

RECHERCHE, DANS LE LAIT EN NATURE, DE CERTAINES BACTÉRIES PATHOGÈNES POUR L'HOMME

par

G.. GUILLOT, A. NÉVOT et G. THIEULIN

(fin)

C. RECHERCHE DES STREPTOCOQUES

Des streptocoques pathogènes pour l'homme peuvent être rencontrés dans le lait en nature ; il n'est généralement pas aisé de les identifier.

Ces streptocoques appartiennent le plus souvent au groupe *St. pyogenes*.

Toutefois, pour résoudre autant que possible le problème posé par l'ensemble des streptocoques du lait, nous donnerons un aperçu des bases de l'identification de ces germes.

Quantité de lait nécessaire : 10 cm³ (recueillis aseptiquement).

Milieux de culture (1) et matériel :

6-10 tubes de gélose-sérum.

6-10 tubes de bouillon de viande-sérum lactosé.

6-10 tubes de lait au bleu de méthylène à 1 p. 1.000.

6-10 tubes de bouillon-hippurate.

6-10 tubes de gélose-sang.

1 tube à centrifugation.

Principe.

Les germes du groupe *St. pyogenes* exigent, pour leur développement, l'addition au bouillon nutritif ordinaire de sérum sanguin ou de sang... Ils cultivent à 37° et non à 45° ; ils ne se développent pas en lait écrémé contenant du bleu de méthylène à 1 p. 1.000 et ils sont incapables d'hydrolyser l'hippurate de soude ; ils sont, le plus souvent, hémolytiques (caractère complémentaire du pouvoir pathogène).

Technique.

A l'aide d'une pipette stérile, introduire aseptiquement 5 à 10 ml. de lait dans un tube à centrifugation parfaitement propre et stérile. Centrifuger 20 minutes à 3.000 tours.

Après centrifugation :

A l'aide d'un fil métallique flambé, décoller l'anneau de crème

(1) Les formules de préparation sont indiquées ci-après.

sur environ la moitié de son pourtour. Par l'ouverture ainsi créée, faire écouler hors du tube le lait écrémé puis mélanger la crème et le culot de centrifugation.

Porter ce mélange, à l'aide d'une pipette stérile, dans un tube contenant 2 à 3 cm³ d'eau salée (à 8,5 p. 1.000) stérile ; agiter énergiquement de façon à réaliser une suspension homogène.

A partir de ce tube :

A l'aide d'une anse métallique, ensemercer, pour isolement, suivant la technique d'épuisement de la semence, 3 tubes de gélose-sérum.

Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, noter la présence de fines colonies séparées, en tête d'épingle.

Prélever séparément quelques-unes (3-4) de ces fines colonies, et, après examen d'un frottis, coloré selon la méthode de Gram, vérifier qu'il s'agit bien de streptocoques.

Reprenre ensuite, sur les surfaces de culture, une colonie de même type que celles identifiées morphologiquement ; la dissocier dans quelques centimètres cubes d'eau salée stérile et, à partir de la suspension réalisée, procéder, pour purification, à un nouvel isolement, sur 3 tubes de gélose-sérum.

A partir de quelques colonies purifiées (3-4), ensemercer aseptiquement autant de tubes de gélose-sérum et de tubes de lait écrémé additionné de bleu de méthylène à la dose de 1 p. 1.000.

Après vingt-quatre heures à 37°, noter si les tubes de lait révèlent ou non une culture positive, cette dernière étant caractérisée par une décoloration suivie, le plus souvent, de coagulation.

Partant d'une culture pure sur gélose-sérum, correspondant à une colonie qui repiquée en lait bleu ne l'a pas décoloré, ensemercer un tube de bouillon-sérum lactosé, additionné d'un indicateur de pH. Placer à l'étuve à 45°.

Après vingt-quatre heures, noter les cultures n'ayant pas fait virer l'indicateur, puis, à partir de la culture pure correspondante (obtenue précédemment sur milieu solide), ensemercer un bouillon à l'hippurate et une gélose au sang.

a) *Test de l'hippurate.*

Après quatre jours d'étuve à 37°, centrifuger la culture, prélever 2 cm³ du liquide clair surnageant et ajouter 0 cm³ 5 d'une solution de perchlorure de fer à 7 %, agiter : il se forme ou non un précipité.

Si le précipité formé persiste, ajouter une goutte d'une solution d'acide chlorhydrique dilué à 50 % dans l'eau distillée.

La dissolution du précipité révèle que le germe en cause appartient au groupe *St. pyogenes*.

Si le précipité est insoluble (hippurate hydrolysé), il s'agit de *St. agalactiae*.

b) *Test de l'hémolyse.*

Rechercher l'action hémolytique par ensemencement, par points séparés, sur gélose au sang.

Après vingt-quatre heures à 37°, le pouvoir hémolytique est révélé par la présence d'un halo clair caractéristique à la périphérie de chaque zone ensemencée.

Remarque.

Le groupe *St. pyogenes* comprend des espèces dont l'identification nécessite des techniques délicates sérologiques et biochimiques ne pouvant être appliquées que dans des laboratoires très spécialisés.

Formule de préparation des milieux de culture préconisés

I. Bouillon de viande-sérum lactosé.

Viande maigre de bœuf	500 gr.
Eau	1.000 gr.

Après macération pendant une heure au moins, faire bouillir et filtrer. Au filtrat, ajouter :

Peptone bactériologique	10 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.

Ajuster le pH à 7,4. Stériliser 20 minutes à 120°. Filtrer.

Ajouter :

Lactose	2 gr.
---------------	-------

Répartir en tubes à essais à raison de 8 à 10 cm³ par tube.

Stériliser 20 minutes à 115°.

Au moment de l'emploi, ou peu de temps auparavant, ajouter aseptiquement dans chaque tube, environ 1 cm³ de sérum (de lapin, de mouton ou de cheval) ; éprouver la stérilité en plaçant 24 heures à l'étuve à 37°.

II. Gélose-sérum.

Au milieu précédent ajouter avant la deuxième stérilisation 20 gr. de gélose.

Répartir à raison de 4 à 5 cm³ par tube. Stériliser 20 minutes à 115°. Ultérieurement, le milieu gélosé, en culot, étant fondu et ramené à 55°, ajouter le sérum, puis agiter et incliner.

Éprouver la stérilité par un séjour de 24 heures à 37°.

III. Bouillon-hippurate :

Eau	1.000 gr.
Peptone bactériologique	10 gr.
Pepsine (titre 500)	5 gr.

Chlorure de calcium pur anhydre	0 gr. 03
Hippurate de sodium	10 gr.
Solution de perchlorure de fer à 1 pour 100.....	1 goutte

(pH : 7,1)

Ne pas stériliser par la chaleur. Filtrer sur bougie L3. Répartir à raison de 8 à 10 cm³ par tube.

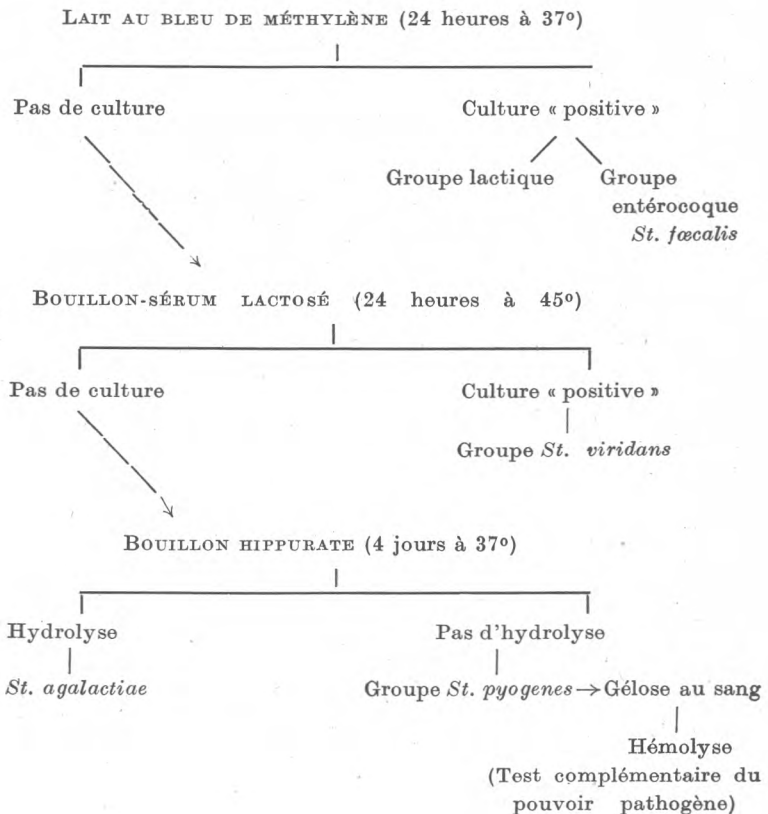
IV. Indicateur de pH à ajouter au bouillon-sérum lactosé.

Solution de tournesol à 1 p. 150: 5 gouttes pour 10 cm³ de bouillon environ, ou solution de bromothymol à 1,5 p. 1.000 dans l'alcool à 60° : 3 gouttes pour 10 cm³.

V. Gélose au sang.

Gélose nutritive ordinaire (viande maigre de bœuf, eau, peptone, chlorure de sodium) stérilisée, répartie à raison de 12 à 15 cm³ par tube, fondue et ramenée à 55°. Déposer dans le fond d'une boîte de Pétri stérile 0 cm³ 5 de sang défibriné de lapin ou de mouton ; verser la gélose et bien mélanger.

Tableau schématique



D. RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES

Quantité de lait nécessaire : 10 cm³ (recueillis aseptiquement).

Milieux de culture (1) et matériel :

1 tube d'eau peptonée hypersalée.

3 tubes de gélose, type Chapman.

1 tube de gélose au sang.

1 tube à centrifugation.

Principe.

Les staphylocoques capables de se révéler pathogènes, à la suite de l'ingestion d'un lait les contenant, ont pour propriété essentielle d'être entéro-toxiques.

Le caractère pathogène, en général, sera établi — selon l'opinion actuellement admise — par la mise en évidence des propriétés suivantes :

1. Formation de pigment jaune doré, bien que d'autres variétés pigmentées ou non se montrent parfois pathogènes.

2. Coagulation plus ou moins rapide mais toujours nette du plasma sanguin.

3. Pouvoir hémolytique.

4. Acidification du mannitol.

La toxicité, par ingestion, de ces germes, pourra être établie par le « Kitten test » de « DOLMAN » (injection intra-péritonéale, à un jeune chat, d'un filtrat de culture obtenu dans des conditions particulières). Notons que ce test requiert des techniques délicates qui ne peuvent être mise en œuvre que dans un laboratoire très spécialisé.

Technique.

Dans le but de sélectionner les staphylocoques dont on recherchera le caractère pathogène, procéder d'abord à l'enrichissement en milieu hypersalé :

Ensemencer ce milieu en y introduisant le culot et la crème de 5 à 10 cm³ de lait centrifugé, en opérant comme il a été indiqué pour la recherche des *Salmonella*.

Après vingt-quatre heures à 37°, ensemencer, pour isolement, en utilisant l'anse métallique, suivant la technique d'épuisement de la semence, trois tubes de gélose, type Chapman.

Après vingt-quatre heures à 37°, noter la présence de colonies séparées, de 1 à 2 millimètres de diamètre, arrondies, bombées, luisantes, pigmentées ou non, ayant fait virer le milieu (auréole jaunâtre).

Prélever séparément quelques-unes de ces colonies et, par

(1) Les formules de préparation sont indiquées ci-après.

examen d'un frottis coloré selon la méthode de Gram, vérifier qu'il s'agit de staphylocoques. Repiquer pour purification (page 500).

Réaliser ensuite, à partir d'une colonie pure, les tests précités :

1. *Pigmentation.*

Cette pigmentation sera jugée sur la culture pure elle-même après 2 à 5 jours.

2. *Coagulation.*

Dans un tube à hémolyse, introduire 0 cm³ 5 de plasma de lapin dilué cinq fois avec de l'eau salée à 8,5 p. 1.000 et 0 cm³ 5 d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon nutritif.

Placer à l'étuve à 37° et observer la coagulation dans les vingt-quatre heures.

3. *Hémolyse.*

Ensemencer, par points séparés, une gélose au sang (sang de lapin, de préférence) en boîte de Petri, préparée comme il a été indiqué pour la recherche du pouvoir homolytique des streptocoques (page 502).

Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, le pouvoir hémolytique est révélé par la présence d'un halo caractéristique à la périphérie de chaque zone ensemencée.

4. *Acidification du manuitol.*

Cette acidification a été jugée sur la gélose type Chapman.

Formule de préparation de la gélose type Chapman.

Viande maigre de bœuf	500 gr.
(ou Extrait de viande type Liebig : 5 gr.)	
Eau	1.000 gr.
Peptone bactériologique	15 gr.
Chlorure de sodium	75 gr.
Gélose	15 gr.
(pH : 7,4)	

Stériliser 20 minutes à 120°. Filtrer. Ajouter :

Mannitol	10 gr.
Rouge de phénol	0 gr.025

Répartir en tubes à essais à raison de 5 cm³ environ par tube.

Stériliser 20 minutes à 115°.

Avant l'emploi, faire fondre au bain-marie et incliner.

BIBLIOGRAPHIE

R. S. BREED, E. G. MURRAY et A. PARKER-HITCHENS. *Bergey's Manual of determinative bacteriology.* Waverley Press, Inc. Baltimore, 6^e édit., 1948.

- J. BRISOU. Entérobactéries pathogènes. Masson et Cie, Paris, 1946.
- R. BUTTIAUX et R. BROGNIART. Techniques d'isolement des staphylocoques pathogènes. Identification des staphylocoques entérotoxiques. *Annales Institut Pasteur*, 1947, **73**, 830-834.
- R. BOTTIAUX et L. LESNÉ. L'analyse des laits concentrés sucrés. Présence de staphylocoques pathogènes dans certains d'entre eux. *Le Lait*, 1947, **27**, 121-131.
- R. BUTTIAUX et J. PIERRET. Les staphylocoques pathogènes dans les selles des nourrissons normaux. *Annales Institut Pasteur*, 1949, **76**, 480-482.
- A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE. Manuel technique de microbiologie et de sérologie. Masson et Cie. 4^e édit., Paris, 1948.
- G. H. CHAPMAN. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal Bact.*, 1945, **50**, 201-203.
- L. COTONI, P. FORGEOT et G. THIEULIN. Sur les streptocoques des mammites bovines. *Annales Institut Past.*, 1946, **72**, 184-202. *Le Lait*, 1948, **28**, 505-514.
- G. DASPET. Recherche de l'infection brucellique du lait. *Thèse Doct.-vét.*, Paris, 1946.
- P. FORGEOT. Données récentes sur la classification des streptocoques ; application au diagnostic du *Streptococcus agalactiae* de la mammite contagieuse des vaches laitières et considérations générales sur cette affection. *Cah. Méd. Vét.*, 1948, **17**, 99-108.
- F. KAUFFMANN. Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus- und Paratyphusbazillen. *Zentr. f. Bakt.*, Or. I, 1930-1931, **119**, 148-152.
- Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für *Salmonella bacillen*. *Zeits. Hyg. Infektler*, 1935-1936, **117**, 26-32.
- Die Bakteriologie der *Salmonella* Gruppe. Einar Munlksgaard, Kopenhagen, 1941.
- R. KOURILSKY et P. MERCIER. Sur les méthodes de différenciation entre les staphylocoques pathogènes et non pathogènes. *Revue Imm.*, 1942, **7**, 53-73.
- R. KOURILSKY et P. MERCIER. Sur les caractères différentiels des staphylocoques pathogènes et non pathogènes. *Ann. Biol. Clin.*, 1945, **3**, 272.
- R. KOURILSKY, P. MERCIER et J. PILLET. Détermination du pouvoir pathogène des staphylocoques. *Annales Biol. Clin.*, 1949, **7**, 173-187.
- M. KRISTENSEN, V. LESTER et A. JÜRGENS. On the use of tryptic casein, brome thymol-blue, bromo-cresol-purple, phenolred and brilliant green for bacteriological nutrient media. *Brit. J. Exper. Path.* 1925, **6**, 291.
- E. LEIFSON. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *Journal Path. Bact.*, 1935, **40**, 581-599.
- New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. *Journal Path. Bact.*, 1935, **40**, 581-599.
- L. LE MINOR, A. BONNEFOI et J. GRABAR. Diagnostic biologique des infections à *Salmonella*. *Annales Institut Pasteur*, 1947, **73**, 604-607.
- L. MULLER. Milieux pour la recherche des bactéries du groupe typho-dysentérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 433-436.

- A. NÉVOT. Contrôle bactériologique pratique des denrées alimentaires d'origine animale. *Ed. Méd. Flammarion*, Paris 1947.
- P. RINJARD. Les brucelloses et le lait. *X^e Congrès mondial de Laiterie*, Rome-Milan, 1935, in *Le Lait*, 1935, **15**, 915-928.
- M. SEELEMANN et A. FLINT. Die Gruppe C der hämolytischen Streptokokken. *Zentr. f. Bakt.*, Orig. I, 1942-1943, **149**, 236-250.
- M. SEELEMANN et A. PFEFFER. Zum Nachweis der *Brucella abortus* Bang in der Milch. *Zeits. Infekt. Haust.*, 1939, **55**, 264-282.
- J. M. SHERMAN. The Streptococci. *Bacteriol. Rev.*, 1937, **1**, 1.
- H. SMITMANS et T. ESCHBAUM. Beitrag zum Nachweis von *Abortus Bang*-Bakterien in der Milch denech Tierversuch. *Zeits. Infekt. Haust.*, 1941, **57**, 302-310.
- N. STAMATIN, A. TACU et D. MARICA. L'activité hémolytique et coagulante des staphylocoques isolés à partir des infections humaines ou animales. *Ann. Inst. Past.*, 1949, **67**, 178-180.
- G. THEULIN et G. DASPET. Recherche de l'infection brucellique des vaches laitières par hémé et lacto-agglutination (méthode rapide). *Bull. Acad. Vét.*, 1946, **19**, 298-310.
- G. THEULIN et R. VUILLAUME. Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait, 2^e édit., Paris, 1948.
- J. VERGE. Sur la présence du bacille de Koch dans les laits et les produits dérivés du lait. Etat actuel des recherches effectuées en France. *Rev. Path. comp.*, 1947, **47**, 37-38.

XII^e Congrès International de Laiterie

Stockholm (août 1939)

LES PROCESSUS MICROBIOLOGIQUES DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

Rapport général présenté

par

A. T. R. MATTICK

Malgré les limitations évidemment imposées par le sujet « Les processus microbiologiques dans le lait et les produits laitiers », les rapports soumis sont également remarquables pour l'hétérogénéité des problèmes étudiés que pour leur excellence ; en arrangeant ce résumé, il a donc été quelque peu difficile de préserver une séquence strictement logique. Néanmoins comme le sujet « Streptocoques lactiques et bactériophage » a évidemment été d'intérêt général, il sera traité d'une façon plus détaillée.