

pasteurisé, surtout si on le maintient à une température au-dessous de 12° C., parce que les bactéries ci-dessus mettent dans ces conditions un temps fort long à se développer.

4° A ces avantages, on peut ajouter en ce qui concerne la machine de Nielsen, le fait que le chauffage et le refroidissement se font à l'abri de l'air. Le lait contient des vitamines qui sont endommagées, non seulement par le chauffage, mais surtout pendant le refroidissement, par le contact de l'oxygène de l'air avec le lait. FREDERICIA (1) a démontré cet avantage par des essais d'après lesquels le lait nielsenisé a conservé les vitamines dans les proportions des 3/4.

Ces observations montrent en définitive que le stérilisateur de Nielsen donne par le chauffage à 128-130° C. un lait parfaitement stérile, à condition de stériliser convenablement les cylindres réfrigérants pendant le nettoyage.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LA PASTEURISATION A BASSE TEMPÉRATURE

A) *Facteurs qui influent sur la destruction
par la chaleur du bacille tuberculeux dans le lait* (1);

B) *Résistance à la chaleur du bacille tuberculeux dans le lait* (2).

par le D^r K. KATRAN DJIEFF

Chef de service à l'Institut vétérinaire bactériologique de Sofia.

Les premières recherches de YERSIN (3) en 1888, puis de GRANCHER et LEDOUX-LEBARD (4) en 1892 sur l'influence de la chaleur sur le bacille tuberculeux cultivé dans des milieux de bouillon glycérimé sont considérées comme classiques dans l'étude de l'action de la chaleur sur la destruction ou l'atténuation du bacille de Koch. Ces auteurs ont constaté que la virulence des bacilles diminue lorsqu'on les porte à 60° C. pendant 5 minutes; une température de 70° C. pendant 5 minutes détruit toute virulence et toute vitalité.

Ces considérations ont ouvert la voie à de nombreuses applications pratiques. De nombreux travaux ont suivi dont quelques-uns doivent retenir l'attention.

FORSTER (5) vient de démontrer que le lait tuberculeux, ou le lait infecté artificiellement, chauffé à 55° C. pendant 4 heures, à 60° C. pendant une heure, à 65° C. pendant 15 minutes, etc., perd sa virulence. D'un autre côté, MORGENROTH (6) prétend avoir constaté que le chauffage d'un lait tuberculeux à 70° C. pendant 30 minutes détruit toute virulence. LEVY et BRUNS (7) se sont servis de lait additionné de bacilles tuberculeux très virulents; ils le portent à 65° C. pendant 15 ou 25

(1) FREDERICIA. — Physiological papers, Aarhus, 1926.

minutes au bain-marie. Ce lait étant inoculé à des animaux d'expériences (cobayes), aucun ne prit la tuberculose.

A la même époque, cependant, parurent des travaux en contradiction avec les faits précédents. Ainsi BECK (8) a pu constater que le lait tuberculeux chauffé à 80° C. pendant 30 minutes ne perd pas sa virulence pour le cobaye. LYDIA RABINOVITCH a démontré que les bacilles tuberculeux contenus dans de la crème n'étaient pas détruits par une température de 87° C. maintenue pendant 30 minutes. BARTEL et STENSTRÖM (9) d'une part, et Van DE SLUIS (10), d'autre part, croient que pour détruire la virulence du lait tuberculeux, une température de 80° C. agissant pendant une heure est indispensable.

Au cours de ces dernières années, d'autres recherches faites par plusieurs auteurs tendent à démontrer que le bacille de Koch est détruit par un chauffage à 63° C. pendant 30 minutes dans *le lait* : (ORLA JENSEN (12), CAMPBELL BROWN (13), CAMERON MACAULAY (14), WHITE (15), GAGLIARDI (16), dans ses *sous-produits* : *crème, beurre, fromages* (VAILLANT (17)), dans *le sérum* et dans *la caséine* (P. ROSSI (18)). Cependant OPPENHEIMER, de JONG (19), ANDERSEN (2), MEANWELL (21), etc... et d'autres auteurs inclinent à croire que cette température est insuffisante pour enlever la virulence au bacille tuberculeux (a).

Dans toutes ces recherches, il n'est tenu compte que d'un seul facteur : la température agissant durant un temps déterminé. En présence de ces résultats contradictoires, on ne peut donc compter d'une façon absolue sur la pasteurisation en ce qui concerne le lait tuberculeux. Il était intéressant d'envisager, en les étudiant minutieusement, d'autres facteurs secondaires en présence desquels s'effectue cette pasteurisation et qui influent sans doute l'action de la chaleur. Ce sont peut-être ces facteurs qui sont la cause des résultats discordants et contradictoires précédemment obtenus.

Les différences de conditions du milieu employé ne peuvent être sans influence sur le résultat final. En premier lieu, la réaction du lait modifie notablement la résistance de plusieurs germes pathogènes, et en particulier celle de la tuberculose. En effet, on sait depuis les recherches de PASTEUR et de DUCLAUX (22) que dans un lait alcalin la résistance du bacille tuberculeux est beaucoup plus grande que dans un lait acide. Ainsi, une même espèce peut, suivant les conditions biochimiques dans lesquelles elle se trouve placée, résister plus ou moins à l'influence du chauffage à une température donnée.

ALLA (23) pour la première fois en 1908 a montré qu'un lait provenant

(a) Lors de nos recherches, nous ne connaissions pas le travail de ZELLER, WEDEMANN, LANGE et GILDEMEI (11) qui a paru ultérieurement.

d'une vache atteinte de tuberculose généralisée était modifié dans sa composition chimique.

D'après les recherches de STORCH (24) nous savons que le lait qui contient des bacilles tuberculeux a généralement une réaction alcaline que la matière grasse et le lactose y sont en plus faible quantité que dans le lait normal, et que même dans certains cas, cette diminution aboutit à leur disparition presque complète. Cette diminution de l'acidité est très importante à considérer.

D'autre part, nous remarquons que les auteurs se servent de lait prélevé sur une vache tuberculeuse en se contentant seulement de constater que ce lait est « riche » en bacilles. Non seulement ils ne tiennent pas compte de toutes les conditions biochimiques dans lesquelles se trouve ce lait malade, mais ils ne disent même pas quelle quantité de bacilles ils entendent par ce mot « riche », et à quel criterium on peut se rapporter pour comparer les résultats enregistrés avec différents laits expérimentés sur les différents animaux. Il est bien certain que lorsqu'on étudie expérimentalement la virulence du bacille de Koch, il est indispensable de préciser dans chaque expérience la quantité de bacilles employés. Dans ce cas seulement, on peut se faire une idée réelle de l'atténuation, de la raréfaction ou de la destruction des bacilles.

Certains auteurs ont employé du lait artificiellement infecté avec des bacilles tuberculeux sans les mesurer ; d'autres les ont mesurés, mais en ont pris une quantité beaucoup plus faible que celle reconnue classique dans l'infection expérimentale du cobaye.

Un autre point attire tout spécialement notre attention : c'est la différence qu'il y a lieu d'observer en ce qui concerne la durée d'incubation. Ainsi, on voit dans beaucoup de cas les animaux en expérience tués dans le même temps que le témoin, c'est-à-dire le premier ou deuxième mois après l'inoculation. On sait en effet qu'il faut ce temps au bacille pleinement virulent pour provoquer la tuberculose chez le cobaye, mais on peut se demander si les bacilles ayant subi l'influence de la chaleur, ou de tout autre facteur, étant par suite atténués ou raréfiés, mais non détruits complètement, ne seraient pas susceptibles de provoquer une tuberculose très limitée et très ralentie dans son évolution. Le fait est bien connu que la rapidité avec laquelle évolue et se généralise une tuberculose expérimentale chez le cobaye est très variable selon la quantité de bacilles injectés et selon leur degré de virulence. Ces considérations peuvent expliquer les divergences et les contradictions relevées dans les résultats précédemment acquis. Ce sont elles qui nous ont amenés à entreprendre de nouvelles recherches sur les conseils et sous la direction de M. le Professeur VALLÉE.

Nos recherches ont pour but de mesurer, à côté de l'influence du facteur principal : la chaleur, celle d'autres facteurs susceptibles d'intervenir dans la raréfaction ou la destruction du bacille tuberculeux. C'est

ainsi que dans les expériences que nous rapportons plus loin, nous avons, pour chaque température d'épreuve, fait varier la quantité de matière grasse, la proportion de saccharose ajoutée, — ceci étant obtenu par évaporation du lait dans le vide, — et la concentration en ions H des milieux étudiés.

Nous avons été en effet amené à supposer que le saccharose se comporte comme un antiseptique.

D'autre part, nous avons déjà dit que le lait qui contient des bacilles est de réaction alcaline, et nous pensons qu'en augmentant l'acidité du lait, on place les bacilles dans de mauvaises conditions de vitalité et de développement.

En mettant à profit ces facteurs : chaleur, teneur en matière grasse et en saccharose, et acidité, nous pensons que la destruction du bacille de Koch sera plus facilement réalisable.

Il nous semble plus commode d'employer le lait de vache fraîchement recueilli et placé dans les conditions des essais qui ont été précisées plus haut. Cette étude nous permettra même d'envisager la pasteurisation du lait concentré et sucré qui entre pour une si grande part dans l'alimen-

tation de l'enfance, et sur laquelle nous n'avons aucun document.

Pour nos recherches, nous avons eu recours à un appareil (Fig. I) spé-

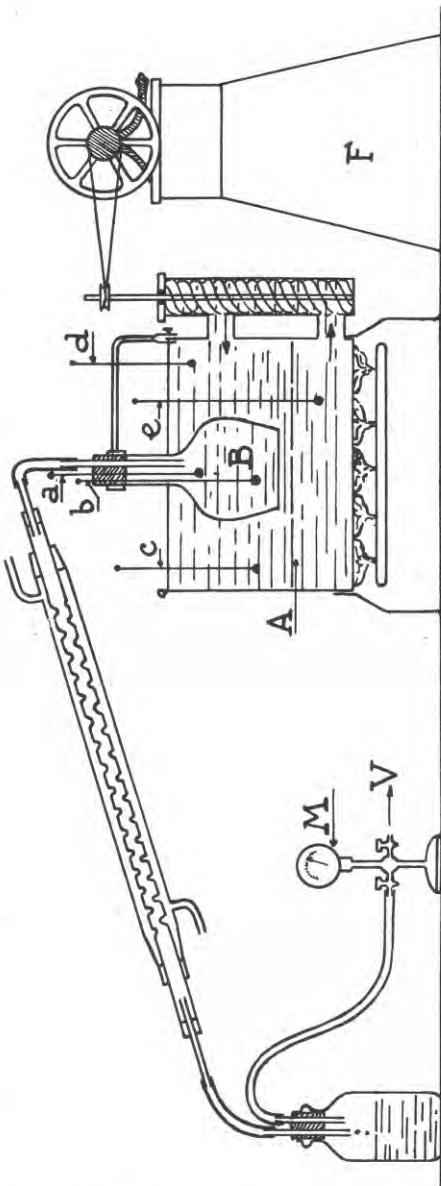


Figure 1.

cialement construit pour cet usage dans lequel la concentration se fait par évaporation dans le vide (pression réduite à 16 mm. de mercure), soit à la température de 58° C., soit à celle de 60-63° C. L'appareil est d'une construction simple : il se compose d'un bain-marie A à un volume de 30 litres dans lequel plonge un récipient B de 5 litres disposé à égale distance des parois et du fond. Le récipient est en verre, et non en cuivre comme dans l'industrie ; cette particularité évite la formation d'une proportion appréciable de sucre interverti qui prendrait naissance par l'action de la chaleur sur le saccharose, action favorisée par l'acidité du lait en présence du cuivre (LINET) (25). Le ballon est soutenu par une potence à pivot qui permet de l'enlever facilement du bain-marie pour le plonger dans un récipient d'eau froide. Ce ballon est en communication avec un serpentín qui plonge par son extrémité inférieure dans un flacon gradué ; la graduation permet d'évaluer la quantité de lait évaporé. De ce flacon part une tubulure en liaison avec une pompe à vide V. Tous les raccords de l'appareil sont faits en verre, et non en caoutchouc ou en gomme, ce qui a pour but d'éviter la formation de substances chimiques pendant l'évaporation. La température du bain-marie est contrôlée par trois thermomètres c, d et e, plongeant dans l'eau à différentes hauteurs. Un dispositif spécial fait continuellement circuler l'eau du bain-marie, de façon à obtenir une température uniforme pendant toute la durée de l'opération.

Dans nos expériences, nous avons tenu compte du phénomène de FRANKLIN sur l'ébullition des liquides sous faible pression ; pour maintenir le lait à la température de 58-60-63° C., nous avons dû élever progressivement la température du bain-marie au fur et à mesure de l'évaporation. La température du lait a été contrôlée pendant la durée des expériences par deux thermomètres a et b dont l'un est en contact immédiat avec la paroi et l'autre plonge dans le lait. Les deux thermomètres marquaient toujours la même température.

Le lait qui a servi à une première série d'expériences était un lait frais de vache contenant 3,5 p. 100 de graisse, avec un pH de 6,7 ; il était ensuite additionné de 15 p. 100 de sucre, puis concentré aux 3/5 de son volume par chauffage à 58° ou 60° à 63° pendant 30 minutes. Une deuxième série d'expériences a porté sur le même lait frais de même pH (6,7), dégraissé, puis sucré et concentré dans les mêmes conditions. Dans une troisième série, le même lait était, au préalable, ramené par addition d'acide lactique à un pH de 6,3. Enfin, dans une dernière expérience, le pH a été ajusté à 6. Nous devons ajouter que la concentration en ions H⁺ des milieux employés était évaluée par la méthode électrométrique en remplaçant l'électrode d'hydrogène par l'électrode à la quinhydrone, qui a l'avantage de la rapidité et de la plus grande précision. Cette méthode était d'autant plus indiquée que nous n'utilisions que des laits ayant un pH inférieur à 7. Il ne nous a pas été possible de travailler avec un lait de pH inférieur à 6, car nous avons pu constater que, lorsque

le lait atteint ou dépasse une telle concentration en ions H^+ ($pH = 4,8$ à 5), il coagule à une température de 60° - 63° , surtout en présence d'une quantité déterminée de sucre.

Ces différentes sortes de laits sont artificiellement infectées avec des doses rigoureusement pesées de bacilles tuberculeux type bovin VALLÉE, provenant d'une culture sur pomme de terre glycinée âgée de 20 jours. On sait que quelques unités seulement de ce bacille suffisent pour tuer un cobaye. Les microbes pesés étaient triturés pendant une demi-heure au mortier d'agate et additionnés goutte à goutte d'eau physiologique jusqu'à obtention d'une émulsion parfaitement homogène. Le mélange avec le lait était fait dans de telles proportions que 1 cc. de lait ainsi infecté renfermait un centième de mgr. de bacilles. Comme dose moyenne d'épreuve dans tous nos essais chez le cobaye, nous avons employé celle de un centième de mgr. de bacilles, correspondant à 1cc. de lait, ce qui équivaut à la dose reconnue comme capable de provoquer à coup sûr une tuberculose classique chez le cobaye. Nous ajoutons au lait les bacilles tuberculeux de deux façons : soit au lait condensé au préalable et ensuite réchauffé, soit au lait frais, puis écrémé ou non, qui n'est chauffé et condensé qu'en dernier lieu.

Les différentes séries de laits sont chauffées et en même temps concentrées au bain-marie, soit à 58° , soit à 60° et 63° pendant 30 minutes, la pompe à vide maintenant la pression à l'intérieur du récipient à 16 cm. de Hg. La vive ébullition ainsi provoquée empêche la formation d'une pellicule qui serait une protection éventuelle pour les bacilles (a).

De chaque série de lait ainsi chauffé, refroidi, convenablement dilué pour le ramener à son premier volume, nous prélevons 1 cc. qui est injecté au cobaye sous la peau dans la région inguinale. Nous injectons, en même temps, à des témoins, 1 cc. du même lait non chauffé.

Nous estimons que nos procédés de recherches ont été suffisamment expliqués ; il ne nous reste donc qu'à exposer les résultats définitifs recueillis de 2, 6 et 7 mois... après l'inoculation de nos animaux d'expérience. Nous avons suivi ceux-ci pendant ce long délai parce que nous avons pris en considération la grande variabilité de l'évolution du processus tuberculeux chez le cobaye inoculé, variabilité qui dépend strictement de la quantité des bacilles introduits et de leur degré de virulence.

Tous les témoins, morts ou sacrifiés dans un temps variable de 2 à 3 mois, montrent à l'autopsie des lésions classiques de tuberculose, étendues jusqu'aux viscères abdominaux.

Les laits tuberculeux à différents pH (6-6,3-6,7) dégraissés ou non, sucrés et condensés à une température de 58° pendant 30 minutes, inoculés chez le cobaye par voie sous-cutanée avec une dose reconnue classique dans l'infection expérimentale de cet animal, provoquent, dans

(a) En 1899, Th. SMITH conclut à l'innocuité d'un lait bacillifère porté pendant 15 minutes à 60° « lorsque par agitation la formation de la croûte de lait est empêchée. »

une période de temps évoluant entre 2, 3 et 7 mois, une tuberculose étendue jusqu'aux viscères abdominaux. Ces lésions tuberculeuses se manifestent par de nombreux foyers caséeux au point d'inoculation, avec hypertrophie de la rate, bosselée de multiples tubercules, sans lésions apparentes dans les poumons. Nous devons ajouter que, chez le cobaye inoculé avec du lait de $pH=6$, dégraissé, après addition des bacilles, la tuberculose est constatée après un délai plus long que dans les autres cas.

Si les cobayes sont inoculés avec des laits infectés de $pH=6,7$ (normal), 6,3-6, sucrés et condensés par chauffage à 60° - 63° pendant 30 minutes, aucun symptôme clinique ne traduit l'évolution infectieuse après trois mois ; mais, après six mois d'observation, nous avons constaté que certains d'entre eux étaient atteints de tuberculose. Ainsi, sur une série de cobayes inoculés avec un lait de $pH=6,7$ (normal) et sacrifiés 6 à 7 mois après l'inoculation, nous avons vu que trois portaient des lésions tuberculeuses sur la rate et les ganglions lombaires ; mais, dans ce cas, le processus reste très limité et on ne trouve sur la rate que deux ou trois tubercules, les autres organes restent indemnes de tuberculose. Les cobayes inoculés avec les mêmes laits amenés à un $pH=6,3$ n'ont présenté aucune lésion, sauf dans un cas où nous avons constaté la tuberculose de la rate et des ganglions de la région où l'inoculation avait été pratiquée. L'extension des lésions était très limitée. Une expérience portant sur une série de cobayes inoculés avec les mêmes laits, mais de $pH=6$, nous a démontré qu'ils restaient exempts de tuberculose, même après sept mois d'inoculation. Les mêmes laits chauffés pendant 60 minutes à la température de 60° - 63° ne provoquent, après le même temps, aucune lésion chez les animaux d'expérience.

De ces faits, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

a) La température de 58° agissant durant 30 minutes sur des laits tuberculeux sucrés et condensés, quelle que soit l'acidité du lait (6,7-6,3-6) ne suffit pas pour détruire la virulence du bacille de Koch au point de rendre ces laits inoffensifs pour le cobaye inoculé ;

b) La température de 60° - 63° agissant 30 minutes sur les mêmes laits, mais de $pH=6,7$ (normal) semble, d'après nos recherches, insuffisante à rendre ceux-ci inoffensifs pour le cobaye. Toutefois, dans ce cas, les bacilles modifiés et raréfiés, semble-t-il, ne sont plus capables que de provoquer une tuberculose très limitée et ralentie dans son évolution ;

c) Le degré d'acidité ($pH=6$), associé à l'influence des substances chimiques qui prennent naissance par le chauffage et la présence du saccharose, nous a paru avoir une grande part dans la destruction du bacille de Koch dans le lait sucré et condensé par chauffage à 60° - 63° pendant 30 minutes.

(Laboratoire national de recherches d'Alfort.)

Nous remercions ici M. P. Rinjard, chef de laboratoire, des conseils précieux qu'il nous a fourni dans l'exécution de nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. KATRANDEJEFF, *Comptes Rendus Société de Biologie*. 1928, Tome XCIX, p. 1478.
- [2] K. KATRANDEJEFF, *Comptes Rendus Société de Biologie*. 1929, Tome C, p. 26.
- [3] YERSIN, De l'action de quelques antiseptiques et de la chaleur sur le bacille de la tuberculose. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1888.
- [4] GRANCHER et LEDOUX-LEBARD, Action de la chaleur sur la fertilité et la virulence du bacille tuberculeux. *Arch. de méd. exper.*, 1892.
- [5] FORSTER, *Centralbl. für Bakt.* 1909.
- [6] MORGENROTH, *Hygienische Rundschau*, 1900.
- [7] LÉVY et BRUNS, *Hygienische Rundschau*, 1901.
- [8] BECK, *Deutsche Vierteljahr für öff. Gesundheitspflege*, 1900.
- [9] BARTEL et STENSTRÖM, *Centralbl. für Bakt.* 1901.
- [10] VAN DER SLUIS, *Centralbl. für Bakt.* 1909.
- [11] ZELLER, WEDEMANN, LANGE et GILDEMEI, Sulla cosiddetta pasteurizzazione a bassa temperatura, con particolare riguardo alla efficacia della sua azione contro i germi patogeni. Referat dans *La Clinica Veterinaria*, 1929.
- [12] ORLA JENSEN, La pasteurisation du lait. *Le Lait*, 1921, 1924 et *Rapport au Congrès international* à Londres, 1928.
- [13] CAMPBELL BROWN, A critical investigation into the thermal death point of the tubercle bacillus in milk. *The Lancet*, 1923.
- [14] CAMERON-MACAULAY, An investigation in to pasteurisation as means of destroying tubercle bacilli in milk. *Public Health*, 1925.
- [15] WHITE, L'effet de la pasteurisation sur le pouvoir infectant du lait de vache tuberculeuse. *Le Lait*, 1927, p. 581.
- [16] GAGLIARDI, Azione della pastorizzazione bassa o discontinua del latte a 63°, sulla resistenza del bacillo della tuberculosi. *La Clinica Veterinaria*, 1925.
- [17] VAILLANT, La pasteurisation à basse température. *Le Lait*, 1924.
- [18] ROSSI P., Les sous-produits du lait tuberculeux. *Le Lait*, 1928.
- [19] OPPENHEIMER et DE JONG, (Mentionné dans la microbiologie agraria et tecnica de De Rossi).
- [20] ANDERSEN, On the behaviour of certain pathogenic, bacteria towards heating at 63° C. 30 min. *Maandekrift for Dyrlaeger*, 1924.
- [21] MEANWELL, An investigation in to the effect of pasteurisation on the bovine tubercle bacillus in naturally infected tuberclosed milk. *Journ. of Hygiene*, 1927.
- [22] DUCLAUX, *Traité de microbiologie*.
- [23] ALLA, Mentionné dans *Laiterie*, BORDAS et TOUPLAIN. 1913, chapitre : Lait tuberculeux.
- [24] STORCH, Mentionné dans « Les tuberculoses animales » de VALLÉE et PANISSET, 1920.
- [25] LINDET, Sur l'inversion du sucre. *Comptes Rendus Académie des Sciences*, 1904, p. 508.
- [26] NOCARD et LECLAINCHE, *Maladies microbiennes des animaux*, 1903.
- [27] CALMETTE, *L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux*, 1922 et 1928.