

## MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

### ADAPTATION D'UN MILIEU SÉLECTIF A L'ISOLEMENT DES STAPHYLOCOQUES DE MAMMITE APPLICATION AU DIAGNOSTIC D'ÉTABLE

par

B. SEVEL et M. PLOMMET

Station Centrale de Recherches Laitières

C.N.R.Z. — Jouy-en-Josas

(Seine-et-Oise)

#### INTRODUCTION

On sait l'intérêt des milieux sélectifs pour la recherche des germes de mammite dans le lait ; en effet, ces milieux rendent possible le diagnostic d'étable par examen du lait de mélange ; ils améliorent la technique du diagnostic individuel en permettant, d'une part, d'en augmenter la sensibilité par incubation préalable de l'échantillon de lait, d'autre part, de diminuer la rigueur des conditions de prélèvements. A cet égard, l'un de nous a montré les possibilités du milieu TKT appliqué au diagnostic des mammites contagieuses à *Streptococcus agalactiae* [1] et nous avons vu les services que ce milieu peut rendre [2]. Dans le même ordre d'idée, nous avons essayé d'adapter un milieu sélectif pour la recherche des staphylocoques de mammite dans le lait.

Dans la mammite staphylococcique de la vache, le nombre de germes éliminés par le lait est souvent petit : l'ensemencement direct sur gélose au sang ne montre que quelques colonies. Il est donc indispensable que le milieu sélectif n'exerce aucune inhibition pour les staphylocoques.

D'autre part, de très nombreux échantillons de laits individuels et tous les laits de mélange contiennent en grand nombre des microcoques divers — staphylocoques coagulase négatifs, non hémolytiques, non pathogènes — que le milieu doit inhiber ou, au moins, permettre de distinguer des staphylocoques de mammite. Ceux-ci sont à la fois coagulase positifs, hémolytiques de type  $\beta$  ou  $\alpha\beta$  et fermentent la mannite.

Parmi ces trois caractères distinctifs, le dernier est utilisé depuis longtemps dans le milieu de CHAPMAN [3]. Cependant, la culture de nombreux microcoques y produit un jaunissement général de la gélose et des colonies qui ne permet plus de distinguer les staphy-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

locoques. La mise en évidence de la coagulase est difficile sur un milieu d'isolement ; par contre, celle des hémolysines est relativement aisée par l'utilisation de milieux au sang. L'hémolysine  $\beta$ , dont l'activité est surtout nette sur les globules de ruminants, est un caractère indiscutable du pouvoir pathogène des souches d'origine bovine ou ovine. Nous avons cherché à utiliser ce caractère en introduisant des globules rouges de mouton dans un milieu sélectif approprié.

### I. — COMPOSITION DU MILIEU

KLASTRUP [4] a proposé et utilisé un milieu au sang rendu sélectif pour les bactéries Gram positives par la polymyxine ; ce milieu ne convient que pour l'examen de laits très propres. Les milieux sélectifs couramment utilisés — milieux de CHAPMAN [3], de LUDLAM [5] — ne permettent pas l'introduction de sang. Par contre le milieu de ZEBOVITZ, EVANS et NIVEN [6] offre cette possibilité que nous avons exploitée.

#### 1. Hémolyse.

Le sang complet de certains animaux contenant des anticorps, il est préférable d'utiliser des globules lavés pour mettre en évidence l'hémolyse  $\beta$  des staphylocoques. Cette hémolyse  $\beta$  se traduit, après incubation à 37°C, par une zone opaque, concentrique à la colonie, de couleur légèrement plus claire que le milieu et à limite nette. Cette zone devient transparente après quelques heures à la glacière.

Sur le milieu de ZEBOVITZ additionné de globules, elle présente son aspect habituel, mais son opacité oblige, en cours d'utilisation, à attendre que la colonie soit parvenue à un certain développement avant lequel la zone hémolysée n'est pas nettement visible, en particulier si d'autres colonies voisinent avec elles. Le séjour d'une nuit à la glacière rend la détection de l'hémolyse  $\beta$  plus sûre mais retarde la lecture. On peut rendre cette hémolyse transparente d'emblée en ajoutant au milieu du Camp-factor. Cette substance, sécrétée par *Str. agalactiae* dans les milieux de culture, possède en effet la propriété de lyser les hématies de mouton, sensibilisées par la toxine staphylococcique [7].

#### 2. Concentration des inhibiteurs.

L'introduction de globules rouges dans le milieu de ZEBOVITZ augmente légèrement son pouvoir inhibiteur déjà trop élevé dans le milieu original. Pour permettre la croissance de la plupart des staphylocoques ensemencés il faut ramener la concentration de tellurite de 0,2 à 0,075%. Mais alors, les microcoques insuffisamment inhibés ont tendance, avec certains échantillons très conta-

minés, à envahir le milieu en empêchant l'hémolyse de se manifester. En portant la concentration de glycocolle de 1% à 1,5% cet inconvénient disparaît. La croissance des staphylocoques n'est que légèrement retardée et demande 24 heures d'incubation au lieu de 18 heures. Pour l'examen d'échantillons de laits propres, on a, au contraire, intérêt à ramener la concentration de glycocolle à 0,5% de manière à obtenir une croissance rapide de la totalité des staphylocoques ensemencés.

### 3. pH.

Le milieu essayé à différents pH compris entre 6,5 et 8 a donné les meilleurs résultats, en ce qui concerne le nombre et la dimension des colonies, à un pH voisin de 7,5. On obtient automatiquement ce pH après stérilisation en remplaçant le phosphate bipotassique du milieu original par un mélange de phosphates bipotassique et tripotassique.

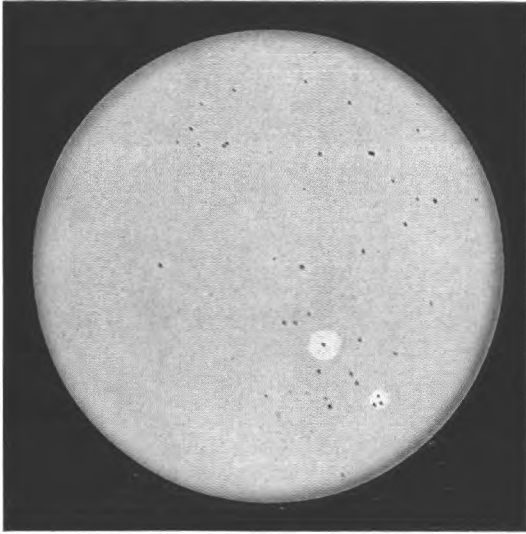
### 4. Préparation et conservation du milieu.

Les différentes modifications apportées au milieu de ZEBOVITZ donnent en définitive le milieu suivant : Bacto-Tryptone 1%, Bacto yeast-extract 0,5%, Mannitol 0,5%, Phosphate bipotassique 0,4%, Phosphate tripotassique 0,1%, Chlorure de lithium 0,5%, Glycocolle 1,5%, Gélose 1,5%. Après dissolution, le milieu est réparti en flacons, autoclavé à 120°C pendant 15 minutes et conservé sous cette forme. Au cours de la stérilisation, il se produit un abondant précipité qu'il faut se garder d'éliminer par filtration, cette opération ayant pour résultat d'augmenter considérablement l'inhibition. Dans le milieu fondu, ramené à 48-50°C on ajoute successivement 0,075% de tellurite de potassium en solution, 3,5% d'une suspension de globules rouges de mouton et 0,5% à 1% d'une culture de streptocoque producteur de Camp-factor. Le milieu est coulé en boîtes de Pétri, à raison de 10 millilitres par boîte et séché à l'étuve avant l'ensemencement.

ZEBOVITZ a attiré l'attention sur les différences rencontrées entre les lots de tellurite. Dans ces essais, nous avons utilisé le tellurite de potassium de marque BDH, en solution à 1%, stérilisé à 120°C pendant 15 minutes ; toutefois cette stérilisation n'est pas indispensable. Avec certains lots de produit d'autres origines, la stérilisation modifie très sensiblement les propriétés inhibitrices du tellurite.

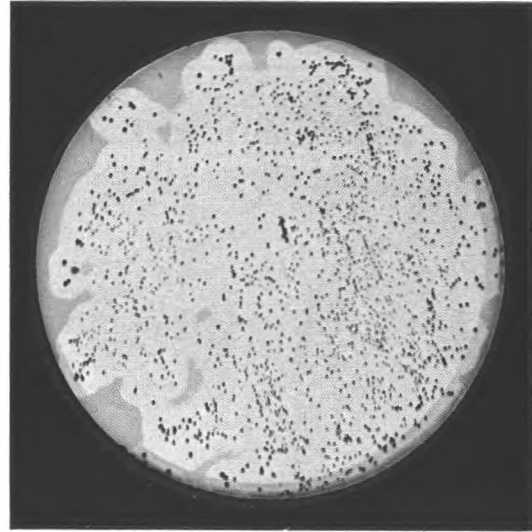
Les globules rouges de mouton sont lavés trois fois dans une solution de chlorure de lithium à 1% ; la suspension est ramenée au volume initial du sang. Le chlorure de lithium assure une meil-

Milieu pour l'isolement des staphylocoques de mammité.



I

Staphylocoques  $\beta$  hémolytiques  
et microcoques



II

Staphylocoques  $\beta$  hémolytiques  
en culture pure

leure conservation des globules rouges que le chlorure de sodium, sans modifier les résultats.

Le Camp-factor est produit simplement par culture de 24 heures en bouillon glucosé tamponné (1) d'une souche de *Str. agalactiae* à la fois non hémolytique et très positive au test de CAMP [1] (2). Nous préférons utiliser la culture totale aux cultures tuées par chauffage ou stérilisées par filtration en raison de son efficacité plus grande. Le titre utile de Camp-factor se maintient dans cette culture pendant plusieurs semaines.

Ainsi préparé, le milieu peut être conservé en boîte de Pétri à 4°C pendant deux mois au moins. Il est possible d'employer une suspension de globules rouges prélevés non stérilement. Cette pratique peut présenter un intérêt pour certains laboratoires, mais nécessite, alors, l'utilisation immédiate du milieu.

### 5. Ensemencement. Interprétation.

Le milieu est ensemencé par étalement en surface d'une ôse de lait (0,25 ou 0,1 ml.) ou de crème (0,1 ml.) sur une demi boîte de Pétri et incubé à 37°C.

Les premières hémolyses entièrement transparentes et à bord net apparaissent entre la douzième et quinzième heure. Après 20 heures elles ont un diamètre de 3 à 7 millimètres, après 24 heures, de 4 à 9 millimètres et, si l'on poursuit l'incubation pendant 36 heures, leur diamètre mesure de 10 à 16 millimètres. On fait généralement la lecture vers la 24<sup>e</sup> heure ; à ce stade, les colonies de staphylocoques sont caractérisées, outre l'hémolyse, par leur dimension — environ 1 millimètre de large — et leur couleur noire. Il est possible de limiter ou prolonger l'incubation en fonction de la propreté des laits ensemencés.

## II. — RÉSULTATS

Nous avons soumis ce milieu, étudié au laboratoire avec un nombre limité de souches, à une utilisation sur une grande échelle, par examen de laits individuels prélevés aseptiquement ou non et de laits de mélange (de bidon ou de bac).

Soixante-dix échantillons de laits individuels, prélevés aseptiquement, contenant des staphylocoques, ont été ensemencés simultanément sur gélose au sang et sur le milieu proposé. Le nombre des staphylocoques comptés sur les deux milieux était sensiblement le même. Toutefois, des séries comparatives d'ensemencement sur dix boîtes de chaque milieu ont montré, pour

(1) Lab-Lemco 0,5%, peptone Evans 1,5%, phosphate disodique 0,5%, phosphate bipotassique 0,5%, Bacto yeast extract 0,3% et, après précipitation, glucose 0,4%.

(2) Souche n° 12-15.

quelques couches, une différence de l'ordre de 20% (milieu à 1,5% de glycoColle). D'autre part, plusieurs souches de staphylocoques dont l'hémolyse  $\beta$  était très peu visible ou invisible sur gélose au sang, présentaient une hémolyse parfaitement claire grâce à l'utilisation de globules lavés et de Camp-factor.

L'ensemencement sur ce milieu de plus de 650 échantillons de laits de différentes origines (laits de quartier, de seau, de bidon, de bac de mélange) a permis d'en apprécier la sélectivité. Certains microcoques de la mamelle et des microcoques de contamination y cultivent mais ils sont aisément reconnaissables. Pratiquement, avec des laits propres, aucun autre germe ne pousse ; avec des laits de mélange, laissés à température ambiante et dont plusieurs échantillons étaient caillés au moment de l'ensemencement, on a noté sur quelques boîtes la présence de quelques colonies *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* et moisissures. Ces contaminants ne gênent pas la lecture.

### III. — APPLICATION AU DIAGNOSTIC D'ÉTABLE

Au cours des essais précédents, nous avons examiné 292 échantillons de lait de troupeau prélevés dans le bac de pesage à l'arrivée à la laiterie, (Auxerre, 216 échantillons) ou à la fruitière, (Poligny, 76 échantillons), chacun représentant la totalité du lait d'un troupeau. Ces échantillons refroidis et transportés en caisses isothermes ont été ensemencés (0,1 ml. de crème de gravitation) dans les 24 heures, simultanément sur milieu TKT et sur milieu pour staphylocoques. Les échantillons montrant au moins 3 colonies sur l'un ou l'autre des milieux ont été considérés comme positifs. Les résultats figurant au tableau 1 se résument ainsi : 16,8% des échantillons contiennent des *Str. agalactiae*, 51,7% des staphylocoques  $\beta$  et 41% ne renferment ni l'un ni l'autre de ces germes.

Le pourcentage très élevé d'échantillons de laits de troupeaux contenant des staphylocoques  $\beta$  pose immédiatement les problèmes suivants, déjà abordés par les auteurs danois [8] : 1) dans quelle mesure la présence de staphylocoques dans le lait de mélange traduit-elle l'existence de mammites staphylococciques dans l'étable ? 2) quel est le plus petit pourcentage de quartiers infectés décelable par examen du lait de mélange ?

On peut considérer comme normale la présence de staphylocoques dans le lait de mélange, si l'examen individuel confirme l'existence d'au moins une mammite dans l'étable. Or, le cas contraire se rencontre quelquefois. L'origine extra-mammaire des staphylocoques de type  $\beta$  n'est pas impossible mais elle est peu probable ; il faudrait, en effet, une contamination considérable du lait pour que les staphylocoques soient en nombre suffisant pour

TABLEAU I  
 RECHERCHE DE STREPTOCOQUE ET DE STAPHYLOCOQUE  
 DANS DES ÉCHANTILLONS DE LAIT DE TROUPEAU  
 RÉSULTATS EXPRIMÉS  
 EN POURCENTAGE D'ÉCHANTILLONS POSITIFS OU NÉGATIFS

Origine	Str. Agalactiae	Staphylocoque	négatifs
Auxerre (216 troupeaux)	16,6	55	38
Poligny (76 troupeaux)	17,1	42	50
Total (292 troupeaux)	16,8	51,7	41

être décelés par la méthode utilisée. Par contre, dans de nombreux cas, on peut invoquer les explications déjà fournies pour les mammites à *Str. agalactiae*. Ce sont : l'élimination ou le traitement des vaches infectées entre le moment du prélèvement de l'échantillon d'étable et celui du prélèvement des échantillons individuels ; le non-contrôle individuel des vaches tarées ; la contamination d'un échantillon de mélange par le précédent au moment du prélèvement. En outre, les essais préliminaires auxquels nous nous sommes livrés ont attiré notre attention sur un point particulier : le diagnostic des infections à staphylocoques à partir du lait de bidon, utilisant le milieu approprié, est quelquefois plus sensible que le diagnostic individuel portant sur les premiers jets de laits prélevés aseptiquement et ensemencés sur gélose au sang sans incubation préalable. Ceci résulte sans doute des variations du nombre des staphylocoques dans le lait au cours de la traite.

Le deuxième problème concerne la sensibilité de la méthode ; nos essais préliminaires ont montré qu'elle est satisfaisante. Le lait de onze vaches, atteintes dans un ou deux quartiers d'infections staphylococciques chroniques, cliniquement inapparentes, fut réparti au hasard et mélangé au lait de 145 autres vaches dans trente bidons de vingt litres. L'ensemencement du lait de ces bidons a permis de retrouver dix des onze vaches infectées. La sensibilité de cette méthode est donc comparable à celle utilisant le milieu TKT pour le diagnostic des mammites contagieuses, c'est-à-dire qu'elle permet de retrouver neuf fois sur dix un quartier infecté dont le lait est dilué dans vingt litres. Il faut cependant noter que le nombre de staphylocoques présents dans les laits de bidon, comme dans les laits individuels, est en règle générale plus

faible que celui de *Str. agalactiae*. Bien que portant sur un nombre restreint d'échantillons, ces essais donnent des résultats en bon accord avec ceux de JENSEN et al. [8] qui estiment qu'une seule épreuve (ensemencement sur gélose au sang — polymyxine) portant sur le lait de mélange de l'exploitation décele 80% des troupeaux infectés.

Ainsi, à condition de prendre un certain nombre de précautions dans l'interprétation des résultats, le milieu que nous venons de décrire permet le diagnostic des mammites staphylococciques par examen du lait du troupeau.

#### SUMMARY

A medium has been developed for the isolation of mastitis staphylococci from samples of contaminated milk. This medium, which is derived from that of ZEBOVITZ, EVANS and NIVEN (1955), likewise includes potassium tellurite and glycine as selective products, but at different concentrations. Furthermore, it includes sheep cells and CAMP factor which enable the  $\beta$ -haemolysis of the staphylococci to be revealed. This medium allows the mastitis staphylococci to be isolated and identified from individual or can milk samples of even highly contaminated milk.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. PLOMMET. Le phénomène de CAMP. Ses applications au diagnostic des mammites contagieuses. Milieu TKT. *Rec. Med. Vet.*, 1958, **134**, 285-302.
- [2] M. PLOMMET, M. SAINCLIVIER, A. BLUM et B. SEVEL. Extension, en France, des mammites à *Streptococcus agalactiae*. Recherche à partir d'échantillons de lait individuel et de mélange. *Rec. Med. Vet.*, 1959, **135**, 461-469.
- [3] G. H. CHAPMAN. Comparison of Ludlam's medium with staphylococcus medium number 110 for the isolation of staphylococci that clot blood. *J. Bact.* 1949, **58**, 823.
- [4] O. KLAstrup. Staphylococcal mastitis. Polymyxin blood agar as a medium for coagulase-positive haemolytic staphylococcus in can-milk samples. *VIII Nordiska Veterinärmötet*, Helsingfors 1958.
- [5] G. B. LUDLAM. A selective medium for the isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated material. *Monthly Bull. Minist. Hlth*, 1949, **8**, 15-20.
- [6] E. ZEBOVITZ, J. B. EVANS et C. F. NIVEN. Tellurite-glycine agar : a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. *J. Bact.* 1955, **70**, 686-690.
- [7] R. CHRISTIE, N. E. ATKINS et E. MUNCH-PETERSEN. A note on a lytic phenomenon shown by Group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1944, **22**, 197-200.
- [8] R. S., JENSEN, O. KLAstrup, O. ROMER, B. SORENSEN et P. TERP. Mastitisundersogelser i 8 bornholmske mejerikredse. *Nord. Ved. Med.*, 1958, **10**, 361-392.