Les streptocoques D dans le lait cru réfrigéré

II. — LA DETERMINATION DES STREPTOCOQUES D DANS LE SYSTEME ACTUEL ET FUTUR DE DETERMINATION DE LA QUALITE

par

G. WAES

Station Laitière de l'Etat, Melle (Belgique)

On recherche les streptocoques D (*S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. bovis* et *S. equinus*) dans les denrées alimentaires parce qu'ils sont des indicateurs de contaminations fécales, l'indice de manipulations non-hygiéniques et la cause d'intoxications alimentaires.

Le présent exposé traitera d'abord de la signification de la présence de streptocoques D dans les denrées alimentaires, puis de la détermination éventuelle de ce groupe de bactéries dans le lait cru, dans le contexte du système, actuel et futur, de détermination de la qualité du lait.

I. — LES STREPTOCOQUES D EN TANT QU'INDICATEURS FECAUX

Humaines ou animales, les fèces contiennent pratiquement toujours des streptocoques D. Il n'est cependant pas possible d'imputer la présence d'un type déterminé de streptocoque D à une espèce animale déterminée ou à l'homme. Il est aussi hors de doute que, si l'on veut utiliser ces bactéries comme indicateurs fécaux, on ne peut pas se limiter aux entérocoques (*S. faecalis*, *S. faecium* et *S. durans*) ; du fait de la présence de *S. bovis* et de *S. equinus* dans les fèces, le groupe des streptocoques D semble mieux convenir.

L'emploi de streptocoques D comme indicateurs fécaux est fort discuté et nécessite encore des recherches. Les streptocoques D se rencontrent aussi ailleurs que dans les fèces, comme l'ont démontré, entre autres, les travaux de Mundt et *al.* (1958) et de Mundt (1963).

Les streptocoques D ont été pris en considération quand il est apparu que l'indicateur le plus précieux, *E. coli*, n'offrait que rela-

tivement peu de résistance aux facteurs externes alors que différents types de streptocoques D y résistent bien.

Il convient cependant de souligner ici, avec l' « International committee on microbiological specifications for foods » (Thatcher et Clark, 1968) que le fait que certains streptocoques D sont moins sensibles à des facteurs extérieurs est une bonne raison d'admettre qu'ils peuvent difficilement être de bons indicateurs. Un indicateur fécal doit avoir une résistance un peu supérieure ou égale à celle des bactéries, par exemple *Salmonella* et *Shigella*, qu'il doit révéler. En revanche, il faut concéder que l'indicateur *E. Coli*, plus généralement accepté, n'est pas à l'abri de tous reproches, comme l'a clairement démontré Buttiaux (1959).

Waes (1972) a pu démontrer que les streptocoques D du lait cru ne peuvent pas être considérés comme des indicateurs fécaux directs.

II. — LES STREPTOCOQUES D COMME INDICES DE MANIPULATIONS NON HYGIENIQUES

Mossel (1967) signale qu'indépendamment de la question de savoir si les streptocoques D sont ou ne sont pas des indices de contamination fécale, leur présence en nombre relativement élevé, témoigne d'une prolifération bactérienne indésirable dans la denrée alimentaire et fait présumer une qualité douteuse. La remarque ne concerne évidemment pas les denrées alimentaires qui ont subi une fermentation. L'auteur veut dire qu'il est très intéressant de déterminer le nombre de streptocoques D dans des produits traités par la chaleur, séchés ou congelés.

Saraswat (1963) a étudié la signification hygiénique des entérocoques présents dans le lait cru. Il a pu déterminer que le nombre d'entérocoques était plus représentatif de la qualité du lait cru « grade A » que la teneur en coliformes. Ce n'était pas le cas du lait cru ordinaire.

III. — LES STREPTOCOQUES D ET LES INTOXICATIONS ALIMENTAIRES

Hartman et al. (1965) écrivent dans un bon aperçu général qu'on n'a pas encore pu répondre à la question de savoir si les entérocoques provoquent vraiment des intoxications alimentaires. Bon nombre de descriptions d'intoxications alimentaires par entérocoques ont été publiées à une époque où l'on n'était encore que peu familiarisé avec l'intoxication par staphylocoques et ignorait encore tout de l'intoxication par *Cl. perfringens*. La possibilité d'intoxications alimen-

taires par *Cl. perfringens* n'a, en effet, été clairement établie que par les travaux de Hobbs et *al.* (1953).

Un certain nombre de chercheurs n'ont jamais pu prouver que des entérocoques étaient la cause d'intoxications alimentaires constatées, mais ont conclu à leur responsabilité parce que les entérocoques étaient présents en nombres considérables, tandis que les autres bactéries, agents reconnus d'intoxications alimentaires, faisaient défaut. Ceci est mis en évidence dans un article de Hartman et *al.* (1965). On peut aussi rappeler que plusieurs chercheurs ne sont pas parvenus à démontrer expérimentalement l'intoxication alimentaire par entérocoques chez l'homme et chez l'animal. Hartman et *al.* (1965) constatent que sans les rapports de Carey et *al.* (1931, 1938), d'Osler et *al.* (1948) et de Moore (1955) on pourrait conclure avec certitude que les entérocoques ne peuvent pas provoquer d'intoxication alimentaire.

Partant des nombreux résultats négatifs et des quelques résultats positifs obtenus dans la production artificielle d'intoxications alimentaires à l'aide d'entérocoques, on pourrait conclure avec Hartman et *al.* (1965) que peut-être seulement certaines souches, en nombre limité, sont susceptibles de causer une intoxication alimentaire et ne le peuvent que pour autant que certaines conditions — de température, d'âge, de sensibilité du sujet, de synergie avec d'autres cultures — soient réalisées.

Si l'on se réfère à Hartman et *al.* (1965), Niven (1963) et Deibel (1964), on peut dire que l'on ne dispose encore d'aucune preuve définitive pour accuser les entérocoques d'être des agents d'intoxication alimentaire.

Mossel (1968) pose que la gastro-entérite et certaines autres maladies peuvent être occasionnées par la consommation d'aliments où des bactéries se sont fortement multipliées. Les bactéries qui provoquent l'intoxication n'appartenant pas aux catégories pathogènes typiques, ces empoisonnements sont qualifiés d'intoxications alimentaires non-spécifiques. L'auteur pense que les denrées alimentaires sont souvent cause de maladies de ce genre. Il se fait aussi que l'analyse de l'aliment impliqué dans un empoisonnement ne permet souvent pas d'y déceler la présence d'un des pathogènes classiques. Le nombre de germes présents dans cet aliment est, en revanche, généralement supérieur à 10^6 au g.

Mossel (1968) pense que les bactéries capables de décarboxyler l'histidine, la tyrosine et la phénylalanine méritent un renouveau d'attention en bactériologie des denrées alimentaires. Lorsqu'elles sont présentes dans la nourriture, l'histamine, la tyramine et la phényléthylamine sont désaminées par les monoamine-oxydases du système intestinal. Des recherches ont prouvé que la fonction de détoxification des monoamine-oxydases peut être fortement entravée par un certain nombre de facteurs. Asatoor et *al.* (1963), Natoff

(1964), Horwitz et *al.* (1964), Blackwell et Mabbitt (1965) et d'autres chercheurs encore ont signalé que certains médicaments inhibent la monoamine-oxydase : c'est le cas de la tranlylcypromine, de la phénelzine, du nialamide et de l'iproniazide. Geiger (1955) et Van Rheenen et Seehles (1966), entre autres, ont démontré aussi que l'histamine et la tyramine peuvent être absorbées à la faveur d'un trouble du système intestinal et donner lieu à une intoxication alimentaire.

Selon Bachrach et *al.* (1960), *S. faecalis* peut décarboxyler la phénylalanine, tandis que — d'après les données de Sharpe (1952) et de Shattock (1955) — tous les entérocoques peuvent décarboxyler la tyrosine.

Mossel (1968) constate que l'on commence à comprendre pourquoi tant de rapports se contredisent quant à l'aptitude ou à l'inaptitude des streptocoques D à provoquer des intoxications alimentaires. Les entérocoques peuvent former dans les aliments des amines biologiquement actives. Celles-ci sont normalement inactivées dans l'organisme, mais il peut se présenter des circonstances où la désamination n'est que partielle et résulte donc en une intoxication alimentaire par streptocoques D. Dans ce contexte, le fromage pourrait donner lieu à des intoxications alimentaires par streptocoques D. Les importantes quantités de tyrosine et de phénylalanine qui se forment pendant sa maturation peuvent être décarboxylées par les décarboxylases, enzymes qui proviennent, entre autres, d'entérocoques.

Enfin, on peut admettre qu'il existe une présomption que les streptocoques D peuvent être cause d'intoxications alimentaires non-spécifiques.

IV. — LA DETERMINATION DES STREPTOCOQUES D DU LAIT CRU DANS LE CONTEXTE DU SYSTEME DE DETERMINATION DE LA QUALITE

On pourrait poser avec Mossel (1968) que, dans un certain nombre de circonstances spéciales, les entérocoques peuvent provoquer des intoxications alimentaires parce qu'ils sont en mesure de décarboxyler la tyrosine et la phénylalanine. Cet auteur fait toutefois remarquer que certains types de *Proteus*, d'*Escherichia coli*, de *Pseudomonas* et de *Clostridium* sont aussi en mesure de décarboxyler les mêmes substances. Si une intoxication alimentaire non-spécifique par streptocoques D est uniquement imputable à la détoxification insuffisante des amines constituées et que l'on se propose de vérifier leur présence, on devrait — à considérer strictement les choses — procéder au même contrôle pour *Proteus*, *Pseudomonas*, *E. coli*, etc. Mossel et Grün (1971) imposent entre autres les normes suivantes pour le lait cru destiné à la préparation de lait U.H.T. pour l'alimen-

tation des bébés : bâtonnets Gram-négatifs < 5 000 au ml et streptocoques D < 500 au ml.

La thermo-résistance des streptocoques D plaide en faveur du contrôle spécifique de leur nombre dans le lait cru. Les streptocoques D présents dans le lait peuvent survivre à la pasteurisation, mais non à une stérilisation usuelle ni à un traitement à U.H.T. L'effet destructeur de la pasteurisation dépend, entre autres, de la culture même, de l'âge, du milieu de réchauffement, du pH, du rapport température-durée, etc. On trouve des données à ce sujet chez White (1953) et chez Shannon et *al.* (1970). Tolle et *al.* (1971) ont identifié aussi bien des entérocoques que *S. bovis* dans du lait pasteurisé, tandis que Shannon et *al.* (1970) ont pu démontrer que d'une population de 100 entérocoques au ml de lait écrémé, respectivement 55,2, 46,4 et 32,5 p. 100 survivaient 16 s à un échauffement à 71,7° C, 76,6° C et 82,2° C.

Des recherches (Waes, 1972) ont établi qu'il existe une corrélation pas très élevée, mais très significative de 0,522 entre le nombre de germes et le nombre de streptocoques D du lait réfrigéré. Puisqu'il existe une corrélation positive, on parviendra à la longue, en appliquant des normes suffisamment sévères lors de l'appréciation du nombre de germes, à réduire le nombre de streptocoques D en payant un prix intéressant pour le lait.

La question d'une détermination additionnelle à celle du nombre de germes ne se pose pas pour le moment. Avec le nombre de germes on peut faire encore un bon bout de chemin vers l'amélioration de la qualité. Une détermination supplémentaire n'aura de sens que si tous les échantillons de lait ont un nombre de germes $\leq$ 50 000 au ml. Johns et *al.* (1964) signalent que dans un nombre important de fermes où les conditions de production étaient insuffisantes, le lait avait un nombre de germes $\leq$ 25 000 et même $\leq$ 10 000 au ml. Ces auteurs précisent que l'« insuffisance » ne vise pas, dans les cas en cause, un état de saleté des animaux et des étables.

Un nombre de germes $\leq$ 50 000 au ml est très facile à obtenir dans le cas du lait réfrigéré. Si la méthode de dénombrement des germes était une technique plus précise, des valeurs $\leq$ 25 000 ou $\leq$ 10 000 seraient plus indiquées. Si un test bactériologique supplémentaire vient s'ajouter à la détermination du nombre de germes, ce test doit être choisi de façon, que la corrélation entre son résultat et le nombre de germes soit aussi faible que possible. On peut se demander si la détermination de la teneur en coliformes ou du nombre de streptocoques D est indiquée dans ces conditions.

Des recherches ont été faites sur 125 échantillons de lait réfrigéré à $\leq$ 100 000 germes au ml. On a déterminé le nombre de germes, le nombre de streptocoques D et la teneur en coliformes. Les méthodes mises en œuvre ont été décrites précédemment (Waes, 1972).

Pour tous les échantillons à nombre de germes $\leq 25\,000$, $\leq 50\,000$ et $\leq 100\,000$ au ml, on a calculé les coefficients de corrélation - nombre de streptocoques D - nombre de germes, nombre de streptocoques D - teneur en coliformes et nombre de germes - teneur en coliformes pour l'été, pour l'hiver et pour l'année. Les résultats figurent au tableau 1. On a appliqué les méthodes statistiques de Snedecor et Cochran (1967) et vérifié statistiquement par la méthode du χ^2 calculé, si les coefficients de corrélation pour les périodes d'été et d'hiver appartiennent au même univers. C'est pourquoi le tableau reproduit aussi les valeurs χ^2 calculées et les valeurs P correspondantes. Il ressort des valeurs P qu'il n'y a pas de différence significative.

Il ressort des données de ce tableau que, pour les échantillons de lait à nombre de germes $\leq 50\,000$ au ml, on a trouvé des coefficients de corrélation très significatifs entre les streptocoques D et le nombre de germes pour l'année (0,393), mais non entre le nombre de germes et la teneur en coliformes. Quoique le rapport streptocoques D - nombre de germes ne fut pas très élevé, il semblera tout de même indiqué, à l'avenir et en se basant sur la faible corrélation nombre de germes - teneurs en coliformes, d'utiliser comme indice complémentaire de qualité la teneur en coliformes, et non le nombre de streptocoques D, quand une partie importante du lait réfrigéré présentera un faible nombre de germes ($\leq 50\,000$ au ml). Cette détermination semble aussi indiquée du fait que la méthode est moins compliquée (Waes, 1972).

V. — CONCLUSION

La détermination des streptocoques D dans le contexte du système, actuel et futur, de détermination et de paiement de la qualité, n'est pas nécessaire.

Résumé

Attendu qu'il existe une corrélation positive, quoique pas très élevée, entre le nombre de streptocoques D et le nombre de germes du lait réfrigéré ($r = 0,522$), on parviendra à la longue à améliorer la qualité du lait et à réduire le nombre de streptocoques D si on applique pour la détermination du nombre de germes des normes suffisamment sévères.

Dans un système futur de détermination de la qualité, un test additionnel à celui du nombre de germes n'aura de sens que si pratiquement tous les échantillons de lait ont un nombre de germes $\leq 50\,000$ au ml. En présence d'un tel lait, il est plus sensé de déterminer la teneur en coliformes que le nombre de streptocoques D.

TABLEAU 1. — Lait réfrigéré

Coefficients de corrélation entre streptocoques D, nombre de germes et teneur en coliformes pour des échantillons à nombre de germes $\leq 25\ 000$, $\leq 50\ 000$ ou $\leq 100\ 000$ au ml

		Eté		Hiver		Année			
		Nombre de paires	r	Nombre de paires	r	Nombre de paires	r	χ^2	P
Nombre de germes $\leq 25\ 000$	Streptocoques D - nombre de germes	24	0,349	20	0,250	44	0,305	0,112	0,793
	Streptocoques D - teneur en coliformes	24	0,361	20	0,042	44	0,224	1,061	0,304
	Nombre de germes - teneur en coliformes	24	0,366	20	-0,227	44	0,109	3,553	0,063
Nombre de germes $\leq 50\ 000$	Streptocoques D - nombre de germes	40	0,387*	38	0,399*	78	0,393**	0,004	0,950
	Streptocoques D - teneur en coliformes	40	0,220	38	0,123	78	0,173	0,180	0,679
	Nombre de germes - teneur en coliformes	40	0,362*	38	0,005	78	0,194	2,516	0,118
Nombre de germes $\leq 100\ 000$	Streptocoques D - nombre de germes	61	0,408**	64	0,378**	125	0,394**	0,039	0,852
	Streptocoques D - teneur en coliformes	61	0,098	64	-0,047	125	0,024	0,625	0,445
	Nombre de germes - teneur en coliformes	61	0,300*	64	0,112	125	0,206*	1,166	0,284

Légende : ** : très significatif

* : significatif

Summary

As there is a positive correlation, even though it isn't very high, between the number of D streptococci and bacterial count in deep-cooled milk ($r = 0.522$) it will be possible to succeed in time, by applying sufficiently strict standards in the bacterial count determination, in improving the quality of the milk and suppressing the number of D streptococci.

In a future quality-determining system a supplementary test in addition to the bacterial count will only be of use if the majority of the milk has a bacterial count of $\leq 50,000$ per ml. In milk like this there is more sense in determining the coli content than the number of D streptococci.

Bibliographie

- ASATOOR (A. M.), LEVI (A. J.) and MINNE (M. D.) (1963). — Tranylcypromine and cheese. *Lancet*, II, 733.
- BACHRACH (U.), STERK (V. V.), GERY (I.) and ROZANSKY (R.) (1960). — Volatile amines in stools of infants suffering from gastroenteritis. *Am. J. Hyg.*, 72, 1.
- BLACKWELL (B.) and MABBITT (L. A.) (1965). — Tyramine in cheese related to hypertensive crises after monoamine oxidase inhibition. *Lancet*, I, 938.
- BUTTIAUX (R.) (1959). — The value of the association *Escherichiae* - Groupe D streptococci in the diagnosis of contamination in foods. *J. appl. Bact.*, 22, 153.
- CAREY (W. E.), DACK (G. M.) et MYERS (E.) (1931). — An institutional out break of food poisoning possibly due to a streptococcus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 29, 214.
- CAREY (W. E.), DACK (G. M.) and DAVISON (E.) (1938). — Alpha type streptococci in food poisoning. *J. infect. Dis.*, 62, 88.
- DEIBEL (R. H.) (1964). — Group D streptococci. *Bact. Rev.*, 28, 330.
- GEIGER (E.) (1955). — Role of histamine in poisoning with spoiled fish. *Science*, N.Y., 121, 885.
- HARTMAN (P. A.), REINBOLD (G. W.) and SARASWAT (D. S.) (1965). — Indicator organisms. A review II. The role of enterococci in food poisoning. *J. Milk Fd Technol.*, 28, 344.
- HOBBS (B. C.), SMITH (M. E.), OAKLEY (C. L.), WAARACK (H. G.), and CRUICKSHANK, (J. C.) (1953). — Clostridium welchi food poisoning. *J. Hyg., Camb.*, 51, 74.
- HORWITZ (D.), LOVENBERG (W.), ENGELMAN (K.) and SJOERDSMA (A.) (1964). — Monoamine oxidase inhibitors, tyramine and cheese. *J. Am. med. Ass.*, 188, 1108.
- JOHNS (C. K.), CLEGG (L. F. L.), LEGGATT (A. G.) and NESBITT (J. M.) (1964). — Relation between milk production conditions and results of bacteriological tests with and without preliminary incubation of samples. *J. Milk Fd Technol.*, 27, 326.
- MOORE (B.) (1955). — Streptococci and food poisoning. *J. appl. Bact.*, 18, 606.
- MOSSEL (D. A. A.) (1967). — Ecological principles and methodological aspects of the examination of foods and feeds for indicator organisms. *J. of A.O.A.C.*, 50, 91.

- MOSSEL (D. A. A.) (1968). — Bacterial toxins of uncertain oral pathogenicity. In : *The safety of foods*, Avi. Publ. Co, Inc. Westport (U.S.A.).
- MOSSEL (D. A. A.) und GRÜN (L.) (1971). — Hygienische Anforderungen an Säuglingsnahrung. *Zentbl. Bakt. Hyg., I., Abt. Orig., B.*, 155, 103.
- MUNDT (J. O.) (1963). — Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl. Microbiol.*, 11, 141.
- MUNDT (J. O.), JOHNSON (A. H.) and KHATCHIKIAN (R.) (1958). — Incidence and nature of enterococci on plant materials. *Fd Res.*, 23, 186.
- NATOFF (L. L.) (1964). — Cheese and monoamine oxidase inhibitors. Interaction in anaesthetised cats. *Lancet*, I, 532.
- NIVEN (C. F.) Jr. (1963). — Microbial indexes of food quality : Fecal streptococci. In : *Microbiological quality of foods*. Academic Press, New-York (U.S.A.).
- OSLER (A. G.), BUCHBINDER (L.) and STEFFEN (G. I.) (1948). — Experimental enterococci food poisoning in man. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 67, 456.
- SARASWAT (D. S.), CLARK (W. S.) and REINBOLD (G. W.) (1963). — Selection of a medium for the isolation and enumeration of enterococci in dairy products. *J. Milk Fd Technol.*, 26, 114.
- SHANNON (E. L.), REINBOLD (G. W.) and CLARK (W. S.) (1970). — Heat resistance of enterococci. *J. Milk Fd Technol.*, 33, 192.
- SHARPE (M. E.) (1952). — 'Group D streptococci in the faeces of healthy infants and of infants with neonatal diarrhoea. *J. Hyg.*, 50, 209.
- SHATTOCK (P. M. F.) (1955). — The identification and classification of *S. faecalis* and some associated streptococci. *Anals Inst. Pasteur, Lille*, 7, 95.
- SNEDECOR (G. W.) and COCHRAN (W. G.) (1967). — Statistical Methods. *The Iowa State College Pres. Ames.* (U.S.A.).
- THATCHER (F. S.) and CLARK (D. S.) (1968). — Microorganisms in foods. *University of Toronto, Press*, Toronto (Canada).
- TOLLE (A.), HEESCHEN (W.), REICHMUTH (J.) und KIND (H.) (1971). — Trinkmilch in der Bundesrepublik Deutschland : Eine Untersuchung zum bakteriologischen, biochemischen und rückstandsanalytischen Status. *Kieler milchw. ForschBer.*, 23, 339.
- VAN RHEENEN (D. L.) and SEEHLES (L.) (1966). — Quantitative determination of urinary indoxyl sulfate (indican) and the total content of basic compounds in the faeces of cattle in relation to hypomagnesaemia. *Nature*, 212, 1269.
- WAES (G.) (1972). — 'Studie van de D streptococcen in rauwe melk. *Doctoraatstesis, Universiteit van Gent*.
- WHITE (H. R.) (1953). — The heat resistance of *S. faecalis*. *J. gen. Microbiol.*, 8, 27.
-