives, sont protectrices. De plus, la tolérance des nourrissons semblerait être bonne puisque le lait cru doit contenir de plus larges quantités de Bc. Ce constat doit être modulé puisque la comparaison entre les 2 produits est difficile à faire, puisque le lait cru dispose de plus de moyens de lutte contre les infections et d'un microbiote différent.

En l'état et en routine, aucun argument ne peut être produit pour faire évoluer les seuils de non-conformité post-pasteurisation. Lors d'incident, il est indiqué qu'un phénotypage n'est pas suffisant pour distinguer 2 souches ou pour établir une identité formelle. Seul le génotypage apporte un degré de garantie suffisant pour comparer 2 souches.

Une étude serait néanmoins intéressante pour caractériser les niveaux de dangerosité de différents échantillons de lait maternel et d'étudier les liens avec les méthodes de contrôle utilisées. M. Firmesse de l'ANSES propose, dans le cadre d'étude complémentaire à celle existante de mesure de polluants chimiques dans le lait, d'établir un protocole d'étude des Bc dans le lait.

Avis du CSST

3. Les entérovirus, parechovirus et flavivirus au regard du lait maternel

3.1 et 3.2 Exposé du Professeur Bruno Lina et discussions

Supports : Exposé téléphonique du Professeur Bruno LINA

Principaux points

- Des contaminations par les entérovirus de sérotype 11 et 18 et des coxsackie virus de type B sont rarement reportées chez les nourrissons.
- La contamination par le lait de la mère est sujette à caution car les contacts avec la mère sont des vecteurs également possibles.
- La transmission orale est faible ou inexistante puisqu'il n'a pas été rapporté d'observation d'infections périodiques en été comme pour les autres modes de transmission.
- Certains articles mettent au contraire en exergue, le rôle protecteur du lait maternel qui possède des anticorps maternels contre ces virus et sans doute d'autres éléments du système immunitaire qui ne sont pas identifiés. Si la pasteurisation n'est pas suffisante pour détruire le virus, il doit néanmoins en diminuer la charge virale.
- En cas de contamination par un de ces virus, il est recommandé d'envoyer des échantillons au CNR qui peut séquencer et donner sous 8 à 10 jours des résultats qui permettront de mieux connaître le domaine.
- Pour les parechovirus, aucune donnée concernant une transmission par le lait maternel n'est disponible et les effets semblent anodins.
- Pour les flavivirus, les données sont contradictoires comme pour les entérovirus : le lait est vecteur d'infection ou le lait est protecteur. La transmission sexuelle de ce type de virus est démontrée pas la transmission orale.

- Pour évaluer les effets de la pasteurisation il faudrait faire des tests de survie de virus sur culture cellulaire, après pasteurisation. Ceci nécessite d'abord de déterminer l'effet de la matrice lait maternel qui n'a pas encore été déterminée.

4. Évaluation des modalités réglementaires des contrôles existants et propositions d'évolution

4.1. Seuil du contrôle post-pasteurisation

Règle actuelle : le lait est détruit quand une colonie pousse sur gélose au sang à partir d'un échantillon de 0,5 ml de lait après pasteurisation soit un seuil de 2 UFC/ml.

Arguments présentés

- Du lait est jeté avec 1 ou quelques colonies sans que la contamination initiale du lait puisse être garantie par rapport à une contamination lors du dosage, provenant de l'environnement du laboratoire.
- Un nombre de colonies de 1 à 5 est inférieur à la limite de quantification et rentre généralement dans les incertitudes de mesure.
- D'un point de vue technique, un ensemenceur standardise et diminue les erreurs de manipulation manuelle, mais ne peut être utilisé qu'avec des volumes maximums de 200 microlitres. Le seuil de détection est donc au maximum de 5 UFC/ml. Ce moyen est utilisé dans quelques lactariums depuis des années sans constat d'une augmentation du nombre d'infections des nourissons. Le maintien du seuil à 2 UFC/ml bloquerait cette amélioration technique.
- Les règles définies dans les guides utilisées au Royaume-Uni ou en Italie admettent un seuil à 10 UFC/ml sans avoir constaté d'infection non expliquée par le lait maternel.

Les membres du CSST votent à l'unanimité le passage à un seuil à 10 UFC/ml, sous condition que la méthode analytique soit validée et standardisée, et que soit utilisé, dans un premier temps des CQI pertinents.

Il est précisé que le terme de validation qui sera bien explicité dans un référentiel est réalisé par rapport aux méthodes employant les milieux décrits dans la réglementation. Ces techniques de référence évolueront avec l'état de l'art.

4.2. Seuils des contrôles pré-pasteurisation

4.2.1. Staphylocoques coagulase positive

Règle actuelle : le seuil de conformité est fixé à 10^4 UFC/ml de staphylocoques coagulase positive, sur milieu Chapman

Arguments présentés

- Avec l'utilisation dans la très grande majorité des laboratoires d'analyse, de la spectrométrie de masse pour l'identification des bactéries, l'identification biochimique des colonies poussant et caractéristiques des staphylocoques coagulase +, sur les milieux Chapman n'est plus réalisée. Seuls les germes identifiés comme *Staphylococcus aureus* (SA) sont comptabilisés.
- Chez l'homme comme dans les analyses alimentaires, parmi les staphylocoques coagulase positive, seul le SA qui est pathogène et peut produire des toxines thermorésistantes, est recherché.

- Aucun argument ne peut être produit pour modifier le seuil, qui prend en compte la concentration de 10^5 UFC/ml, limite à partir de laquelle les SA commencent à produire des toxines de façon significative. À l'heure actuelle, rien ne permet de baisser la marge de sécurité prise par rapport aux taux de production de la toxine.
- La recherche de ces toxines, par des tests biologiques et/ou des gènes codant ces protéines par des tests de PCR, est très coûteuse et ne permet pas de garantir que de nouvelles toxines, non encore découvertes, ne devraient pas être prises en considération (des nouvelles toxines sont encore identifiées périodiquement).

Les membres du CSST votent à l'unanimité pour ne rechercher que le *Staphylococcus aureus* et ne pas changer les seuils de conformité en pré-pasteurisation.

4.2.2 Flore totale

Règle actuelle : le seuil de conformité est fixé à 10^5 UFC/ml selon que l'on travaille en lots et 10^6 UFC/ml pour une organisation comprenant des sous-lots, obtenus par numération sur gélose au sang

Arguments présentés

Ces normes étant du même ordre de grandeur que ceux utilisés par les pays qui font des tests pré-pasteurisation et n'ayant pas, jusqu'à preuve du contraire, été mises en défaut, ces seuils sont conservés en l'état

NB : Le futur guide des bonnes pratiques prévoit d'uniformiser le seuil de non-conformité en flore totale pour les lots et les sous-lots.

4.3 Milieux des contrôles pré-pasteurisation

A l'heure actuelle, la gélose au sang ne présente pas de défaut identifié. Seule la détection des *Streptocoques B* dans la flore totale n'est pas techniquement aisée.

Les évolutions durant les dernières années suivant l'élaboration du dernier guide des bonnes pratiques des lactariums concernent principalement l'ensemencement ou la lecture sur des milieuxensemencés par des systèmes automatisés ou encore l'identification par spectrométrie de masse par la méthode Maldi-tof. Avec les mesures proposées, la réglementation ne devrait pas freiner les évolutions.

Aucun moyen permettant de gagner du temps et des ressources en détectant de manière plus rapide des laits contaminés et à faible coût (tel que l'ATPmétrie par exemple) n'a encore été identifié. Les techniques d'identification et de quantification de biologie moléculaire (qPCR par exemple) sont encore trop coûteuses pour être utilisées en routine pour les lactariums. En cas de crise, il peut être fait appel au CNR qui maîtrise ces techniques.

La validation et la standardisation des méthodes analytiques sont des éléments majeurs qui devraient permettre rapidement et de façon établie, de pouvoir tester et, le cas échéant, mettre en production toute innovation technique ou scientifique.

D'un point de vue méthodologique, les tests statistiques et en particulier des cartes de contrôles, devront être développés comme moyens de surveillance des procédés mais également pour identifier de façon précoce les événements indésirables graves.

Les membres du CST sont tous d'accord sur le fait qu'à l'heure actuelle une approche statistique ne peut être mise en œuvre. Dans ce contexte, aucun argument ne peut être produit pour abandonner la réalisation systématique des contrôles.

5. Conclusions du CSST : rappel des principales décisions de la réunion

Questions posées : La standardisation des techniques d'analyse microbiologie doit-elle être mise en place. Cette démarche doit-elle nécessiter l'utilisation de contrôles qualité internes et dans un second temps, de contrôles de qualité externes ?

Votes	
Nombre de votants	8
Nombre d'avis favorables	8
Nombre d'avis défavorables	0
Nombre d'abstention	0

Explication des votes	
Avis majoritaires	8
Avis minoritaires	0

Conclusions

Le comité recommande de standardiser les techniques dans le double objectif de sécuriser le produit et de limiter les pertes de lait maternel. La validation des méthodes et l'emploi de contrôles qualité internes puis externes sont des étapes indispensables pour la standardisation des techniques.

Question posée : Le seuil de conformité en post pasteurisation doit-il passer de 2UFC/ml à 10 UFC/ml sous condition d'utiliser une méthode validée ?

Votes	
Nombre de votants	8
Nombre d'avis favorables	8
Nombre d'avis défavorables	0
Nombre d'abstention	0

Explication des votes	
Avis majoritaires	8
Avis minoritaires	0

Conclusions

Le comité recommande de modifier le seuil de conformité en post-pasteurisation à 10 UFC/ml sous condition d'une maîtrise garantie de la méthode employée au laboratoire par sa validation.

Question posée : La recherche de *Staphylococcus aureus* doit-elle être requise à la place de la recherche de staphylocoque coagulase positive ?

Votes	
Nombre de votants	8
Nombre d'avis favorables	8
Nombre d'avis défavorables	0
Nombre d'abstention	0

Explication des votes	
Avis majoritaires	8
Avis minoritaires	0

Conclusions

Le comité recommande que le *Staphylococcus aureus* soit le germe spécifiquement recherché en pré-pasteurisation

Question posée : Le seuil de conformité en pré-pasteurisation du staphylococcus aureus doit-il être le même que celui attribué jusqu'à présent à la recherche de staphylocoque coagulase positive ?

Votes	
Nombre de votants	8
Nombre d'avis favorables	8
Nombre d'avis défavorables	0
Nombre d'abstention	0

Explication des votes	
Avis majoritaires	8
Avis minoritaires	0

Conclusions

Le comité recommande de garder le même seuil à 10^4 UFC/ml pour le *Staphylococcus aureus*.

Question posée : Le seuil de conformité en post pasteurisation de la recherche de la flore totale doit-il être maintenu au seuil de 10^6 UFC/ml ?

Votes	
Nombre de votants	8
Nombre d'avis favorables	8
Nombre d'avis défavorables	0
Nombre d'abstention	0

Explication des votes	
Avis majoritaires	8
Avis minoritaires	0

Conclusions

Le comité recommande de ne pas modifier le seuil de conformité de la flore totale.

Question posée : Une méthode de maîtrise statistique des procédés doit-elle être introduite pour ne plus réaliser systématiquement les contrôles sur tous les lots ?

Votes	
Nombre de votants	8
Nombre d'avis favorables	0
Nombre d'avis défavorables	8
Nombre d'abstention	0

Explication des votes	
Avis majoritaires	8
Avis minoritaires	0

Conclusions

Le comité estime qu'à l'heure actuelle une approche statistique ne peut être mise en œuvre. Dans ce contexte, aucun argument ne peut être produit pour abandonner la réalisation systématique des contrôles.