

Avis du Comité Spécialisé Temporaire du 27/10/2021 relatif aux contrôles microbiologiques du lait maternel issu des lactariums

I. Contexte

Les référentiels internationaux encadrant l'activité des lactariums montrent une très grande hétérogénéité dans les modalités de sécurisation du risque microbiologique affectant le lait maternel issu des lactariums. Les différences sont observées tant du point de vue des micro-organismes recherchés dans le lait, que sur les modalités de contrôle. Par exemple, les tests avant pasteurisation du lait peuvent ne pas être réalisés, ou être réalisés ponctuellement ou encore, systématiquement sur tous les lots.

Les bonnes pratiques élaborées au Royaume-Uni ont initié une approche basée sur des faits scientifiques (*evidence-based*), les exigences d'autres bonnes pratiques dont les françaises, sont principalement basées sur des données empiriques et historiques. Pour répondre aux exigences de sécurité des produits tout en préservant leur disponibilité et donc en évitant des rejets injustifiés, la démarche suivie par ce comité, est d'interroger les règles instituées qui ont démontré une certaine efficacité d'une part, en réalisant une revue des différentes règles et, d'autre part en intégrant les nouvelles données scientifiques, techniques ou cliniques.

II. Déroulement du Comité

Le comité est composé de 10 membres.

Mme Camille BREHIN	Pédiatre, maîtresse de conférence des universités – Praticienne hospitalière au CHU de Toulouse
M. Crespin C. ADJIDÉ	Pharmacien hygiéniste responsable du Laboratoire Hygiène Risque Biologique & Environnement au CHU Amiens-Picardie
Mme Florence DOUCET-POPULAIRE	Professeur, cheffe du service de bactériologie Hygiène au centre hospitalier Antoine Béchère de l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris
M. Olivier FIRMESSE	Chargé de projet de recherche, chef adjoint de l'unité <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> et <i>Clostridium</i> du laboratoire de sécurité des aliments de l'ANSES
Mme Céline FISCHER FUMAUX	Pédiatre, <i>Privat Docent</i> – maître d'enseignement et de recherche, médecin adjointe au service de néonatalogie de l'hôpital universitaire de Lausanne
Mme Nabila HADDAD	Maitresse de conférence au département biologie, pathologie et sciences de l'aliment à l'école nationale vétérinaire, agroalimentaire et de l'alimentation de Nantes (ONIRIS)
Mme Yasmine LAKHDARI	Pédiatre et médecin responsable du lactarium du centre hospitalier sud Francilien, Corbeil-Essonnes
M. Didier LECOINTE	Pharmacien hygiéniste, chef du Service d'Hygiène, Prévention et Contrôle des Infections (Laboratoire d'Hygiène Hospitalière et Equipe Opérationnelle d'Hygiène) du centre hospitalier sud Francilien, Corbeil-Essonnes
M. Jean-Charles PICAUD	Professeur, chef du service de néonatalogie et de réanimation néonatale, lactarium régional Auvergne-Rhône-Alpes, Hôpital de la Croix-Rousse des hospices civils de Lyon
Mme Virginie RIGOURD	Médecin responsable du lactarium d'Île-de-France de l'hôpital Necker de l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris

Séances du comité :

- Séance n°1 : 11 juin 2019
Séance n°2 : 9 septembre 2019
Séance n°3 : 7 octobre 2019
Séance n°4 : 27 janvier 2020
Séance n°5 : 12 novembre 2020

III. Modalités actuelles de gestion du risque microbiologique associé au lait maternel issu des lactariums en France

Le premier travail du comité a été de réaliser un état des lieux relatif à l'ensemble des modalités déployées dans tous les processus des lactariums, en considérant également ceux présents en amont lors de la prise en charge de la grossesse. Actuellement en France, le principe de gestion du risque microbiologique associé au lait maternel issu des lactariums, est organisé au niveau réglementaire par le contrôle des éléments suivants.

1/ Le suivi médical de la donneuse

Préalablement au don de lait maternel, le dossier médical de la future donneuse est évalué par un médecin ou une sage-femme, afin de détecter les facteurs de risques pouvant nuire *in fine* au nourrisson.

Ce dossier est composé de plusieurs éléments :

- des examens sérologiques de prévention durant et après la grossesse (*Art L.2122-1 et R.2122-1 et R.2122-2 du code de la santé publique*).

Durant la grossesse, la mère doit réaliser, lors de la 1^{ère} consultation prénatale, le dépistage de la syphilis, de la rubéole et de la toxoplasmose, puis de l'Ag HBs au 6^{ème} mois de grossesse. Ces tests sont obligatoires. Le dépistage du VIH est proposé systématiquement, s'il n'a pu être fait au préalable. Pour le père, il est recommandé de lui proposer systématiquement un sérodepistage du VIH ;

- un entretien d'information et un entretien médical (*Décision du 3 décembre 2007 définissant les règles de bonnes pratiques prévues à l'alinéa 3 de l'article L.2323-1 du CSP*).

Sous la responsabilité du médecin responsable du lactarium, l'entretien d'information avec la donneuse vise à la sensibiliser au don et à l'informer sur les risques potentiels de maladies transmissibles par le lait, sur l'importance des risques liés à la prise de médicaments, à la prise de stupéfiants ou de produits toxiques et sur les mesures d'hygiène à respecter lors de l'expression du lait. Lors de cet entretien, les dispositions réglementaires quant aux dépistages obligatoires sont également décrites. Cet entretien médical permet de revoir l'ensemble des données recueillies visant à détecter les risques potentiels de transmission, d'agents pathogènes au receveur, par du lait maternel issu des lactariums ;

- des tests sérologiques de qualification de la donneuse (*Arrêté du 25 août 2010 relatif aux tests de dépistages réalisés pour les dons de lait maternel et à leurs conditions de réalisation*).

Cet arrêté décrit les tests à réaliser, selon le type de don de lait envisagé, incluant la détection de marqueurs d'infection par les virus VIH 1 et 2, HBV, HCV et HTLV I et II.

2/ La maîtrise de la charge microbiologique du lait maternel

Selon le référentiel de bonnes pratiques applicable aux lactariums (*Décision du 3 décembre 2007 définissant les règles de bonnes pratiques prévues à l'alinéa 3 de l'article L.2323-1 du CSP*), la charge microbiologique du lait est limitée par plusieurs facteurs de maîtrise :

- les préconisations d'hygiène expliquées à la donneuse pour l'expression du lait, pour l'entretien du matériel utilisé pour le recueil du lait, les conditions de conservation à domicile ainsi que pour les conditions de transport ;
- les procédures de transport pour les services logistiques hospitaliers ou les prestataires externes,
- les procédures d'hygiène appliquées par le personnel du lactarium ainsi que l'entretien et la qualification des locaux et des matériels ;
- les conditions de conservation du lait (cru ou pasteurisé) entre 0°C et 4°C pendant moins de 48h, et une congélation du lait à une température inférieure à -18°C ;
- la pasteurisation en lots, avec un cycle de pasteurisation à 62,5°C pendant 30 min.

3/ La recherche ciblée des contaminants du lait maternel

Selon le référentiel de bonnes pratiques applicable aux lactariums (*Décision du 3 décembre 2007 définissant les règles de bonnes pratiques prévues à l'alinéa 3 de l'article L.2323-1 du CSP*), la recherche des agents pathogènes dans le lait maternel est réalisée sur :

- des échantillons dilués au préalable en fonction de la méthode analytique, avant la pasteurisation (échantillon pré-pasteurisation), en réalisant :
 - une culture et une quantification de la flore totale bactérienne aérobie sur une gélose au sang, après 48 heures d'incubation à 37°C ;
 - une recherche et une numération des germes staphylocoques à coagulase positive sur une gélose de Chapman après 48 heures d'incubation à 37°C ;
- et des échantillons non dilués ayant subi une pasteurisation (échantillon post-pasteurisation), en réalisant :
 - un ensemencement de 0,5 mL de lait non dilué sur une gélose au sang et une incubation pendant 48 heures à 37°C. Tout lot dont le contrôle après pasteurisation est positif est détruit.

IV. Evaluation des modalités actuelles

Dans le contexte actuel de la révision du référentiel des bonnes pratiques applicables aux lactariums et du projet de texte introduisant le système de management de la qualité et du risque, les surveillances microbiologiques des locaux et de l'eau utilisée dans les processus critiques, ainsi que le renforcement des qualifications des équipements et des méthodes utilisées, il apparaît nécessaire de réévaluer les catégories de micro-organismes pathogènes ou susceptibles de le devenir, pour les receveurs concernés par une prescription de lait maternel pasteurisé. En parallèle, les méthodes et les modalités de recherche de ces agents pathogènes paraissent devoir être actualisées.

En effet, la question centrale qui s'est posée lors d'épisodes critiques de contamination bactérienne de prématurés impliquant, sans les incriminer, les lactariums de Marmande, de Caen ou encore d'Île-de-France, était de déterminer si le principe actuel des tests bactériologiques réalisés sur les laits tels qu'ils sont définis dans l'actuel référentiel de bonnes pratiques, était pertinent.

V. Propositions du CST relatif aux contrôles microbiologiques du lait maternel issu des lactariums

Lors de la première séance, les modalités de fonctionnement d'un CST, ainsi qu'un état des lieux de l'organisation, du fonctionnement des lactariums en France et des règles internationales de contrôle microbiologique du lait maternel ont été présentés aux membres du CST (Cf. Compte rendu du CST du 11 juin 2019) pour contextualiser les travaux à venir.

L'ensemble des membres du CST a souligné l'importance des travaux qui vont être réalisés et demande la publication de leur avis pour que les lactariums et leur laboratoire partenaire puissent se prévaloir auprès de leur établissement des évolutions à planifier et à mettre en place, ainsi qu'une parution en anglais pour contribuer à l'amélioration des pratiques au niveau international.

⇒ **Avis n°1 : le CST demande la traduction des recommandations en anglais pour pouvoir faire valoir ce travail devant les instances européennes ou internationales.**

Sur ce premier point, le Directeur de l'inspection de l'ANSM a informé le CST que son avis sera publié sur le site de l'ANSM en Français et en Anglais.

Pour évaluer la pertinence des mesures actuelles de contrôles microbiologiques du lait maternel issu des lactariums, défini dans le référentiel des bonnes pratiques applicable depuis décembre 2007 et la nécessité d'une éventuelle évolution, l'ANSM a sollicité le CST pour répondre aux 3 questions suivantes :

question n°1 : quelles sont les populations de patients à prendre en compte pour la gestion du risque microbiologique, dans le cadre d'une prescription de lait maternel pasteurisé : grands prématurés, prématurés ou nourrissons ... ?

A : Fondement de la question

Le risque microbiologique lié à la prise de lait maternel ne paraît pas équivalent pour les différentes populations de receveurs (grands prématurés, prématurés, nourrissons). Il est donc nécessaire de commencer par définir les populations à prendre en compte pour l'exposition au risque microbiologique.

Par exemple, la population des grands prématurés est considérée à haut risque infectieux du fait de leur immaturité, tant immunologique que digestive avec une perméabilité intestinale plus élevée. Ces facteurs favorisent la survenue d'infections systémiques dues à des micro-organismes présents au sein de leur microbiote (cutané, digestif, pulmonaire, etc. ...).

En parallèle de la prise en compte d'une ou plusieurs populations, il pourrait ainsi être envisagé de considérer plusieurs catégories de produits. Les produits destinés à des nourrissons présentant un déficit immunitaire important et ceux destinés à des nourrissons ayant une immunité plus efficace, selon des paramètres tels que le terme de l'accouchement ou le poids de naissance.

La caractérisation des différentes populations de nourrissons (nouveau-nés, prématurés, grands prématurés, nourrissons ayant des pathologies prédisposant à des pathologies infectieuses secondaires ...), permet d'évaluer par la suite, les risques infectieux encourus suite à l'ingestion de lait de mère contaminé par certains micro-organismes.

B : Avis et propositions du CST (Cf. compte-rendu du CST du 9 septembre 2019 et celui du 12 novembre 2020)

- Les données scientifiques actuelles ne permettent pas de définir des indicateurs différenciés de maturité ou de susceptibilité des nourrissons exposés aux micro-organismes. Le rôle des différents microbiotes (de la mère, du nourrisson, et de l'entourage) est un élément clé dans l'établissement de ces indicateurs. Les résultats des différentes études ne sont pas encore consolidés pour fournir des indicateurs éprouvés. Les enfants grands prématurés sont à la fois ceux qui sont le plus exposés aux infections et ceux qui bénéficient le plus du lait maternel. Ils sont une indication prioritaire du lait de lactarium (cf. Fiche mémo l'HAS- mai 2021 « Indications prioritaires du lait de lactarium issu de don anonyme »).

⇒ **Avis n°2** : Le CST considère qu'il n'y a pas de catégorisation des populations à prendre en compte.

- Pour diminuer l'impact psychologique du rejet de dons non-conformes de lait maternel pour les donneuses et l'impact sur les lactariums, le CST propose que les dons puissent, après consentement des donneuses, et dans le strict respect des exigences relatives aux recherches réalisées sur des échantillons biologiques humains figurant notamment dans la loi « bioéthique », être valorisés à des fins de recherche.

Bien que non-conformes aux dispositions de la réglementation en vigueur qui prévoit la destruction des laits lorsque les résultats microbiologiques sont non-conformes, ces pratiques sont réalisées. La proposition permettrait de régulariser cette situation et de spécifier son cadre (*Décision du 3 décembre 2007 définissant les règles de bonnes pratiques prévues à l'alinéa 3 de l'article L. 2323-1 du code de la santé publique, VI.2 et VII.2*).

⇒ **Avis n°3** : le CST sollicite la modification des exigences des bonnes pratiques des lactariums pour rendre possible et cadrer l'utilisation des laits qui sont bactériologiquement non-conformes, pour être utilisés dans le cadre de projet de recherche.

- La dispensation aux nourrissons « matures », des produits rejetés pour les prématurés, est un axe de réflexion soulevé par le CST.

Si le bénéfice premier de cette suggestion est de ne pas détruire des produits rejetés pour des critères très exigeants définis pour les grands prématurés présentant une susceptibilité accrue aux infections, deux difficultés importantes ont néanmoins été identifiées :

- cette option demanderait en pratique de définir au lactarium, un circuit pour ce nouveau produit, strictement distinct du circuit du lait déjà existant pour les prématurés, afin d'éviter toute contamination croisée ;
- cette option demanderait en pratique de définir des critères de qualification bactériologique pour ces produits, pour garantir leur sécurité et celle des receveurs.

Quelques membres du comité ont souligné que ces mesures seraient particulièrement pertinentes pour le lait personnalisé (don de la mère pour son enfant) notamment, car il est difficile de justifier le rejet des dons qui contrairement aux dons anonymes (d'une donneuse pour un autre enfant que le sien) ne sont pas en surplus. Les membres du CST ne peuvent pas se prononcer sans avoir une évaluation des bénéfices notamment sur le volume de produits qui pourrait être épargné et des seuils de conformité qui pourraient être établis.

Il est proposé que les lactariums quantifient le bénéfice et notamment déterminent le volume de lait qui pourrait être épargné. De plus, ils devront proposer des seuils de conformité bactériologiques argumentés, les modalités pour identifier les différents micro-organismes et les circuits garantissant la délivrance de ces produits, en toute sécurité, par leur complète séparation du circuit du lait qualifié pour les prématurés.

⇒ **Avis n°4** : pour se prononcer sur une utilisation des laits rejetés, le CST demande aux lactariums de transmettre les informations adéquates permettant d'établir la balance bénéfices/risques relative à l'utilisation de certains dons personnalisés rejetés.

question n°2 : quels micro-organismes sont à prendre en compte dans le risque microbiologique pour chaque population de patients considérée ?

A : Fondement de la question

Le second paramètre à prendre en compte dans cette analyse est l'identification des dangers, c'est-à-dire l'identification des agents pathogènes ou susceptibles de le devenir, qui peuvent être à l'origine d'évènements (ou « d'effets » selon la terminologie employée par la biovigilance) indésirables graves et la quantification du risque associé. Cette approche pourrait être traitée à partir de données cliniques et épidémiologiques.

Pour aborder cette question, il pourrait être proposé de déterminer la criticité (paramètre qui permet de prendre en compte le risque), définie comme le produit de la fréquence et de la gravité d'une exposition. Le troisième paramètre, qui est la détectabilité du micro-organisme, est pris en compte dans la question suivante.

B Avis et proposition du CST (Cf. compte-rendu des séances des 7 octobre 2019 et 12 novembre 2020)

L'analyse des risques est réalisée sur la base d'une bibliographie scientifique et de l'expérience des membres du CST, qui a permis de statuer sur les dangers conduisant à la nécessité de mettre en place une détection systématique requise par la réglementation des agents considérés. Cette démarche ne concerne pas les recherches ponctuelles et adaptées qui doivent être mises en place en cas de signes cliniques ou d'autres informations évoquant une infection par un des agents passés en revue.

Les différents agents pathogènes ont été analysés :

- **champignon : aucun champignon** ou levure ne représente à l'heure actuelle, une menace qui imposerait la mise en place de nouveaux moyens de détection en routine ;

⇒ **Avis n°5 : le CST considère que les champignons et levures dans le lait maternel ne représentent pas un risque significatif.**

- **parasite** : les parasites, de par leur sensibilité à la pasteurisation, ne présentent pas de risque significatif conduisant à une recherche systématique dans le lait maternel.

⇒ **Avis n°6 : le CST considère que les parasites dans le lait maternel pasteurisé ne représentent pas un risque significatif.**

- **virus** : les données scientifiques relatives à la présence de certains **virus** dans le lait et leur pathogénicité sont trop contradictoires concernant notamment les parechovirus, les entérovirus ou les flavivirus, pour permettre de réaliser une analyse de risque. Le comité n'a pas pu statuer mais les membres considèrent que le sujet doit être poursuivi sous une forme adéquate pour préciser les risques.

⇒ **Avis n°7** : les données scientifiques sur les virus ne sont pas assez cohérentes pour statuer sur la pertinence de les ajouter à la liste des micro-organismes recherchés qui figure dans le référentiel de bonnes pratiques. Le sujet mérite la mise en place d'un travail supplémentaire avec des experts du domaine.

- **Maladies émergentes** : l'impact grandissant des virus émergents et de manière plus globale des **maladies émergentes** conduit le CST à souligner l'importance des facteurs pouvant garantir une bonne réactivité. L'organisation des lactariums a jusqu'ici permis l'alerte et une prise de décision rapide et coordonnée en cas de questionnement. Les représentants des lactariums du CST demandent néanmoins d'une part, une réévaluation du questionnaire médical qui n'est plus pertinent à ce jour et qui n'a pas été actualisé après les différentes crises dont celle relative à Ebola en 2019 par exemple et d'autre part, une possibilité de contact avec des experts, comme par exemple avec les Centres Nationaux de Référence, de manière à pouvoir avoir rapidement des résultats de tests cellulaires, qui paraissent les plus informatifs, réalisés avec des échantillons de lait ;

⇒ **Avis n°8** : la réactivité des laboratoires pour mettre en place les mesures adaptées lors de crises sanitaires est une propriété fondamentale. Les moyens permettant aux lactariums (dont le questionnaire médical) et à leur laboratoire partenaire de gérer ces situations pendant et après ces crises devraient être revus.

Les bactéries appartenant aux genres *Clostridium*, *Staphylococcus* et *Bacillus* ont été identifiées par le CST comme représentant un danger avéré pour la population de receveurs concernés. Ces genres comportent des bactéries qui produisent des toxines qui peuvent résister à l'action de la pasteurisation. Certaines de ces bactéries peuvent également se présenter sous forme de spores qui leur confèrent une résistance à la pasteurisation.

- **Les bactéries des genres *Clostridium* et/ou *Clostridioides*** : elles participent à une étape physiologique de la colonisation du tube digestif du nourrisson sans conséquence néfaste. Elles ne sont pas systématiquement recherchées car elles ne font pas partie de la flore totale aérobie. La colonisation du lait maternel par ces bactéries a rarement été observée par les lactariums qui réalisaient cette recherche spécifique dans des conditions anaérobies. Mais lorsqu'elles étaient retrouvées, elles étaient toujours en lien avec une contamination microbiologique globale repérable par les cultures de flore totale aérobie. La rareté des infections dans le domaine alimentaire et l'absence d'observation clinique d'infection induite par du lait maternel, permettent de conclure que le risque représenté par ces genres bactériens n'est pas significatif et conduit le CST à ne pas demander leur recherche systématique.

⇒ **Avis n°9** : le CST n'envisage pas de modification du guide des bonnes pratiques des lactariums concernant la recherche systématique des bactéries appartenant au genre *Clostridium* et/ou *Clostridioides* dans le lait maternel.

- **Les bactéries du genre *Staphylococcus*** : les infections par des bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* ou les toxi-infections liées aux toxines produites par ces germes, constituent des causes majeures de morbidité et de mortalité chez le nourrisson et le prématuré. Ce risque est déjà pris en compte dans la réglementation en vigueur par la recherche systématique en pré-pasteurisation de staphylocoques à coagulase positive. La recherche en pré-pasteurisation est justifiée par la capacité des populations de *Staphylococcus aureus* à pouvoir produire en quantité suffisante, lorsqu'elles atteignent une concentration estimée à 10^5 UFC/mL, une toxine thermorésistante à l'origine de l'infection. Néanmoins, l'absence de tout germe après pasteurisation ne peut pas garantir l'absence de toxine thermorésistante. Le danger principal est représenté par les souches de *Staphylococcus aureus* productrices de toxine. Les laboratoires partenaires des lactariums identifient systématiquement toute espèce de staphylocoque à coagulase positive. Seule cette espèce étant prise en compte, le CST propose de la mentionner spécifiquement.

⇒ **Avis n°10** : dans le guide de bonnes pratiques des lactariums, la mention de la recherche des staphylocoques à coagulase positive en pré-pasteurisation devrait être remplacée par la recherche de *Staphylococcus aureus* en pré-pasteurisation.

- **Les bactéries du genre *Bacillus*** : ce sont les principales bactéries impliquées dans les décès groupés de nourrissons à l'origine de plusieurs crises médiatisées. La présence ubiquitaire de ces bactéries, y compris dans le lait maternel, rend difficile l'identification de la source de contamination. Il faut toutefois noter que jusqu'à présent aucune infection mortelle par une souche de *Bacillus cereus* provenant d'un lait maternel n'a été rapportée dans le monde. Le mode de contamination très nettement majoritaire est la voie aérienne. Les symptômes cliniques observés dans les cas d'infections mortelles ne correspondent pas à des toxi-infections ou à des infections uniquement digestives. Les données relatives à la contamination des laits maternels n'étant pas très informatives, une étude menée dans ce domaine apparaît indispensable pour réaliser une analyse quantitative précise du risque.

Le représentant de l'ANSES (Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) du CST indique tout l'intérêt affirmé par l'ANSES pour réaliser ce projet en coopération avec l'ANSM et les lactariums.

⇒ **Avis n°11** : le CST est favorable à une étude conduite par l'ANSES et les lactariums sur la caractérisation des bactéries appartenant au genre *Bacillus* (et éventuellement d'autres bactéries pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*) présentes dans le lait maternel.

L'examen des guides de bonnes pratiques internationaux a été réalisé pour compléter les analyses réalisées par le CST.

- Le guide de bonnes pratiques britannique requiert la recherche spécifique des entérobactéries en pré-pasteurisation. Le CST a étudié les risques présentés par ces bactéries en général et particulièrement par certains genres. La sensibilité à la pasteurisation de ces bactéries et leur détection dans la flore totale sont les principaux arguments qui ont été retenus pour ne pas mettre en place de recherche supplémentaire.

⇒ **Avis n°12** : Aucune modification du guide des bonnes pratiques des lactariums concernant la recherche systématique des entérobactéries dans le lait maternel n'est demandée.

- Devant la recrudescence des infections sexuellement transmissibles, le CST s'est posé la question d'une recherche systématique des bactéries impliquées dans ces pathologies. La sensibilité de ces germes à la pasteurisation, l'absence d'observation clinique d'infection des nourrissons et la surveillance attentive des mères, conduisent le CST à considérer qu'il n'y a pas de risque. Aussi, la recherche de la syphilis qui est réalisée dans les lactariums d'Amérique du Nord, n'est pas retenue.

⇒ **Avis n°13 : le CST n'envisage pas de modification du guide des bonnes pratiques des lactariums concernant la recherche systématique de bactéries à l'origine d'infections sexuellement transmissibles.**

question n°3 : quels moyens sont à mettre en place pour gérer les risques microbiologiques identifiés de façon efficace, pour chacun des contaminants retenus et avec quelles modalités opérationnelles ?

A : Fondement de la question

Les principes actuels de gestion du risque microbiologique, pour le lait maternel issu des lactariums sont basés sur :

- le caractère systématique qui relève de la qualification des dons et de la donneuse ;
- le caractère statistique qui relève de la maîtrise des processus par le contrôle de la qualité ;
- le caractère réactif qui relève de la mise en place d'un système de prise en compte des signaux (événement grave ponctuel, alerte, ...).

Du fait de l'amélioration des connaissances et des moyens d'analyse, il apparaît nécessaire de s'interroger pour chacun des micro-organismes retenus, sur les moyens à mettre en œuvre, en fonction du niveau de risque considéré, de la fiabilité des moyens (spécificité, sensibilité, robustesse, ...), de leur coût, de leur facilité de déploiement, mais également sur les modalités de réalisation (systématique, statistique, réactive ...).

Une fois les moyens définis, les modalités de prise de décision, comme les critères d'élimination du lait, ou de réalisation de tests complémentaires, ou de suivi, ou encore, des seuils d'acceptabilité, dans le cas de tests analytiques, pourraient être définis.

B : Avis et proposition du CST (Cf. compte-rendu des séances des 27 janvier 2020 et 12 novembre 2020)

Dans cette séance de CST les membres du comité proposent les principes directeurs suivants :

- la technique des contrôles devrait être standardisée pour d'une part, garantir la qualité des tests réalisés et d'autre part, garantir une qualité équivalente quel que soit le contexte de l'établissement dans lequel se trouve le lactarium et le laboratoire qui lui est associé (organisation, localisation ...) ;
- le cadre des contrôles devrait être établi mais sans être trop rigide pour ne pas s'opposer à une adaptation indispensable aux progrès scientifiques, techniques ou aux particularités locales ou temporaires tout en conservant, et si possible en améliorant, la confiance que l'on peut accorder aux résultats obtenus ;

- le choix des techniques et les moyens mis en place pour assurer la qualité des contrôles devraient être sous la responsabilité du responsable du laboratoire dans lequel est réalisée l'analyse ou avec lequel le lactarium travaille. Une interaction constante et efficace entre ce dernier et le médecin responsable du lactarium est indispensable pour assurer la qualité et la pertinence des analyses et permettre la réactivité indispensable en cas d'alerte sanitaire.

Les moyens devant être revus ou mis en place ont été examinés selon trois axes :

1. l'organisation qualité des techniques qui devrait être améliorée pour avoir des informations sur le niveau de qualité (et ainsi pouvoir donner confiance dans les résultats) ;
2. les modalités précises des techniques proprement dites ;
3. les moyens pour suivre les évolutions proposées.

1. Pour l'organisation qualité des analyses, le CST retient que la première étape indispensable et préalable à d'autres évolutions est la validation des méthodes de contrôles utilisées pour qualifier le lait.

⇒ **Avis n°14** : le CST recommande de standardiser les techniques analytiques 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 de qualité internes obligatoires puis externes, dès lors que ceci est possible, sont des étapes indispensables pour la standardisation des techniques.

⇒ **Avis n°15** : des précisions concernant les attendus en matière de validation des méthodes (décrites ci-dessous), sont établies pour qu'il y ait un socle commun permettant une homogénéisation des pratiques.

- C'est le travail méthodologique qui devrait être rendu obligatoire et non une accréditation des techniques ou la certification de l'organisation mise en place pour valider les techniques. La mise en place de cette méthodologie devrait se faire en s'appuyant sur des normes qui restent au choix du biologiste ou du praticien hygiéniste responsable des tests réalisés sur le lait maternel. Les référentiels les plus souvent cités qui pourront servir de guide méthodologique sont la norme NF EN ISO/IEC 17025 qui spécifie les « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » et la norme ISO 15189 qui spécifie les « Exigences concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale ». Ces 2 normes qui ne sont pas exclusives, sont déjà mises en œuvre pour d'autres analyses dans les laboratoires d'hygiène hospitalière et les laboratoires de biologie médicale qui assurent l'analyse du lait maternel en France.
- De l'avis du CST, la validation des techniques devrait obligatoirement inclure les étapes pré-analytiques et, pour le cas spécifique du lait maternel, plus particulièrement le mode opératoire de prises d'échantillons du lait à analyser, pour garantir que ceux-ci soient représentatifs du lot de lait.
- Pour préciser les exigences actuelles des bonnes pratiques, il est énoncé que la numération consiste en un dénombrement des colonies de bactéries aérobies et dans le cadre de recherche de bactéries spécifiquement recherchées comme *Staphylococcus aureus*, en leur identification et leur dénombrement. Dans ce cadre, il apparaît que seules les techniques utilisant plusieurs dilutions et plusieurs essais, permettent de garantir la validation et la bonne réalisation des techniques ainsi que la validité des résultats des dénombrements rendus par le laboratoire.

- La nature quantitative du contrôle impose de valider, et de travailler avec, des contrôles de qualité internes quantitatifs dont le dénombrement est certifié (appelés aussi matériaux de référence certifiés) ou qualifié (matériaux de référence stabilisés au niveau concentration garanti). Dans un premier temps, le biologiste ou le praticien hygiéniste aurait le choix des contrôles à mettre en place dans l'attente d'un consensus permettant d'établir des spécifications pour ces contrôles.
- Dans un second temps, un système d'évaluation externe de la qualité devrait être mis en place pour garantir l'homogénéité inter-laboratoires et le niveau de qualité acceptable des techniques.
- Le phasage des différentes étapes ne serait défini qu'à l'issue d'une phase de présentation des nouvelles exigences des bonnes pratiques aux biologistes et aux praticiens hygiénistes responsables des laboratoires partenaires des lactariums qui permettrait une mise en place progressive et adaptée du projet.

2. Pour l'évaluation des modalités de réalisation des analyses, l'ensemble des paramètres techniques relatifs aux contrôles bactériologiques ont été revus :

- **la fréquence des contrôles** : Les contrôles sont réalisés systématiquement sur chaque lot en France mais ils peuvent être réalisés dans les autres pays, selon une fréquence établie, et non selon un plan d'échantillonnage déterminé sur la base de données statistiques qui assureraient leur pertinence et leur efficacité. Cependant, aucun argument ne peut être présenté pour justifier la mise en place d'un échantillonnage statistique pertinent.

⇒ **Avis n°16** : à l'heure actuelle, aucun argument n'est donné pour mettre en œuvre une approche statistique. La réalisation des contrôles systématiques est maintenue.

- les conditions de mise en culture et de culture (les milieux, les méthodes d'ensemencement ainsi que les paramètres de culture : durée et températures d'incubation ...) utilisées pour réaliser tous les contrôles, sont validées lors de la validation des méthodes choisies par le biologiste ou le praticien hygiéniste responsable du laboratoire partenaire du lactarium. Le CST considère que les conditions de référence de mise en culture et de culture utilisées pour valider les dénombrements devraient être les conditions imposées jusqu'ici par la réglementation. Ceci permettrait de conserver un point de comparaison avec les résultats antérieurs et un lien entre les validations réalisées dans les différents laboratoires). Pour rappel, ces conditions opératoires sont actuellement :
 - L'incubation 48h à 37°C après ensemencement sur une gélose au sang pour le dénombrement de la flore totale revivifiable pour les contrôles pré et post pasteurisation ;
 - L'incubation 48h à 37°C après ensemencement sur une gélose Chapman pour l'identification et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

⇒ **Avis n°17** : le CST recommande que :

- les milieux de culture utilisés pour réaliser les contrôles microbiologiques des échantillons de lots de lait avant et après pasteurisation soient choisis et validés par le responsable du laboratoire d'analyse partenaire du lactarium ;
 - les milieux de référence pour une validation restent la gélose au sang et la gélose Chapman imposées jusqu'à présent par la réglementation.
-

- Concernant les contrôles en flore totale des échantillons après pasteurisation, des difficultés sont identifiées actuellement pour le seuil de conformité à 2 UFC/mL car le volume d'ensemencement de 500 µL n'est pas utilisé dans tous les laboratoires et ne convient pas à des ensemenceurs automatiques. Par ailleurs, d'un point de vue technique, un nombre bas de colonies (1 à 3 UFC ou plus selon les techniques) n'est pas significatif et ne permet pas de rendre un résultat de dénombrement fiable. La fiabilité du dénombrement devient plus élevée à partir de la valeur de 10 UFC. Les incertitudes de mesure obtenues avec un seul essai ne permettent pas d'exclure un artéfact ou une contamination lors du prélèvement ou de l'ensemencement.

Un seuil de 10 UFC/mL est proposé par le CST. Ce nombre constitue le seuil de conformité institué par le guide des bonnes pratiques britanniques. Il est par ailleurs déjà appliqué sur le lactarium d'Île-de-France, sans que cela ait provoqué d'accidents ou diminué significativement le niveau de rejets. Ce seuil devrait se situer au-dessus du seuil de détection et si possible de numération.

Avec la mise en place d'une procédure de validation intégrant la validation des phases pré-analytiques et, en lien avec cette validation, de l'utilisation en routine de contrôles de qualité internes quantitatifs, le gain de précision de la méthode de dénombrement devrait compenser l'augmentation du seuil de conformité.

⇒ **Avis n°18** : le seuil de conformité du contrôle microbiologique des échantillons de lot après pasteurisation devrait être fixé à 10 UFC/mL sous la condition que la méthode analytique soit validée et standardisée, et que soient utilisés, des contrôles de qualité internes quantitatifs pertinents.

- Le choix de l'étape à laquelle est réalisé le prélèvement post-pasteurisation, c'est-à-dire après refroidissement du lait ou après l'étape de congélation, est sous la co-responsabilité du médecin responsable du lactarium et du responsable du laboratoire d'analyse. Ce choix impactera le suivi et la qualification des différents matériels qui interviennent dans ces processus. Les conséquences et les risques associés devront être pris en compte dans la validation pré-analytique de la technique.

⇒ **Avis n°19** : le choix de l'étape de prélèvement post-pasteurisation est un élément établi et pris en compte dans la validation pré-analytique de la méthode de contrôle.

- Pour les contrôles pré-pasteurisation, aucun élément ne permet de faire évoluer les seuils établis :
 - ✓ compte-tenu de la précision moyenne des techniques utilisées, ces seuils sont en cohérence avec les seuils définis dans les autres pays,
 - ✓ aucune donnée scientifique ne montre que les seuils fixés seraient inadaptés tant par excès, que par défaut. Le seuil de 10⁴ UFC/mL pour *Staphylococcus aureus* correspond à la concentration moyenne de 10⁵ UFC/mL qui correspond au seuil moyen pour avoir une production de toxines suffisante pour provoquer une intoxication, auquel une marge de sécurité de 10 a été appliquée pour prendre en compte une variabilité potentielle des techniques ou également une capacité accrue de production de toxines par certaines souches.

⇒ **Avis n°20** : le CST considère qu'il n'est pas utile de modifier le guide des bonnes pratiques des lactariums concernant les seuils de contrôle pré-pasteurisation.

3. Pour le suivi des changements mis en œuvre : les membres du CST ayant apprécié d'échanger entre personnes d'horizons différents mais complémentaires, souhaitent poursuivre leur travail commun, et suivre et accompagner leurs effets. Les personnes qui ont réalisé des analyses quantitatives des risques, indiquent que le travail réalisé par ce CST devrait être poursuivi dans ce sens en incorporant plus de données épidémiologiques par exemple.

⇒ **Avis n°21** : le CST demande la mise en place une structure (à définir) pour poursuivre les travaux du CST, suivre et accompagner leurs effets.

V. Conclusions

Le CST a répondu aux trois questions qui avaient pour objet d'actualiser les mesures prises dans les bonnes pratiques des lactariums pour gérer le risque microbiologique associé au lait maternel traité par ceux-ci. Les recommandations portent essentiellement sur une progression de l'organisation qualité des contrôles qui suit de manière adaptée l'évolution plus générale des laboratoires d'analyse d'hygiène hospitalière ou de biologie médicale.

Pour ce travail et en réponse à la **question n°1 posée aux membres du CST** relative à la caractérisation des nourrissons recevant le lait maternel des lactariums, le CST a considéré les nourrissons comme une population unique caractérisée par des capacités immunitaires amoindries par rapport aux adultes (avis n°2).

Le CST a produit des recommandations visant de manière générale à :

1. la publication de ce document en anglais pour valoriser ce travail dans les instances européennes et internationales (avis n°1) ;
2. promouvoir une étude de l'utilisation d'une partie des laits non conformes détruits jusqu'à présent, pour d'autres populations d'enfants moins fragiles (avis n°3 et 4) ;
3. revoir les moyens de gestion de crise sanitaire, et notamment bénéficier de toutes les mesures mises en place dans d'autres domaines (avis n°8).

En **réponse à la question n°2** relative aux micro-organismes à rechercher dans le lait, le CST a produit les recommandations suivantes :

1. selon l'analyse des données disponibles, les champignons et levures (avis n°5), ou les parasites (avis n°6), ne présentent pas de risque significatif dans ce domaine ;
2. la question du risque viral devrait être approfondie : les données de la littérature sont divergentes et de nouvelles compétences d'expert sont nécessaires pour analyser la situation (avis n°7) ;
3. la recherche des bactéries du genre *Clostridium* et/ou *Clostridioides* n'apparaît pas fondée à partir des données scientifiques disponibles (avis n°9) ;
4. la recherche en pré-pasteurisation de staphylocoques devrait se focaliser sur le risque principal représenté par l'espèce *Staphylococcus aureus* (avis n°10) ;
5. l'étude conduite par l'ANSES sur les bactéries du genre *Bacillus* (et d'autres bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*) devrait permettre de caractériser le risque porté par ces bactéries (avis n°11) ;
6. la recherche systématique en pré-pasteurisation des entérobactéries, réalisée dans quelques pays, n'apparaît pas opportune (avis n°12) ;
7. les bactéries intervenant dans les infections sexuellement transmissibles (avis n°13) ne constituent pas une menace dans ce domaine.

En réponse à la question n°3 relative aux moyens devant être mis en place pour améliorer la détection d'organismes pathogènes, le CST recommande :

1. dans l'optique de standardiser les techniques et méthodes microbiologiques de contrôle, la mise en place d'une validation des techniques et méthodes employées et l'utilisation en routine de contrôle de la qualité interne et à terme, la participation à des contrôles externes de la qualité (avis n°14). Cette standardisation devrait être menée sur des bases et avec un langage communs (avis n°15) ;
2. de maintenir des contrôles systématiques de chaque lot, une approche de maîtrise statistique des processus ne pouvant pas, à ce stade, être mise en place pour garantir la pertinence d'un échantillonnage (avis n°16) ;
3. que le choix des méthodes et des milieux de culture soit réalisé par le biologiste ou praticien hygiéniste responsable des analyses sur la base de la validation de la technique et de la méthode (avis n°17) ;
4. de fixer le seuil de conformité de l'échantillon après pasteurisation à 10 UFC/mL comme dans d'autres pays, les techniques et méthodes standardisées et validées présentant une meilleure sécurisation des résultats (avis n°18) ;
5. de justifier et valider le choix du moment de prélèvement post-pasteurisation avec la validation de la technique et de la méthode, le prélèvement faisant partie d'une des phases pré-analytiques (avis n°19) ;
6. de maintenir aux mêmes valeurs, les seuils des contrôles pré-pasteurisation pour les lots, en l'absence d'arguments pour les modifier (avis n°20).

En conclusion de ce travail, certaines propositions du comité demandant un suivi (notamment les propositions 2, 3, 4, 6 et 9), les membres du CST émettent une dernière recommandation (avis n°21) qui est de poursuivre leurs travaux en commun, au sein d'une organisation de l'ANSM qui reste à définir.