

AANBEVELING VAN HET COMITE VAN MINISTERS
VAN DE BENELUX ECONOMISCHE UNIE INZAKE
DE RICHTLIJNEN VOOR DE LABORATORIA VAN DE
BENELUXLANDEN TEN AANZIEN VAN HET OPSPOREN
VAN VOEDSELVERGIFTIGINGEN VAN MICROBIELE
OORSPRONG
(M (64) 8)

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,

Gelet op artikel 6 van het Unieverdrag,

Gelet op het belang voedselvergiftigingen van microbiële oorsprong te voorkomen,

Gelet op de wenselijkheid de methoden tot opsporing van de oorzaken van deze vergiftigingen te harmoniseren,

Beveelt aan :

Enig artikel

De Regeringen der drie Beneluxlanden worden uitgenodigd aan de laboratoria, die belast zijn met het opsporen van voedselvergiftigingen van microbiële oorsprong, binnen een termijn van drie maanden, de hierbijgevoegde richtlijnen over te maken, met verzoek deze op te volgen.

Gedaan te Brussel, op 25 mei 1964,

De Voorzitter van het Comité van Ministers,

(w.g.) Eug. SCHAUS.

**RICHTLIJNEN VOOR DE LABORATORIA VAN DE
BENELUXLANDEN TEN AANZIEN VAN HET OPSPOREN
VAN VOEDSELVERGIFTIGINGEN VAN MICROBIELE
AARD**

(M (64) 8 Bijlage)

**I. BELANGRIJKSTE VERWEKKERS VAN
VOEDSELVERGIFTIGING**

De belangrijkste verwekkers van voedselvergiftiging zijn :

1. Aerobe bacteriën :
 - a) coccen : Stafylococcen
 - b) enterobacteriaceae : Salmonella
 - c) bacilli : B. cereus
2. Anaerobe bacteriën
 - a) Cl. botulinum
 - b) Cl. perfringens

Andere bacteriën, zoals streptococcen, Shigella, B. megaterium zijn slechts zelden oorzaak van voedselvergiftigingen.

Hun betekenis echter staat nog niet vast en blijft onderwerp van discussie. Het belang van deze bacteriën is geringer in Beneluxverband. Daarom worden deze bacteriën niet besproken.

**II. VERGIFTIGINGSVERSCIJNSELEN ALS GEVOLG
VAN BOVENGENOEMDE VERWEKKERS**

In het algemeen treden de symptomen bij voedselvergiftigingen kortere of langere tijd na consumptie van de besmette

<i>ZIEKTE</i>	<i>Incubatietijd</i>	<i>Voedingsmiddelen, gewoonlijk hierbij betrokken</i>	<i>Symptomen en andere eigenschappen</i>
Botulisme	6 uur tot enige dagen, gemiddeld 12-36 uur	Enigszins zuurgemaakte groenten in blik. Rauwe ingezouten slijzen.	Schorheid, hoofdpijn, moeheid, vervolgens misselijkheid. Oogstoornissen (mydriasis). Verlamming van de aangezichtszenen en verdwijnen van de cornea-reflex. Veelal constipatie. In ernstige gevallen verlamming van de ademhalingsspieren. Geen koorts
Stafylococcen	1 tot 6 uur, gemiddeld 2½ tot 3 uur	Vleeswaren, aardappelsalade en -puree, slagroomgebak en melkprodukten	Speekselvloed, misselijkheid, hevig braken, buikkrampen, veelal profuse diarree, loomheid en in ernstige gevallen circulatiestoornissen. Meestal geen koorts. In het algemeen verdwijnen de symptomen in 1 à 2 dagen.
Salmonella	5 uur tot enkele dagen, gemiddeld 12 tot 48 uur, soms enkele dagen tot zelfs een maand	Gevogelte en hiervan bereide produkten, vleeswaren, eieren en eiprodukten	De verschijnselen treden plotseling op; buikkramp, diarree, soms constipatie, koude rillingen, koorts, adynamie, frequent braken. De ernst van de infectie verschilt van patiënt tot patiënt.
Cl. perfringens	2 tot 24 uur, gemiddeld 8 tot 12 uur	Opgewarmd vlees, vleespastei, koud vlees en vleeschotels	Koliek met diarree, zelden braken. De ziekte verloopt in 24 tot 48 uur. Geen koorts.
B. cereus	10 tot 12 uur	Meelspijzen	Koliek met profuse diarree, misselijkheid, zelden braken. Ziekte verloopt in 12 tot 24 uur. Geen koorts.

Men ent vervolgens 0,1 ml van iedere verdunning op het oppervlak van agarplaten, of men brengt 1 ml van iedere verdunning met een hoeveelheid opgesmolten en bij tot een maximum van 48° C verwarmde, vloeibaar gehouden agar in buizen op petrischalen, waarna men de agar laat stollen.

Na 24 tot 48 uur bebroeden bij 37° C wordt het resultaat afgelezen.

C. Methoden van onderzoek voor de verschillende soorten voedselvergiftigende bacteriën

1. Onderzoek op Stafylococcen

Het microscopisch onderzoek is hierbij van groot belang, vooral bij de voedingsmiddelen, die een hitte-behandeling hebben ondergaan of met antiseptica of andere bacterie-remmende substanties zijn behandeld.

Bij de aanwezigheid van een groot aantal, levende of dode, Gram + coccen kan een enterotoxine aanwezig zijn.

a) Enten van het voedingsmiddel op een vast medium.

Men ent vanuit een verdunningsreeks, bereid van het verdachte voedingsmiddel, op bloedagar of beter nog op Chapman-Stone-agar (zie addendum blz. 316). Laatstgenoemd medium bevat veel NaCl en remt, daardoor de ontwikkeling van de meeste andere bacteriën.

Bovendien geeft dit medium aanwijzingen over twee belangrijke eigenschappen van stafylococcen : mannitol-vergisting en gelatine-vervloeijing.

b) Determinatie

Minstens 5 kolonies dienen op pathogeniteitskenmerken te worden onderzocht. Mannitol-vergistende, eventueel mannitol-negatieve kolonies worden afgeënt en onderzocht op coagulase-activiteit ten opzichte van humaan of konijneplasma en eventueel op de aanwezigheid van fosfatase.

typen, worden, indien mogelijk, twee verschillende ophopingsmedia toegepast. De Salmonella-bacteriën zijn niet altijd homogeen verdeeld over het te onderzoeken substraat, zodat de geënte hoeveelheid een belangrijke rol speelt bij het onderzoek. Het is verder van belang de juiste verhouding tussen materiaal en hoeveelheid ophopingsmedium aan te houden.

Redelijkerwijs mag het inoculum niet meer dan 25 % van de hoeveelheid ophopingsmedium bedragen.

Hiermede rekening houdend, mag de hoeveelheid ophopingsmedium niet minder dan 100 ml zijn.

Salmonella groeit optimaal bij $\text{pH} \pm 7$. Daarom verdient het aanbeveling bij materiaal met een zeer hoge of lage pH, deze te neutraliseren, alvorens het materiaal te enten.

Indien het te onderzoeken materiaal te veel vet bevat, dient men een goede dispersie te bewerkstelligen door het materiaal in emulsie te brengen met behulp van de verdunningsvloeistof waaraan 10 % Tergitol wordt toegevoegd, zodanig dat na krachtig schudden een duidelijke schuimkraag op de vloeistof blijft staan.

In het algemeen bedraagt de hoeveelheid toe te voegen 10 % Tergitol-oplossing 6 ml per 100 ml ophopingsmedium.

Van de ophopingsmedia wordt na 18, 24 en opnieuw na 72 uur bebroeden bij 37° C een druppel uitgestreken op een selectiefplaat.

b) Selectiemedia

Men dient op de selectiefplaten een maximaal aantal losliggende kolonies te verkrijgen, om de eigenschappen ervan te kunnen beoordelen. Daartoe wordt het inoculum over een zo groot mogelijk oppervlak uitgestreken door, of verschillende gewone petrischalen, of platen met een grotere diameter (minimaal 14 cm), te gebruiken.

Het aspect der kolonies verschilt naar gelang de gebruikte media. Het opnemen van de kolonies is niet gemakkelijk en het herkennen van verdachte kolonies vraagt enige ervaring. Diver-

de schuingestolde zijde alkalisch en de steekplaats zuur is geworden met of zonder produktie van en H_2S .

d) Identificatie van *Salmonella*

De identificatie van *Salmonella* berust op :

- 1) *bestudering van de voor deze bacteriën karakteristieke fysische en biochemische eigenschappen*

Gram-negatieve coccobacillen, meestal beweeglijk.

Vergisting van glucose met of zonder gasvorming en meestal ook van dulcitol.

Geen vergisting van lactose, saccharose, adonitol en salicine (zie addendum blz. 320).

Geen indol-vorming.

Ureum-negatief.

Geen groei in KCN medium (zie addendum blz. 321)

Lysine-decarboxylase-positief (zie addendum blz. 321).

Onderzoek op H_2S : de meeste stammen vormen H_2S .

- 2) *onderzoek naar de antigeen-structuur*

Met behulp van specifieke O- en H-antiseren.

- 3) *faagtypering*

Voor *S. typhi* murium, *S. paratyphi* B en *S. typhi*.

3. *Onderzoek op B. cereus*

Een voedselvergiftiging kan slechts aan *B. cereus* worden toegeschreven, indien het kiemcijfer in het betrokken voedingsmiddel bijzonder hoog is ; in de orde van 10^6 per gram.

Een halve ml van de bovenstaande vloeistof wordt bij 2 of 3 muizen intraperitoneaal ingespoten. Indien de muizen dood gaan, bepaalt men de minimale lethale dosis (M.L.D.). Vervolgens spuit men muizen in met :

één eenheid antitoxine A
één eenheid antitoxine B
één eenheid antitoxine C
één eenheid antitoxine D
één eenheid antitoxine E

en 100 M.L.D.

c) Kweek

Men kan *Cl. botulinum* ook kweken en wel op de volgende manier : het voedingsmiddel wordt gemalen en gedurende 15 min. bij 85° C verhit, indien men aanwezigheid van *Cl. botulinum* A, B, C of D vermoedt, en gedurende 3 min. bij 80° C, indien aanwezigheid van *Cl. botulinum* type E wordt vermoed. Vervolgens wordt het geënt in vloeibaar « vlees-lever » of « vleesgistextract » medium (zie addendum blz. 322 en 323).

Na 2-4 dagen incubatie bij 30° C wordt een onderzoek ingesteld naar de aanwezigheid van toxine op de bovenbeschreven wijze.

5. Onderzoek op *Cl. perfringens*

Een voedselsvergiftiging kan slechts aan *Cl. perfringens* worden toegeschreven, indien het kiemcijfer in het betrokken voedingsmiddel hoog is.

Enterotoxische *Cl. perfringens* wordt in de faeces van de patiënten altijd in gesporuleerde toestand, en in voedingsmiddelen in gesporuleerde of vegetatieve vorm aangetroffen.

A. Onderzoek naar de vegetatieve vorm :

- a) Kiemcijferbepaling op schapebloedagar of « vlees-lever-sulfiet » medium (zie addendum blz. 322).

I. SAMENSTELLING DER GENOEMDE VOEDINGSBODEMS

A. Voedingsbodems voor het aantonen van staphylococcen

Voedingsbodem volgens Chapman-Stone

Gistextract	2,5	g
Tryptone	10	g
Gelatine	30	g
d. Mannitol	10	g
Natriumchloride	55	g
Ammoniumsulfaat	75	g
Monokaliumfosfaat	5	g
Agar	15	g

B. Media voor de isolatie van salmonella

a) *Ophopingsvloeistof volgens Müller-Kauffman* (tetrathio-naat. Brilliantgroen)

1. Basis :

Proteose	5	g
Bacto bile salts	1	g
Calciumcarbonaat	10	g
Natrium-thiosulfaat	30	g
Aqua dest.	1000	ml
Verwarmen tot kooktemperatuur. Afkoelen tot $\pm 45^{\circ}\text{C}$.		

2. Jood-jodide-oplossing :

Jodium	20	g
Kaliumjodide	25	g
Aqua dest.	100	ml
niet steriliseren		

3. 1 %₀ waterige brilliantgroenoplossing :

De oplossing wordt bereid door het water tot kooktempera-tuur te verwarmen en onder voortdurend schudden brilliant-groen toe te voegen.

Ter bereiding van de voedingsbodem worden 100 ml van het basismedium, 2 ml van de jood-jood-kalium-oplossing en 1 ml van de brilliantgroenoplossing bij elkaar gevoegd.

A : *Phenol-rood-oplossing*

Aqua dest. : 460 ml ; 1/10 N NaOH : 40 ml ; phenol-rood, 1 g.

Gedurende 2-3 dagen bewaren bij 37° C, af en toe schudden gedurende deze tijd,

Door papier filtreren en gedurende 20 minuten bij 125° C steriliseren.

B : ½ % *Brilliant-groen-oplossing*

Oplossen in aqua dest.,

Gedurende enige dagen onder geregeld schudden bij kamertemperatuur bewaren,

Deze oplossing wordt niet gesteriliseerd

C : *Saccharum album-saccharum lactisoplossing*

Saccharum lactis (Ed. 6) PB IV : 8 g

Saccharum album (Ed. 6) PB IV : 8 g

Aanvullen tot 32 ml met aqua dest.,

Oplossen en gedurende 45 minuten bij 100° C steriliseren

D : *Bouillonagar*

Laat 500 g mager en gehakt rundvlees gedurende 24 uur bij een temperatuur van 4° C in 1 l. water weken.

Vervolgens het preparaat langzaam tot het kookpunt brengen.

Gedurende 15' laten doorkoken.

Filtreren door watten en toevoegen : 1 % pepton ; 0,3 % natriumchloride ; 0,2% zuurnatriumphosfaat ($\text{Na}^2 \text{HPO}^4 2\text{H}^2\text{O}$).

Verhit het mengsel gedurende 5' en breng de pH op 7,4 door middel van een normale natriumoplossing.

Filtreren door papier en toevoegen 2 % agar en gedurende 20' bij 120° steriliseren. pH op 6,9 à 7 brengen.

e) *S.S.-agar*

Rundvleesextract

5 g

Lactose

10 g

Glucose	1	g
l-lysine	5	g
Broomcresolpurper	0,02	g

C. Media voor het aantonen van *B. Cereus*

Lecithinebodem (Mac Lung gemodificeerd door Colmer)

a) Basismedium	10	g
Bactotryptone	5	g
Zuurnatriumphosfaat	1	g
Monokaliumfosfaat	1	g
Natriumchloride	2	g
Magnesium-sulfaat	0,1	g
Glucose	2	g
Agar	25	g
Aqua dest.	1000	ml

b) Eidooier-oplossing

Het geel van een ei wordt aseptisch in een reageerbuis gebracht.

Een gelijk volume sterile fysiologische zoutoplossing wordt toegevoegd en gemengd.

c) Eindmedium

Basismedium verhitten en afkoelen
tot 48°-50°

	100	ml
--	-----	----

Sterile eigeel-oplossing	10	ml
--------------------------	----	----

D. Media voor het aantonen van *clostridium*

a) *Vlees-lever-sulfiet-agar* (steekagar)

1° Basismedium (vlees-lever-agar)

In een glazen kolf of een geëmailleerde bak uitstorten
9 liter water van 48°-50° C, daarna toevoegen :

Vetvrij, fijngemalen rundvlees	1800	g
Gemalen runderlever	500	g
Zuiver zoutzuur	75	ml
Pepsine met titer 500 (zeer belangrijk)	5	g

c) *Vlees - gistextract - medium*

1° Steekagar

Pepton	10	g
Sodiumchloride	5	g
Rundvleesextract	3	g
Gistextract	5	g
Cysteine hydrochloride	0,40	g
Agarpoeder	15	g
Water	1000	ml
Glucose	2	g

Oplossen door zachtjes koken.

pH op 7,2 - 7,4 brengen met 0,1 N Natrium-hydroxyde.
Opnieuw koken. Filtreren.

2° Medium voor oppervlaktecultuur

Identiek met 1, maar 2 % in plaats van 1½ % agarpoeder.

Aan het medium kan worden toegevoegd 8 tot 10 % bloed, om betere anaerobe omstandigheden te krijgen, en :

Kalium-carbonaat	3	g
Pyrogallol	3	g
Infusorien-aarde	15	g

Mengen in een mortier. In porties van 2 g in filtreerpapier vouwen.

II. KLEURINGSTECHNIEK VAN BURRI

1° techniek

1. Eén afgeënte kolonie suspenderen in een druppel 10 % formaline.
2. Eén druppel Oostindische inkt toevoegen - mengen - 1 min. laten inwerken - uitstrijken op voorwerpglas - laten drogen.
3. Gedurende 1 min. kleuren met 10-voudig waterige fuchsi-ne-oplossing (zoals gebruikt voor Zielh-Nielsen-kleuring) — spoelen met water — laten drogen.