



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉTECTION DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* DANS LE MIEL ET LES SIROPS

John W. Austin
Division de la recherche microbiologique
Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Repère postal : 2204A2
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

1. **PRINCIPE**

La méthode consiste à séparer par filtration sur membrane les spores botuliques de la portion liquide du miel ou des sirops, à cultiver la membrane dans un milieu liquide, à rechercher les toxines dans la culture et à les identifier au moyen d'antisérums botuliques spécifiques. Parmi les types humains ordinaires de *C. botulinum*, seuls les types A et B sont habituellement impliqués dans le botulisme du nourrisson. Cette procédure vise donc à détecter ces 2 types. On peut considérer comme source possible de toxines un type humain rare (type F) si a) des souris auxquelles on a injecté cette toxine présentent les signes typiques du botulisme et b) les antisérums de type A ou B ne peuvent neutraliser la toxine. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-50 datée d'août 1988.

2. **DÉFINITIONS**

Voir l'annexe A du volume 3.

3. **PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

Voir l'annexe B du volume 3.

4. **MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX**

- 1) Porte-filtre stériles Millipore XXII04710.
- 2) Membranes filtrantes Millipore (MF) HPWP04700.
- 3) Seringue à tuberculine de 1 cc.
- 4) Aiguilles de calibre 27G de ½".
- 5) Antitoxines botuliques

- 6) Béchers stériles.
- 7) Eau distillée stérile.
- 8) Tween 80 à 1 % stérile.
- 9) Bouteilles de dilution de 150 mL, à bouchon qui visse.
- 10) Bouteilles à centrifuger de 300 mL.
- 11) Bain-marie réglé à 65 °C.
- 12) Centrifugeuse.
- 13) Armoire à écoulement laminaire.
- 14) Bouillon TPGYB.
- 15) Chambre ou bocal anaérobies.
- 16) Huile de paraffine.
- 17) Filtre de 0.45 µm avec dispositif Luer.
- 18) Solution tampon au phosphate et à la gélatine.
- 19) Souris blanches (environ 20 g).

4.1 Matériel de filtration.

4.1.1 **Supports Sterifil Millipore XXII 04710.** Ces porte-filtre sont fixés à des fioles à succion d'un litre. On peut brancher en parallèle deux unités ou plus à un collecteur branché à son tour à une pompe à vide.

4.1.2 **Membranes filtrantes (MF) Millipore HAWP 04700.** Ces filtres sont vendus au détail en boîtes de quatre paquets de 25 filtres.

Note : Le débit et le volume des matières filtrables dépendent du sens dans lequel on place la membrane filtrante dans les filtres, mais le meilleur sens n'a aucun lien avec leur orientation dans les paquets.

En ouvrant une nouvelle boîte, prendre deux filtres dans un paquet et les déposer (successivement ou parallèlement) dans les filtres a) dans le même sens que dans le paquet (à l'endroit) et b) à l'envers. Filtrer 100 mL de miel dilué (20 % p:v), chauffé à 65 °C, au moyen des deux membranes filtrantes et noter le débit dans chaque cas. Maintenir l'orientation qui correspond au débit le plus élevé pour les 25 membranes filtrantes qui restent dans le premier paquet. Procéder de la même façon pour examiner au moins un filtre de chacun des 3 paquets qui restent afin de déterminer la bonne orientation.

4.2. Seringues et aiguilles

Seringues recommandées : seringue à tuberculine de 1 cc, numéro 5602, Becton-Dickinson.
Aiguille recommandée : calibre 27, 1/2 po; aussi B-D.

4.3. **Antitoxines botuliques**

Antisérums trivalent (A,B,E) : Laboratoires Connaught
1755, avenue Steeles ouest, North York (Ontario), M2R 3T4
(416) 667-2701

Antisérums monovalents (A et B); Wellcome Laboratories,
Bechenham, Kent, Angleterre

5. **MARCHE À SUIVRE**

5.1 **Préparation des échantillons dilués**

Peser 25 g de miel (ou de sirop) dans un bécher stérile recouvert d'un morceau de papier d'aluminium. Ajouter 100 ml d'eau distillée contenant 1% de Tween 80 et mélanger jusqu'à ce que la suspension soit homogène.

5.2 **Activation, filtration et incubation des spores**

Dans le cas des sirops, transférer des volumes de 125 ml de la suspension dans des bouteilles à dilution de 150 ml munies d'un bouchon qui visse. Placer dans un bain-marie à 65 °C pendant 30 minutes. Filtrer au moyen d'une membrane filtrante (MF).

Dans le cas du miel, transférer des volumes de 125 ml dans des bouteilles à centrifuger de 300 ml. Placer dans un bain-marie à 65 °C pendant 30 min et centrifuger à 15,000 x g pendant 20 minutes. Filtrer le liquide surnageant au moyen d'une membrane filtrante. Garder temporairement le sédiment à 4 °C et filtrer. Après avoir filtré, rincer la bouteille de dilution et l'entonnoir avec environ 5 ml d'eau distillée froide stérile à travers chaque membrane filtrante. Dans une hotte à écoulement laminaire, transférer la MF dans 110 ml de milieu TPGYB. Lorsqu'on analyse du miel, ajouter prudemment le sédiment obtenu lors de la centrifugation à une bouteille de dilution contenant le milieu TPGYB et le filtre. Incuber à 35 °C pendant 7 jours en anaérobiose. Vérifier les bouteilles tous les jours. Ne pas visser les bouchons à fond pour empêcher la pression de s'accumuler.

5.3 **Modification de la méthode 5.2 si le filtre est encrassé**

Au rare cas où le filtre s'encrasse avant que la filtration du volume de 125 ml soit terminée, transférer la partie non filtrée sur un deuxième filtre. Rincer l'entonnoir qui contient le premier filtre avec de l'eau, transférer l'eau de rinçage dans le deuxième entonnoir et terminer la filtration. Rincer et transférer les deux filtres dans une seule bouteille de milieu TPGYB.

5.4 **Détection de *C. Botulinum* dans les céréales**

Peser 25 g de céréales directement dans 600 ml de milieu TPGYP refroidi à 65 °C. Garder à 65 °C pendant 30 minutes. Incuber en anaérobiose à 35 °C pendant 7 jours.

5.5 **Préparation du filtrat de culture**

Après 7 jours d'incubation, choisir les bouteilles où il y a des signes de croissance et prélever environ 20 ml de culture. Centrifuger à 20 000 x g pendant 20 min. et décanter le liquide surnageant. Prélever environ 10 ml de liquide surnageant au moyen d'une seringue jetable et stériliser en filtrant à travers une membrane Millex HA de 0,45 µm (Millipore) adaptée à la seringue.

5.6 **Détection de la toxine**

Diluer 4 ml de filtrat stérile avec 4 ml de solution tampon au phosphate et à la gélatine. Injecter 0,5 ml de filtrat dilué à deux souris (environ 24 g) par voie intrapéritonéale et observer pendant 4 jours. Conserver les portions inutilisées de filtrat dilué et de filtrat non dilué à 4 °C.

Notes :	(i)	Il faut diluer le filtrat pour prévenir le choc anaphylactique à cause de la forte teneur en protéines du milieu.
	(ii)	95 % des souris infectées par la toxine botulique dans le milieu TPGYB sont mortes ou mourantes après 24 heures.

5.7 Confirmation de la présence de la toxine botulique

Prélever tous les échantillons causant la mort d'une souris (1/2) ou des deux (2/2). Verser 1,5 ml de filtrat dilué dans quatre éprouvettes de 10 x 75 mm. Ajouter 0,15 ml d'antisérum botulique (annexe B, 4) : de l'antisérum trivalent A, B, E dans la première éprouvette, de l'antisérum monovalent A dans la deuxième, de l'antisérum monovalent B dans la troisième et aucun antisérum dans la quatrième. Mélanger et conserver les milieux à la température ambiante pendant 45 min. à 1 h. Injecter à deux souris 0,55 ml du mélange filtrat-antisérum et 0,5 ml de filtrat sans antisérum. Observer pendant 4 jours. Lorsqu'un échantillon ne tue qu'une souris sur deux, il faut l'injecter à deux autres souris, moins de 24 h après la première injection si possible. On considère que les échantillons sont positifs et renferment la toxine lorsque 2 souris 2 sur ou au moins 2 sur 4 sont tuées. Il s'agit des *Clostridium botulinum* de type A si les souris sont protégées par les antisérums trivalents A, B, E et l'antisérum monovalent A, et du *C. botulinum* de type B si elles sont protégées par l'antisérum trivalent A, B, E et l'antisérum monovalent B.

Notes :	(i)	S'il y a des signes de botulisme avant le décès des souris (poils ébouriffés, respiration abdominale pénible, membres faibles ou paralysés) et si aucun des antisérums n'a d'effet protecteur, la toxine peut provenir de <i>C. botulinum</i> de type F. Il faut alors, expédier le reste du filtrat au Centre de référence du botulisme pour identification. Conserver la culture originale à 4 °C pour référence future.
	(ii)	L'antisérum trivalent (A, B, E) est utilisé à la place de l'antisérum bivalent (A, B).

6. PRÉPARATION DES MILIEUX

6.1a MILIEU TRYPTICASE - PEPTONE - GLUCOSE - EXTRAIT DE LEVURE - EXTRAIT DE BŒUF (MILIEU TPGYB, 100 ML)

Trypticase (BBL)	50 g
Peptone (Difco)	5 g
Dextrose (Difco)	4 g
Extrait de levure (Difco)	20 g
Extrait de bœuf (Difco)	10 g
Thioglycolate de sodium	1 g
Eau distillée	1 litre

* Peut être remplacé par de la peptone spéciale L72 (Oxoid)

Note : Si l'on n'utilise pas le milieu jour même de sa stérilisation à l'autoclave, il faut le désaérer au préalable en le chauffant à 100 °C dans l'autoclave pendant 10 min ou en déposant les bouteilles de dilution dans environ 6 cm d'eau bouillante pendant 10 min.

6.2. DILUANT AU TWEEN 80

Tween 80 (mono-oléate de polyéthylène sorbitane)	10 g
Eau distillée	1 litre
Stériliser par filtration.	

6.3. TAMPON AU PHOSPHATE ET LA GÉLATINE

Gélatine	2 g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4)	10 g
Eau distillée	1 litre

Ajuster le pH à 6,6 avec du HCl IN. Stériliser à l'autoclave à 121 °C et 15 lb de pression pendant 15 min.

DANGERS POSSIBLE POUR LE CHERCHEUR

Les cultures liquides de *C. botulinum* contiennent des concentrations élevées de toxine et ne doivent être manipulées que par des employés chevronnés qui ont été immunisés avec une anatoxine botulique.

AVERTISSEMENT : l'anatoxine fournie par le CDC protège uniquement contre *C. botulinum* des types A à E, mais non contre le type F qui peut être impliqué, quoique rarement, dans le botulisme d'origine alimentaire ou le botulisme du nourrisson. Les produits scellés contaminés (en conserve ou conservés sous vide) peuvent être sous pression et il faut les ouvrir sous une hotte ou dans une armoire de sécurité pour se protéger contre les aérosols. Il faut porter des lunettes de protection lorsqu'il y a risque d'éclaboussement.

AVERTISSEMENT : l'immunisation ne protège pas les yeux contre la toxine botulique et les éclaboussements peuvent provoquer la cécité. Il faut porter des gants jetables et éviter de pipetter par la bouche. Il faut déposer la verrerie et le matériel qui est entré en contact avec la toxine dans un contenant robuste résistant à la chaleur que le chercheur doit placer lui-même dans l'autoclave. Il faut déposer dans des sacs résistants à l'autoclave le matériel jetable comme les gants, le coton ou les serviettes de papier et les considérer comme déchets dangereux. En cas de déversement accidentel, la toxine peut être inactivée par une solution saturée de bicarbonate de sodium ou par du bicarbonate de sodium en poudre.

Les aliments incriminés (à l'exception des produits scellés) et les spécimens cliniques peuvent être analysés par un personnel expérimenté qui n'a pas été immunisé avec une anatoxine botulique. Les aliments toxiques ne renferment habituellement que des concentrations relativement faibles de toxines.

Le *Clostridium botulinum* est considéré comme un organisme à risque du groupe 2 selon les **Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire** publiées par Santé et Bien-Être social Canada et le Conseil de recherches médicales du Canada. Le laboratoire doit donc satisfaire aux exigences imposées aux laboratoires de niveau de sécurité 2, décrites dans les **Lignes directrices**.