

servabilité du lait en assurant sa *stabilité*, en dépit même d'un ralentissement de l'acidification.

5. Alors il est permis de se poser une dernière question : si le programme d'amélioration de la production que nous venons d'esquisser et de réclamer (après tant d'autres...) venait à être pleinement réalisé, *le besoin d'une méthode nouvelle de conservation se ferait-il vraiment sentir ?* Sur des laits propres, la pasteurisation actuelle réussit parfaitement. Avec des laits propres la « tourne » n'est pas à redouter. Dans ces conditions la microlysation (« procédé qui permet d'éviter la tourne du lait pendant les grandes chaleurs ») serait-elle nécessaire ? Il est permis d'en douter. Ne se trouverait-on pas alors placé devant l'alternative si clairement exprimée par M. le Professeur LEMOIGNE à propos du procédé WISER (1) : « Ce procédé est parfois efficace quand il est inutile et toujours inefficace quand il pourrait devenir utile. »

Mais, reconnaissons-le, ce n'est là qu'une opinion personnelle. Nous n'avons sans doute pas le droit d'affirmer formellement que la microlysation serait inutile si les laits crus venaient à être produits dans un état de propreté tel qu'elle soit pleinement efficace. L'expérience industrielle, sur la vaste échelle qui serait nécessaire, n'a pas été faite et ne peut pas l'être en l'état actuel des choses.

Ce que nous pouvons en revanche déclarer, sans crainte malheureusement d'être démenti, c'est que la production du lait propre appartient encore au domaine des rêves.

Quand ce problème sera résolu (s'il l'est jamais) et à ce moment là seulement, on pourra se demander si la microlysation des laits de consommation en nature mérite d'être retenue comme méthode nouvelle de conservation.

Jusque là, sur les laits crus que nous connaissons, concluons sincèrement qu'elle est inefficace — donc inutile.

TECHNIQUE D'ISOLEMENT DES STAPHYLOCOQUES PATHOGENES. IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ENTÉROTOXIQUES (2)

par

RENÉ BUTTIAUX et RAYMONDE BROGNIART

On sait l'importance du rôle des staphylocoques entérottoxiques dans les intoxications alimentaires. Les auteurs Anglo-Saxons l'ont bien mis en évidence. Dans une série de communications nous en

(1) *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture*, 1945, p. 449.

(2) Communication présentée à la Société française de Microbiologie, Paris, avril 1947. In *Ann. Instit. Pasteur*, 1947, LXXIII, 830.

avons rapporté quelques cas [1, 2] survenus dans la région du Nord de la France.

L'isolement du staphylocoque est souvent difficile dans les produits alimentaires ou dans les selles des malades. Son développement sur les milieux de culture est entravé par l'abondance des germes saprophytes.

A la suite des travaux de KOCH [3], CHAPMAN a mis au point des milieux électifs qui permettent le développement facile du staphylocoque à l'exclusion presque complète des autres germes [4-5]. Tous sont basés sur la résistance des staphylocoques à des concentrations en CLNa de 75 gr. pour 1.000. Dans ces solutions fortement hypertoniques il est peu d'autres microbes qui soient encore capables de cultiver.

Nous utilisons fréquemment ces milieux avec le plus grand succès. Voici la technique de CHAPMAN et les modifications que nous y avons apportées.

I. Isolement des staphylocoques pathogènes

La recherche des staphylocoques pathogènes dans les aliments suspects ou dans les fèces se fait en trois temps.

1. *Enrichissement.* Nous portons une dilution très épaisse de selles (1 à 2 grammes dans 10 cm³ d'eau distillée) ou du produit alimentaire suspect finement broyé dans 10 cm³ d'eau distillée ou 10 cm³ du lait à étudier dans un grand tube à essai contenant 10 cm³ du milieu suivant :

	Grammes
Nutrient broth	16
Protéose-peptone n° 3	10
CLNa	150
Lactose	15
Bactoagar	1

que l'on dissout dans 1.000 cm³ d'eau distillée à pH 7. Le pH final doit être de 7,4. Après répartition du milieu, on stérilise à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

La concentration finale du milieu ensemencé est donc de 75gr. pour 1.000 de CLNa. On porte à l'étuve à 37° durant 36 heures. Dans ces conditions, le staphylocoque, même s'il est en très petite quantité dans le produit incriminé se développe très abondamment et pratiquement est le seul à se développer.

2. *Isolement.* Nous employons le milieu de Chapman mannite dont voici la formule :

	Grammes
Nutrient broth	8
Protéose-peptone n° 3	9
NaCl	75
Mannite	10
Bactoagar	15
Rouge de phénol	0,025

Dissoudre en chauffant dans 1.000 cm³ d'eau distillée à pH 7. Amener à pH 7,4. Répartir en gros tubes à essai (20 cm³ de milieu par tube). Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. Au moment de l'emploi couler en boîtes de Pétri.

Une goutte du milieu d'enrichissement est reportée sur une boîte de Pétri contenant le milieu hypertonique mannite. Elle y est étalée ; on porte à l'étuve à 37° durant 48 heures.

Les colonies de staphylocoque pathogène sont grosses et entourées d'une auréole jaunâtre due à la fermentation de la mannite, leur pigmentation propre est très nettement visible. Les staphylocoques supposés non pathogènes ne fermentant pas la mannite, fournissent de petites colonies rosées.

Sur ce milieu le staphylocoque se développe presque à l'état pur. Nous n'avons constaté de temps en temps que le développement de quelques bacilles diphtérimorphes ou de quelques rares bacilles anthracoides. Les bacilles Gram négatif n'y cultivent jamais. Pour la recherche des staphylocoques pathogènes dans les selles, il suffira souvent d'ensemencer directement sur le milieu de Chapman mannité coulé en boîte de Pétri, 5 à 6 gouttes d'une dilution épaisse des fèces en eau peptonée (1 à 2 gr. pour 10 cm³ d'eau peptonée) on obtiendra d'emblée une culture pratiquement pure de staphylocoque.

3. *Repiquage.* Les colonies de staphylocoques fermentant la mannite sont alors repiquées sur le milieu de Chapman suivant :

	Grammes
Nutrient broth	8
Protéose-peptone	9
NaCl	75
Bactoagar	15
Lactose	10

Dissoudre dans 1.000 cm³ d'eau distillée à pH 7. Amener à pH 7,4. Répartir et stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

Les boîtes sont portées à l'étuve à 37° pendant 24 ou 48 heures. Sur ce milieu les staphylocoques :

1° Ont une pigmentation intense qui s'accuse surtout lorsque

l'on abandonne la culture à la température du laboratoire durant 48 heures. Cette pigmentation est incomparablement supérieure à celle obtenue par culture sur les meilleurs milieux jusqu'à présent recommandés ;

2° Exaltent considérablement leur pouvoir coagulant sur le plasma. Certaines des colonies étudiées par nous et cultivées sur milieux ordinaires ne coagulaient le plasma sanguin qu'après 2 ou 3 heures d'étuve à 37°. Les mêmes colonies provenant du milieu de Chapman lactosé manifestaient leur pouvoir coagulant en 20 minutes ;

3° Ne présentent aucune tendance à la dissociation même après des repiquages fréquents et prolongés.

L'emploi de la technique que nous venons de décrire nous a permis d'isoler sur 38 selles d'enfants atteints de gastro-entérite, des staphylocoques pathogènes en très grande abondance dans 12 d'entre elles. De même nous étudions systématiquement à ce sujet tous les laits qui nous sont envoyés pour contrôle bactériologique. Dans bien des cas certains d'entre eux qui sont normaux quant aux tests bactériologiques courants contiennent de nombreux staphylocoques pathogènes.

II. Identification des staphylocoques entérotoxiques

Parmi les staphylocoques pathogènes il est nécessaire de préciser si certains d'entre eux possèdent des entérotoxines. On sait que ces entérotoxines absorbées par l'homme ou par le singe produisent 4 à 8 heures après leur absorption, des phénomènes caractéristiques marqués surtout par des vomissements et une diarrhée profuse.

DOLMAN [6] a montré que l'entérotoxine injectée dans le péritoine d'un jeune chat produit dans l'heure qui suit l'injection les mêmes symptômes que chez l'homme ou chez le singe. Cette recherche est désignée sous le nom de « Kitten test » de Dolman.

Nous la pratiquons de la façon suivante :

Les colonies isolées sur Chapman lactosé sont repiquées sur bouillon nutritif ordinaire. Après 5 heures d'étuve à 37°, quelques gouttes de ce bouillon sontensemencées en surface et en profondeur sur trois boîtes de Pétri dans lesquelles est coulé le milieu semi solide de Dolman :

	Grammes
Protéose-peptone « Difco »	20
ClNa	5

dissoudre dans 500 cm³ d'eau distillée additionnée de :

	Grammes
Phosphate dipotassique	1
Phosphate monopotassique.....	1
SO ⁴ Mg.....	0,2
CaCl ²	0,1

Le milieu doit être au pH 7,4.

Porter à l'ébullition — amener à 1 litre, ajouter 3 gr. d'agar en poudre — autoclaver à 120° pendant 30 minutes. Cette gélose est coulée en boîte de Pétri (0 cm. 5 à 1 cm. d'épaisseur).

Les boîtes ensemencées sont mises dans un dessiccateur en atmosphère contenant 30% de CO². Le tout est porté à l'étuve pendant 40 heures.

A ce moment, le contenu des boîtes est filtré sur papier filtre, sous pression (filtre Seitz spécial), puis sur bougie Chamberland L3. Le filtrat est mis dans une ampoule scellée et chauffée au bain-marie à 100° pendant 30 minutes. L'entérotoxine est thermostable et l'on admet que le chauffage est suffisant pour détruire les autres toxines staphylococciques. L'entérotoxine conserve ensuite toutes ses propriétés lorsqu'elle est maintenue à la glacière.

On prend un chat jeune de 400 à 500 grammes et on lui injecte dans le péritoine 1 cm³ de filtrat par kilogramme de poids. Si le staphylocoque isolé est entérotoxique, on voit survenir, au bout d'une demi-heure, des nausées puis au bout d'une heure, des vomissements et une diarrhée importante. L'animal est abattu, chancelant pendant deux ou trois heures. Il se remet parfaitement ensuite.

L'injection aux quantités correspondantes à celles signalées ci-dessus d'un filtrat de milieu de Dolman non ensemencé ou ensemencé avec un staphylocoque non entérotoxique ne produit l'apparition d'aucun trouble. Nous l'avons souvent vérifié.

En employant la technique que nous venons de décrire, nous avons pu isoler un staphylocoque entérotoxique dans une des huit boîtes d'un lait concentré sucré qui avait occasionné un syndrome d'intoxication gastro-intestinale chez des nourrissons d'une localité du Nord de la France.

L'emploi des milieux hypertoniques à 75 gr. pour 1.000 de NaCl permet donc l'enrichissement et l'isolement facile des staphylocoques pathogènes dans les produits où ils peuvent être rares ou dans les produits où leur culture est rendue difficile par l'abondance des germes saprophytes. De même, le « Kittentest » de Dolman permet de préciser assez rapidement si les staphylocoques isolés sont entérototoxiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. BUTTIAUX, M. GERVOIS, D. LIÉGEOIS. Société de Gastro-enterologie de Lille, mars 1946. *Arch. Mal. App. Dig.* (sous presse).
- [2] R. BUTTIAUX, L. LESNÉ. L'analyse bactériologique des laits concentrés sucrés. Présence de staphylocoques pathogènes dans certains d'entre eux (sous presse).
- [3] F. E. KOCH (1942). Electrouährboden für Staphylokokken. *Zeistr.-Bakt.-Parasiteuk*, I, *Oreig*, 149, 122-124.
- [4] G. H. CHAPMAN. *Journal Bact.*, t. L (2), 1945, 201-203.
- [5] G. H. CHAPMAN. *Journal Bact.*, t. LI, 1946.
- [6] G. E. DOLMAN et R. J. URLSON. *The Journal of Immunology*, t. XXXV, 1938, p. 13.

**RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE LAIT
DE VACHE ACTINISÉ.**

**I. INFLUENCE DE L'ACTINISATION SUR LA TENEUR
DU LAIT EN VITAMINE C ANTISCORBUTIQUE (1)**

par

JEANNE BOISSELOT et JEAN CAUSERET

On sait que le rachitisme à forme eutrophique est une maladie de l'enfance dont les principaux signes cliniques apparaissent généralement au cours de la première année de la vie. Il est caractérisé par un ralentissement plus ou moins marqué de l'ossification des cartilages de conjugaison, ralentissement qui provoque l'incurvation de la colonne vertébrale et des os des jambes, la formation d'un « chapelet costal », la tuméfaction des articulations du poignet et du cou-de-pied, le retardement de la soudure des fontanelles, etc.

On observe rarement ces troubles chez l'enfant nourri au sein ; par contre, ils sont extrêmement fréquents chez l'enfant nourri au lait de vache, — notamment chez le prématuré —, bien que ce lait soit plus riche en phosphore, en calcium et en vitamine D que le lait de femme : ce fait serait dû, pour une grande part, à la formation, dans les intestins de l'enfant nourri au lait de vache, de sels de calcium insolubles qui ne sont pas résorbés par la muqueuse intestinale. En effet, on a remarqué, écrit E. MOURIQUAND, que « les selles du nourrisson au sein sont acides, celles de l'enfant au biberon alcalines. Or, l'acidité des selles favorise l'absorption du calcium et du phosphore sous la forme monocalcique ; l'alcalinité au contraire, en précipitant ces sels en combinaisons insolubles, gêne gravement leur absorption » (2).

(1) *Bulletin Soc. Sc. Hygiène aliment.*, 1946 709, 148.

(2) Pour plus de détails, voir : E. Mouriquand. *Vitamines et carences alimentaires*. Albin Michel, édit., Paris, 1942.