

# *Cronobacter* spp.

Famille des *Enterobacteriaceae*

Bactérie

## Caractéristiques et sources de *Cronobacter* spp.

### Principales caractéristiques microbiologiques

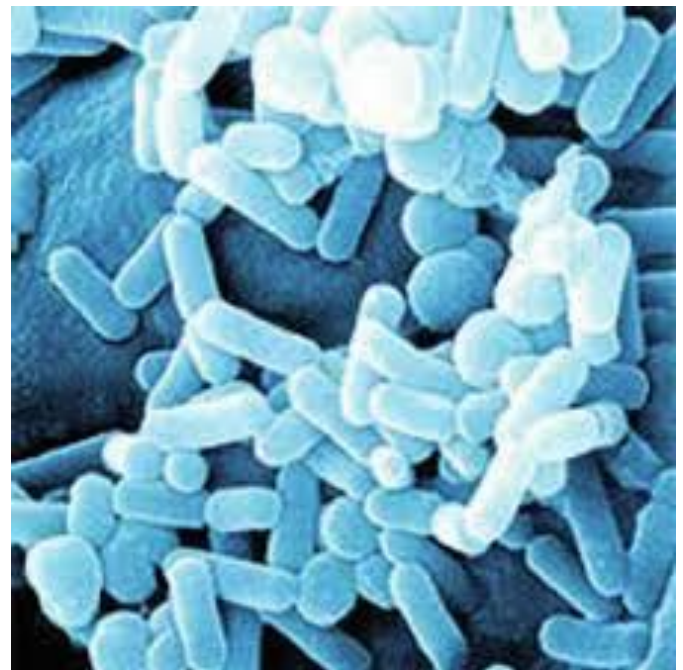
Décrits jusqu'en 2007 comme *Enterobacter sakazakii*, les *Cronobacter* spp. sont responsables d'infections humaines (méningites infantiles, entérocolites nécrosantes, infections systémiques notamment). Ce sont des bâtonnets mobiles de 1 à 3 µm de longueur, anaérobies facultatifs, à coloration de Gram négative, asporulés, thermotolérants, oxydase négative et catalase positive. Une particularité phénotypique utile à leur détection est une activité alpha-glucosidase. Leur capacité à former des biofilms, et leur relative résistance (notamment grâce à la production d'une capsule) 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. Ils sont capables d'utiliser l'acide sialique comme seule source de carbone et peuvent ainsi se développer dans le lait maternel et dans les préparations pour nourrissons.

Les *Cronobacter* spp. sont des bactéries de l'environnement. Certains sont des pathogènes opportunistes: *C. sakazakii* et *C. malonaticus* à l'origine de la majorité des cas cliniques de tous les âges ; *C. turicensis* et *C. universalis* à l'origine de quelques cas cliniques.

Selon le schéma de *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) sur 7 loci de gènes de ménage et les métadonnées disponibles, *C. sakazakii* du complexe clonal (CC) CC4 et du type de séquence (ST) ST12 sont les plus associés respectivement aux méningites infantiles et aux entérocolites nécrosantes. De même, *C. malonaticus* CC7 est associé aux infections de l'adulte. D'autres souches appartenant à d'autres ST peuvent également être identifiées lors d'infections

Depuis le premier cas humain en 1958, des facteurs de virulence ont été décrits : les protéines membranaires externes (OMP), l'entérotoxine et l'endotoxine, un activateur du plasminogène, et un système d'efflux ainsi que d'acquisition du fer. Ainsi, la bactérie est capable de survivre au passage dans l'estomac, traverse l'épithélium intestinal (en causant des dommages locaux), survit dans les macrophages, et traverse la barrière hémato-encéphalique, causant une infection systémique potentiellement mortelle.

La survie de *Cronobacter* spp. a été observée 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.



*Cronobacter* spp.

**Tableau 1** : Caractéristiques de croissance des *Cronobacter* spp. (en conditions de laboratoire)

Croissance	Min.	Opt.	Max.
Température (°C)	5,5	≈ 39	47
pH	3,89	5-9 selon les souches	10
% NaCl inhibant la croissance		/	7 %

### Sources du danger

Les *Cronobacter* spp. sont des microorganismes telluriques, ubiquitaires, présents à la fois dans l'eau, le sol, les poussières ainsi que chez de nombreux êtres vivants. Leur principale source réside dans les plantes. Les rongeurs et les insectes, comme les mouches, peuvent être des vecteurs de contamination.

### Voies de transmission

La transmission à l'Homme s'effectue exclusivement par voie alimentaire. La transmission interhumaine n'a pas été démontrée. Un pourcent des enfants et des adultes testés portent des *Cronobacter* spp. dans les fèces et sur la peau, et de 3 à 20 % en portent dans leur flore buccale.

La transmission nosocomiale est démontrée par les tubes nasogastriques d'alimentation des nouveau-nés et la mauvaise hygiène lors de la préparation des biberons.

## Maladie humaine d'origine alimentaire

### Nature de la maladie

**Tableau 2** : Caractéristiques des infections à *Cronobacter* spp.

Durée moyenne d'incubation	Principaux symptômes	Durée des symptômes	Durée de la période contagieuse (excrétion)	Complications (dont létalité)
3 - 15 j (variable selon la dose ingérée et l'état de l'hôte)	<b>Nouveau-nés</b> - méningites 41 % - septicémies, bactériémies 18 % - entérocolites nécrosantes 16 % - autres (pneumonies, abcès, conjonctivites, etc.) 25 % <b>Adultes</b> - abcès 10 % - colonisations 35 % - bactériémies 20 % - ostéomyélites 5 % - pneumonies 20 % - autres (infections urinaires, ulcères, etc.) 10 %	Variable selon les formes cliniques	Peu documentée (une étude montre une excrétion possible jusqu'à 18 semaines)	<b>Nouveau-nés</b> - séquelles neurologiques sévères (hydrocéphalie, etc.) - retard de développement Létalité : 40 – 80 % <b>Adultes</b> Létalité : non estimée

**Population sensible<sup>1</sup>** : Principalement, les nourrissons de moins de deux mois, hypotrophes et/ou prématurés et les très jeunes enfants (< 5 ans), 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>

La probabilité de maladie lors d'une exposition à une cellule de *Cronobacter* spp. a été estimée à  $8,9.10^{-6}$  (EFSA, 2004). Toutefois ce chiffre est sans doute surestimé (FAO-OMS, 2008) et est en cours de réévaluation grâce à de nouveaux modèles animaux.

### Épidémiologie

La surveillance mondiale de ce micro-organisme est assurée par le Centre collaborateur OMS de référence, recherche et formation sur *Cronobacter* (University College, Dublin, Irlande). Il n'existe pas de système de surveillance en France et en Europe. Les infections sont cependant recensées indirectement en France par le système de signalement des infections nosocomiales (Décret n°2017-129 du 3 février 2017).

Depuis les premiers cas observés en Islande en 1986 et jusqu'à 2009, 120 cas sporadiques ou épidémiques ont été dénombrés dans le monde, incluant 26 morts.

Parmi les cinq cas groupés ou épidémies principaux décrits dans le monde, deux ont eu lieu en France chez des nouveau-nés, en 1994 (18 cas, trois morts) et en 2004. Ce dernier épisode de cas groupés, survenu dans cinq hôpitaux, était associé à la consommation d'une préparation de lait en poudre pour nourrissons destinée à des fins médicales spéciales et a causé neuf cas parmi lesquels quatre infections (dont deux méningites mortelles) et cinq colonisations digestives. Six cas ont été recensés entre 2012 et 2017.

## Rôle des aliments

### Principaux aliments à considérer

Toutes les préparations en poudre destinées aux nourrissons, aux jeunes enfants ou aux personnes âgées dont les préparations à des fins médicales spéciales, ou les additifs, comme l'amidon, ajoutés à ces préparations sont des produits à risque. La prévalence de *Cronobacter* spp. dans ces produits peut atteindre 14 %. Seules les préparations liquides stériles sont des produits exempts de *Cronobacter* spp.

*Cronobacter* spp. ne survivant pas à la pasteurisation, les préparations en poudre sont contaminées par l'environnement de production par voie aéroportée. Les matières premières n'ayant subi aucun traitement préalable par la chaleur, qui sont 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. Malgré une contamination de l'environnement de production parfois élevée, la contamination en *Cronobacter* spp. des préparations en poudre reste faible : de < 0,001 à quelques bactéries par 10 kg dans les poudres commercialisées en France en 2007 par exemple.

Une contamination externe durant la reconstitution des poudres de lait, par des ustensiles de préparation contaminés par exemple, est toujours possible, aussi bien au domicile que dans les établissements hospitaliers. *Cronobacter* spp. peuvent se multiplier dans les réfrigérateurs domestiques mal réglés. Les infections humaines sont liées à la consommation d'aliments en poudre reconstitués par addition de liquide (eau) et conservés dans des conditions favorables à la croissance de *Cronobacter* spp.

<sup>1</sup> 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.

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

<sup>3</sup> 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.

## Traitements d'inactivation en milieu industriel

**Tableau 4** : Impact des traitements en milieu industriel

Traitement	Conditions	Impact	Matrice
Température	D <sub>60°C</sub> <sup>4</sup> = 0,9-4,4 min D <sub>70°C</sub> = 0,07 min		Milieu liquide
	D <sub>85°C</sub> = 100 s D <sub>100°C</sub> = 47,9 s		Poudre de lait (a <sub>w</sub> = 0,25)
	Certaines souches possèdent une thermotolérance plus élevée (D <sub>58°C</sub> : 9,9 min) que la plupart des entérobactéries		
Désinfectants	Sensible à tous les désinfectants autorisés en industries agro-alimentaires, sous réserve de suivre les modalités d'utilisation recommandée		
Hautes pressions	600 MPa, 1 min	3 à 6,8 réductions décimales	
Rayonnements ionisants*	D <sub>10</sub> <sup>5</sup> = 0,24 à 0,37 kGy		Milieu liquide

\* Toutefois, l'ionisation n'est pas utilisée sur les préparations déshydratées, en raison des altérations organoleptiques et nutritionnelles qu'elle provoque.

## 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* spp. dans 10 g, 30 échantillons analysés par lot). Ce dernier critère est équivalent à celui fixé par le *Codex Alimentarius*. Le Règlement (CE) N°2073/2005 indique par ailleurs que des analyses doivent être réalisés pour les *Enterobacteriaceae* et pour *Cronobacter* spp.. Les exploitants peuvent se dispenser de rechercher *Cronobacter* spp. si une corrélation est établie entre les deux analyses. Le Règlement (CE) N°2073/2005 impose l'utilisation de la spécification technique ISO/TS 22964, révisée et validée internationalement en 2017 en norme de référence EN ISO 22964, couvrant la détection des *Cronobacter* spp. 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.

Bien que l'eau destinée à la consommation humaine soit utilisée pour la reconstitution des préparations en poudre, il n'existe pas de méthodes d'analyse de *Cronobacter* spp. dans l'eau.

Des méthodes commerciales de criblage des échantillons par méthodes PCR ou d'isolement sur géloses chromogènes existent pour détecter cette bactérie, mais ne sont pas toutes validées selon l'EN ISO 16140-2 par rapport à la méthode de référence. L'identification repose sur le séquençage du gène *fusA* ou la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Du point de vue de la surveillance moléculaire de *Cronobacter* spp., les méthodes génomiques de core genome (cgMLST) sur 1865 loci et de Single Nucleotide Polymorphism Analysis (SNPs) peuvent être utilisées.

### Recommandations aux opérateurs

- Assurer le suivi et la maîtrise des contaminations environnementales dans les unités de fabrication des préparations en poudre pour nourrissons. La prolifération bactérienne dans les ateliers doit être maîtrisée par l'application d'un plan strict de bonnes pratiques d'hygiène, avec notamment le maintien d'un environnement sec ; ainsi, la recherche 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*. Compléter l'échantillonnage préconisé par la réglementation, afin d'en augmenter l'efficacité, en gardant en mémoire que celui-ci ne peut pas à lui seul garantir l'innocuité des produits.
- Éviter le « pooling » (regroupement des prises d'essais pour les analyses microbiologiques) lors de la mise en œuvre de la méthode de détection de *Cronobacter* spp., sauf si l'absence d'impact sur les caractéristiques de performance a été vérifiée/validée selon la norme EN/ ISO 6887-1.
- Établir des critères de qualité des matières premières et des ingrédients secs ajoutés aux préparations en poudre.

<sup>4</sup> D est le temps nécessaire pour diviser par 10 la population du danger microbiologique initialement présente

<sup>5</sup> D<sub>10</sub> est la dose (en kGy) nécessaire pour réduire une population à 10% de son effectif initial

## Hygiène domestique

L'Afssa (2005) et l'OMS (2007) ont publié des recommandations pour la reconstitution, la conservation et la manipulation 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* spp. 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

De mauvaises conditions de reconstitution et de conservation des préparations en poudre pour nourrissons peuvent permettre la croissance de la bactérie pathogène et favoriser la survenue d'infections :

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

## Liens

### Références générales

Afssa. 2005. « Recommandations d'hygiène pour la préparation et la conservation des biberons »

<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-BIB.pdf>

Afssa. 2007. « Contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées »

<https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-PoudresLait.pdf>

Anses. 2019. « Avis révisé relatif à la filière de production des préparations en poudre pour nourrissons – saisine 2018-SA-0264 »

<https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2018SA0264.pdf>

Codex Alimentarius. 2008. « Code d'usages en matière d'hygiène pour les préparations en poudre pour nourrissons et jeunes enfants - CAC/RCP 66-2008 »

[http://www.fao.org/input/download/standards/11026/CXP\\_066f.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/11026/CXP_066f.pdf)

Codex Alimentarius. 2009. « CCFH. Alinorm 09/32/13 Rapport de la quarantième session du Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire (CCFH). Point 4 à l'ordre du jour : Critères microbiologiques pour les préparations de suite en poudre et les préparations pour enfants en bas âge données à des fins médicales spéciales »

[http://www.fao.org/input/download/report/714/al32\\_13f.pdf](http://www.fao.org/input/download/report/714/al32_13f.pdf)

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-OMS. 2008. « *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up Formulae. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series 15. »

[www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA\\_followup.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_followup.pdf)

FAO-OMS. 2007. « Préparation, conservation et manipulation dans de bonnes conditions des préparations en poudre pour nourrissons : directives. »

[www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif\\_guidelines\\_fr.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines_fr.pdf?ua=1)

### Liens utiles

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