

RECOMMANDATION DU COMITE DE MINISTRES
DE L'UNION ECONOMIQUE BENELUX RELATIVE
AUX DIRECTIVES AUX LABORATOIRES DES PAYS DU
BENELUX POUR LE DEPISTAGE DES INTOXICATIONS
ALIMENTAIRES D'ORIGINE MICROBIENNE
(M (64) 8)

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 6 du Traité d'Union,

Considérant l'intérêt de la prévention des intoxications alimentaires d'origine microbienne,

Considérant l'opportunité d'harmoniser les techniques mises en œuvre pour dépister les germes responsables,

Recommande :

Article unique

Les Gouvernements des trois pays du Benelux sont invités à transmettre dans un délai de trois mois aux laboratoires chargés du dépistage des intoxications alimentaires d'origine microbienne, les directives ci-annexées, en leur demandant de s'y conformer.

Fait à Bruxelles, le 25 mai 1964,

Le Président du Comité de Ministres,

(s.) Eug. SCHAUS.

**DIRECTIVES AUX LABORATOIRES DES PAYS
DU BENELUX POUR LE DEPISTAGE
DES INTOXICATIONS ALIMENTAIRES
D'ORIGINE MICROBIENNE
(M (64) 8 Annexe)**

**I PRINCIPAUX AGENTS RESPONSABLES
DES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES**

Les principaux agents responsables des toxi-infections alimentaires sont :

1. Les microbes aérobies :
 - a) cocci : Staphylocoques
 - b) entérobactériaceae : Salmonella
 - c) bacilli : B. cereus.
2. Les microbes anaérobies :
 - a) Cl. botulinum
 - b) Cl. perfringens

D'autres microbes, tels les streptocoques, Shigella, B. megatérium, sont exceptionnellement incriminés dans des cas d'intoxication alimentaire.

Toutefois, leur rôle est encore mal défini et reste discuté. Leur importance dans le cadre Benelux est certes moindre et c'est la raison pour laquelle ils n'ont pas été retenus.

**II. SYMPTOMES DES INTOXICATIONS
PROVOQUEES PAR CES AGENTS**

D'une manière générale, les symptômes des intoxications alimentaires surviennent dans les heures qui suivent l'ingestion

<i>MALADIE</i>	<i>Début des symptômes</i>	<i>Type d'aliments habi- tuellement incriminés</i>	<i>Symptômes et autres caractéristiques</i>
Botulisme	6 h. à plusieurs jours, moyenne 12-36 h.	Légumes faiblement acidulés en conserves domestiques. Salaisons crues.	Enrouements de la voix, maux de tête, lassitude, puits nausées, troubles oculaires (mydriase). Paralysie des nerfs crâniens et perte du réflexe oculaire. La constipation est fréquente. Dans les cas graves, paralysie respiratoire. Absence de fièvre.
Staphylocoque	1 h. à 6 h. moyenne : 2¼-3 h.	Viandes travaillées, salade et purée de pommes de terre, pâtisserie fourrée à la crème, produits laitiers.	Salivation, nausées, vomissements incoercibles, cram- pes abdominales, diarrhée parfois profuse, prostra- tion et collapsus circulatoire dans les cas graves, habituellement apyrexie. En général, disparition des symptômes en 1 ou 2 jours.
Salmonella	5 h. à plusieurs jours, moyenne : 12 à 48 h. parfois plusieurs jours à un mois même	Volailles et produits dérivés. Viandes travaillées. Œufs et produits dérivés.	Début brutal des symptômes : douleurs abdominales. diarrhée, parfois constipation, frissons, fièvre, adynamie. Vomissements fréquents. La sévérité de l'infection varie d'un sujet à l'autre.
Cl. perfringens	2 h. à 24 h. moyenne: 8-12 h.	Viandes réchauffées, pâtés de viande, viandes froides, plats préparés.	Coliques avec diarrhée. Vomissements rares. Les maaises subsistent pendant 24-48 h. Absence de fièvre.
B. cereus	10 à 12 h.	Denrées alimentaires renfer- mant des produits dérivés de céréales.	Coliques avec diarrhées profuses, nausées, rarement vomissements. Les maaises subsistent pendant 12 à 24 h. Absence de fièvre.

On ensemence alors soit 0,1 ml de chacune des dilutions en surface sur les milieux gélosés coulés en boîtes de Pétri, soit 1 ml de chacune des dilutions qu'on homogénéise dans des milieux gélosés maintenus pour la circonstance à l'état liquide à la température maximum de 48° C et qu'on laisse solidifier après homogénéisation en tubes ou en boîtes de Pétri.

La lecture des résultats se fait après 24 à 48 h. d'incubation à 37° C.

C. Techniques à utiliser pour la recherche des divers germes en cause

1. Recherche des staphylocoques

L'examen microscopique offre un grand intérêt en particulier pour les denrées alimentaires qui ont subi un traitement par la chaleur, les antiseptiques ou d'autres substances inhibitrices.

La présence d'un grand nombre de cocci Gram positifs vivants ou morts peut faire suspecter la présence d'entérotoxine.

a) Ensemencement de la denrée sur milieu solide

On ensemence des dilutions successives de la denrée incriminée sur gélose au sang ou mieux sur gélose de Chapman-Stone (voir addendum page 316). Ce dernier milieu hypersalé inhibe le développement de la plupart des autres germes.

D'autre part, ce milieu donne des renseignements intéressants sur deux propriétés importantes des staphylocoques : la fermentation de la mannite et l'hydrolyse de la gélatine.

b) Caractérisation

La recherche du caractère pathogène se fait sur 5 colonies au moins. On prélève les colonies fermentant la mannite et éventuellement les colonies ne la fermentant pas et on effectue la recherche de la coagulase sur plasma humain ou sur plasma de lapin et éventuellement de la phosphatase.

de Salmonella, il faut ensemercer 2 milieux d'enrichissement différents lorsque la chose est possible. Les Salmonella ne sont pas toujours réparties d'une manière uniforme dans les masses à analyser, de sorte que le volume ensemençé joue un rôle important dans cette recherche. Il y a aussi intérêt à ne pas dépasser un rapport maximum entre le volume ensemençé et le volume du milieu d'enrichissement.

Ce rapport ne doit raisonnablement pas dépasser 25 %.

Compte tenu de ces particularités, le volume du milieu d'enrichissement ne sera pas inférieur à 100 ml.

Le développement optimum des Salmonella est obtenu à des pH voisins de la neutralité, de sorte que si la matière à analyser se trouve à un pH trop éloigné de cet optimum, il convient au préalable de l'y amener.

D'autre part, si la matière à analyser contient trop de substances grasses, il convient d'en assurer une bonne dispersion en émulsionnant la matière dans du liquide de dilution additionné d'une solution à 10 % de Tergitol en quantité telle qu'une agitation vigoureuse du milieu d'enrichissement ensemençé fasse apparaître une bonne couche de mousse.

Généralement, la quantité de solution à 10 % de Tergitol à ajouter est de 6 ml pour 100 ml. de milieu d'enrichissement.

Les milieux d'enrichissement sont incubés à 37° C pendant 18, 24 et 72 h., puis une goutte de ces milieux est ensemençée sur milieu d'isolement.

b) Milieux d'isolement

Il est indispensable d'obtenir sur les milieux d'isolement le maximum de colonies séparées en vue d'en apprécier les caractères. Dans ce but, il y a intérêt à étaler la semence sur la plus grande surface possible en utilisant soit plusieurs boîtes de Pétri ordinaires, soit des boîtes de Pétri d'un diamètre plus important (minimum 14 cm.).

L'aspect des colonies suspectes varie selon les milieux employés. Leur prélèvement constitue un temps très délicat et rien ne remplace l'expérience pour apprendre à discerner les

qu'on examine le lendemain, et l'on ne retient pour l'étude ultérieure que les colonies ayant donné sur ce milieu une alcalinisation de la gélose inclinée et une acidification du culot de gélose avec ou sans production d' H_2S .

d) **Identification des Salmonella**

L'identification des Salmonella est basée sur :

1) *l'étude des caractères physiques et biochimiques différentiels des Salmonella :*

Cocco-bacilles Gram négatifs, mobiles pour la plupart.

Fermentation du glucose avec ou sans gaz et aussi, la plupart du temps, de la dulcité.

Absence de fermentation du lactose, du saccharose, de l'adonite et de la salicine (voir addendum page 320).

Absence de production d'indol.

Uréase négatif.

Absence de développement en milieu au KCN (voir addendum page 321).

Mise en évidence d'une décarboxylase pour la lysine (voir addendum page 321).

Recherche de l' H_2S : la plupart des souches produisent de l' H_2S .

2) *l'étude de la structure antigénique*

Au moyen de sérums monovalents somatiques et flagellaires.

3) *la lysotypie*

Pour *S. typhi* murium, *S. paratyphi* B. et *S. typhi*.

3. *Recherche de B. cereus*

Une intoxication alimentaire ne peut être attribuée à *B. cereus* que si le nombre de germes trouvés dans l'aliment incriminé est particulièrement élevé, de l'ordre de 10^6 par gramme.

Le liquide surnageant est injecté à 2 à 3 souris à raison de 0,5 ml en injection intra-péritonéale. Si les souris meurent on procède à la recherche de la dose mortelle minimale. On injecte alors des souris avec

une unité de sérum antitoxique A
une unité de sérum antitoxique B
une unité de sérum antitoxique C
une unité de sérum antitoxique D
une unité de sérum antitoxique E

et 100 DMM de toxine.

c) Culture

On peut procéder également à la culture de *Cl. botulinum* de la façon suivante : le broyat chauffé pendant 15 minutes à 85° si l'on suspecte la présence de *Cl. botulinum* A, B, C ou D ou pendant 3 minutes à 80° si l'on suspecte la présence de *Cl. botulinum* du type E, seraensemencé en milieu viande-foie liquide (voir addendum page 322) ou en milieu viande-levure (voir addendum page 323).

Après 2 à 4 jours d'incubation à 30° on recherchera la présence de toxine comme il est indiqué plus haut.

5. Recherche de *Cl. perfringens*

Une intoxication alimentaire ne peut être attribuée à *Cl. perfringens* que si le nombre de germes trouvés dans l'aliment incriminé est élevé.

Cl. perfringens entérotoxiques se recherchent soit dans les selles des sujets intoxiqués où ils se trouvent toujours à l'état sporulé, soit dans les denrées alimentaires où ils se trouvent sous la forme sporulée ou sous la forme végétative.

A. Recherche des formes végétatives :

a) Dénombrement des formes végétatives sur gélose au sang de mouton ou sur milieu V.F. sulfité (voir addendum page 322).

I. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE PRECONISES

A. Milieux pour le dépistage des staphylocoques

Milieux de Chapman-Stone

Extrait de levure	2,5	g
Trytone	10	g
Gélatine	30	g
d. Mannitol	10	g
Chlorure de Sodium	55	g
Sulfate d'Ammonium	75	g
Phosphate dipotassique	5	g
Agar	15	g

B. Milieux pour le dépistage des salmonella

a) *Milieu de Müller-Kauffmann* (Tétrathionate. Vert brillant)

1. Base :

Protéose	5	g
Bacto bile salts	1	g
Calcium carbonate	10	g
Sodium thiosulfate	30	g
Eau distillée	1000	ml
Chauffer à ébullition. Refroidir à $\pm 45^{\circ}\text{C}$.		

2. Solution iodo-iodurée

Iode	20	g
Iodure de potassium	25	g
Eau distillée	100	ml

ne pas stériliser

3. Solution aqueuse de vert brillant à 1‰ :

La solution est préparée en chauffage à l'ébullition et en agitant à plusieurs reprises le vert brillant dans l'eau.

Le milieu est préparé en ajoutant à 100 ml de la base, 2 ml de la solution iodo-iodurée et 1 ml de la solution de vert brillant.

A : Solution de rouge phénol

Eau distillée : 460 ml ; NaOH 1/10 N : 40 ml ; rouge phénol 1 g,

Conserver à la température de 37° C pendant 2 à 3 jours tout en agitant de temps en temps,

Filtrer sur papier et stériliser pendant 20 minutes à 125° C.

B : Solution de vert brillant à 0,5 %

Dissoudre le vert brillant dans de l'eau distillée,

Conserver à la température du laboratoire pendant quelques jours en agitant régulièrement,

Cette solution n'est pas stérilisée.

C : Solution de saccharose - lactose

Lactose (Ed. 6) PB IV : 8 g

Saccharose (Ed. 6) PB IV : 8 g

Porter le volume à 32 ml avec de l'eau distillée

Attendre la dissolution et stériliser à 100° C pendant 45 minutes.

D : Bouillon gélosé

Laisser macérer 500 g de viande de bœuf dégraissée et hachée dans 1 l. d'eau pendant 24 h. à la température de 4° C.

Ensuite chauffer lentement la préparation et la porter à l'ébullition.

Faire bouillir pendant 15'.

Filtrer sur coton et ajouter : 1 % de peptone ; 0,3 % de chlorure de sodium ; 0,2 % de phosphate disodique ($\text{Na}^2 \text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Chauffer le mélange pendant 5' et amener le pH à 7,4 au moyen d'une solution de soude normale.

Filtrer sur papier, ajouter 2 % de gélose et stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20'. Ajuster le pH entre 6,9 et 7.

e) Gélose S.S.

Extrait de viande de bœuf	5	g
Lactose	10	g

Glucose	1	g
1-lysine	5	g
Pourpre de bromocrésol	0,02	g

C. Milieux pour le dépistage de *B. Cereus*

Milieu à la lécithine (Mac Lung modifié par Colmer)

a) Milieu de base	10	g
Bactotryptone	5	g
Phosphate disodique	1	g
Phosphate monopotassique	1	g
Chlorure de sodium	2	g
Sulfate de magnésium	0,1	g
Glucose	2	g
Gélose	25	g
Eau distillée	1000	ml

b) Suspension de jaune d'œuf.

Prendre un œuf, éliminer le blanc et verser stérilement le jaune dans une éprouvette, ajouter un volume égal d'eau physiologique stérile et mélanger.

c) Milieu définitif.

Milieu de base fondu et ramené à
48° - 50°

Suspension de jaune d'œuf stérile

100 ml
10 ml

D. Milieux pour le dépistage des *Clostridium*

a) *Gélose profonde viande-foie (V.F.) sulfitée*

1° Milieu de base ou milieu V.F.

Dans un récipient en verre ou dans une marmite émaillée, verser 9 litres d'eau à 48° - 50° puis ajouter :

Viande de bœuf parée, dégraissée, hachée	1800	g
Foie de bœuf paré et haché	500	g
Acide chlorhydrique pur	75	ml
Pepsine titre 500 (très important)	5	g

c) *Milieu à l'extrait de viande et de levure (V.L.)*

1° Cultures en profondeur.

Peptone typsique	10	g
Chlorure de sodium	5	g
Extrait de viande de bœuf	3	g
Extrait de levure	5	g
Chlorhydrate de cystéine	0,40	g
Agar en poudre	15	g
Eau ordinaire	1000	ml
Glucose	2	g

Porter à l'ébullition pour dissoudre.

Ajuster à pH 7,2 - 7,4 avec de la lessive de soude 1/10 N.

Faire bouillir à nouveau. Filtrer.

2° Cultures en surface.

Milieu de composition et préparations identiques mais contenant 2 % d'agar en poudre.

Ce milieu peut être additionné de 8 à 10 % de sang ; la poudre absorbante pour réaliser l'anaérobiose se compose de :

Carbonate de potassium	3	g
Pyrogallol	3	g
Terre d'infusoires	15	g

Mélanger au mortier - répartir à raison de 2 g par paquet de papier filtre.

II. TECHNIQUE DE COLORATION DE BURRI

1° technique

1. Emulsionner une colonie prélevée sur milieu solide dans une goutte de formol à 10 %.
2. Ajouter une goutte d'encre de Chine - émulsionner - laisser agir pendant 1 minute - étendre sur lame - laisser sécher.
3. Colorer à la fuchsine aqueuse diluée au dixième pendant 1 minute (cf. technique de coloration de Zielh-Nielsen), laver à l'eau et laisser sécher.