

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE *SALMONELLA DUBLIN*.
NOUVELLES VARIETES BIOCHIMIQUES.
CLASSIFICATION.*

par R. NÉEL, K. JORGENSEN, L. LE MINOR et A. MACHOUN

Sous le nom de *Salmonella dublin*, on réunit à l'heure actuelle des bacilles qui, tout en ayant une structure antigénique identique: I, IX, XII - g, p, ont un comportement enzymatique différent.

Trois variétés biochimiques ont été ainsi individualisées:

Salmonella dublin - B. WHITE 1929 (1),

Salmonella dublin variété *accra* - F. KAUFFMANN 1941 ou *S. dublin* 2 (2).

Salmonella dublin variété *coeln* - F. KAUFFMANN 1941 ou *S. dublin* 3 (2).

Le Tableau I, emprunté à KAUFFMANN - 1951 (3), en résume les principaux caractères différentiels:

TABLEAU I
Variétés biochimiques de S. dublin

Variété	Arabinose	Dulcitol	Rhamnose	Stern
<i>Salmonella dublin</i>	×	v	+	+
<i>S. dublin</i> v. <i>accra</i>	+	+	+	+
<i>S. dublin</i> v. <i>coeln</i>	×	+	- +	++

Glucides: × tardivement et irrégulièrement positif ou négatif.
v : types biochimiques divers.
+ : positif en 24 heures.
- + : faiblement positif en 2 à 4 jours.

Stern-glycérol: + couleur pourpre après 8 jours d'observation.
++ : couleur lilas en 1 à 8 jours d'observation.

* Annales de l'Institut Pasteur. 1952, 83.

L'action sur les milieux de Simmons et les milieux aux acides organiques est pratiquement identique pour les trois variétés. De plus, la majorité des souches utilisent tardivement et irrégulièrement l'arabinose.

Or, nous avons eu récemment l'occasion d'isoler 65 souches iraniennes de *S. dublin*. Si l'action sur les milieux de Simmons et ceux aux acides organiques a montré que ces souches se comportaient de façon classique, en dehors de quelques différences minimales, et si, là encore, quelques unes d'entre elles seulement ont attaqué rapidement l'arabinose, l'ensemble du comportement vis à vis des trois glucides différentiels et du Stern-glycérol nous a permis d'individualiser deux variétés nouvelles évidemment intéressantes du double point de vue bactériologique et épidémiologique.

A - ORIGINE DES SOUCHES.

La provenance de ces 65 souches est très diverse.

1°) *Veau* - La majorité d'entre elles : 50 souches, ont été isolées chez le veau, le plus souvent à partir de la rate, plus rarement à partir de la moëlle osseuse et des fèces.

Il existe, en effet, depuis plusieurs années, dans la région de Téhéran et dans celle d'Hessarek, une très grave toxi-infection des très jeunes veaux, à allure enzootique, caractérisée cliniquement par une diarrhée profuse avec septicémie terminale. Dans la plupart des cas l'affection est mortelle. En raison de l'absence presque totale d'hygiène dans les élevages, la morbidité est très élevée, atteignant 98 % dans certains cas. Jusqu'à présent, dans tous les foyers, nous avons mis en évidence, comme agent étiologique, *Salmonella dublin*. Mais, comme on l'a observé depuis longtemps dans des enzooties de ce genre (4), cette Salmonelle n'est pas le seul agent pathogène en cause : c'est ainsi que nous avons trouvé plus rarement *Salmonella bovis moribificans* et que nous pensons qu'*Escherichia coli* joue peut être un rôle non négligeable.

2°) *Chien* - Six souches ont été obtenues par coproculture chez des chiens de berger. Ces derniers se nourrissent des cadavres des veaux qui sont laissés sur place. Le chien ne présente aucune lésion de Salmonellose comme nous l'avons vérifié par l'autopsie de ceux qui avaient présenté une coproculture positive. En outre divers ensamen-

cements de contrôle (sang du cœur, rate, foie) restèrent négatifs. L'animal n'héberge donc que transitoirement le bacille dans le tractus intestinal.

Enfin, au cours de recherches sur les *Salmonella* en Iran, nous avons retrouvé *S. dublin* dans les circonstances suivantes :

3°) *Enfant* - six fois, par hémoculture ou coproculture, au cours de syndrome typhoïdique ou gastro-entérite.

4°) *Vache* - une fois, par adénoculture mésentérique, chez un animal sain, destiné à la consommation (porteur de germes).

5°) *Porc* - une fois, par adénoculture mésentérique, chez un animal sain destiné à la consommation (porteur de germes). Ce porc provenait d'un élevage du Mazandéran, ce qui est en faveur de la large diffusion géographique de cette Salmonelle en Iran.

6°) *Chevreau* - enfin une fois chez un chevreau atteint de diarrhée mortelle avec sépticémie. Cette souche a été isolée par hémoculture par M. le Dr KAWEH qui a bien voulu nous la confier. Nous le remercions bien vivement pour son obligeance.

Remarque : toutes ces souches seront désignées au cours de ce travail, sous leur numéro d'inscription au soucier de l'Institut Kazi (Institut d'Etat des Sérums et Vaccins - Hessarek - Iran).

En outre, pour classer nos souches locales, nous avons étudié comparativement trois souches de collection, correspondant chacune aux trois variétés de *S. dublin* déjà décrites. Ces souches nous ont été envoyées par M. le Pr KAUFFMANN que nous remercions infiniment pour son amabilité. Nous leur avons conservé le numéro de la Collection du Centre International des Enterobacteriaceae (Pr KAUFFMANN - Institut Sérothérapique - Copenhague - Danemark). Ce sont :

S. dublin N° 65 (dulcité +).

S. dublin v. *accra* N° 228.

S. dublin v. *coeln* N° 227.

..

B - CARACTERES GENERAUX.

Nous n'avons observé aucune anomalie dans la *constitution antigénique* de nos souches. Leur formule antigénique est donc : I, IX, XII - g. p.

Cette identification a reposé essentiellement sur les épreuves d'agglutination sur lames ou en tubes avec les différents sérums spécifiques. Ces différents tests ont été complétés pour chacune des cinq souches tête de série biochimique (N° 481, 412, 411, 531 et 468) par la

saturation fractionnée d'un sérum polyvalent de lapin. Le résultat de ces diverses saturations ont confirmé la structure antigénique précédente.

Les caractères biochimiques généraux ont été dans l'ensemble ceux du genre *Salmonella* et de l'espèce *S. dublin*.

Nitrate +	Gaz en glucose . . +
Urée - 4	H ² S +
Indol -	Gélatine - 30
M. R. +	
V. P. -	
Lactose - 30	Glucose + 1
Saccharose . . - 30	Mallose + 1
Acétyl - 30	Mannite + 1
Salicine - 15	Sorbitol + 1
Inositol - 30	Tréhalose + 1
Xylose : + 1 ou - 30.	

Signalons les variantes indiquées les suivantes :

— *agazogènes* - deux souches humaines (N^o 552 et 533) n'ont pas produit de gaz.

— *H²S négatives* - quatre souches n'ont pas produit d'hydrogène sulfuré dans les 24 heures. Par la suite la production d'H²S a été très faible.

Mentionnons qu'à l'isolement nous avons observé :

- la coexistence de colonies naines et de colonies normales de type S, sur trois coprocultures pratiquées sur gélose lactosée bromothymolée.
- la présence de colonies de type R, à l'exclusion de colonies de type S, sur trois isollements.
- une souche enfin était contaminée par un phage.

* *

C - CARACTERES DIFFERENTIELS

Les diverses variétés de *S. dublin* et les espèces voisines du Groupe D (antigène commun g) sont différenciées biochimiquement par leur comportement vis à vis :

- de l'arabinose, de la dulcitol et du rhamnose,
- du Stern-glycérol,
- des milieux de Simmons,
- des milieux aux acides organiques.

1^o) Glucides -

Pour les trois glucides précités, ainsi que pour tous les glucides

utilisés dans la recherche des caractères biochimiques d'ensemble, nous nous sommes servis du milieu suivant :

Peptone 10 g
 Chlorure de sodium 5 g
 Glucide 10 g
 Eau distillée. 1 l
 Bleu de bromothymol sodique à 1 p. 500 q. s.
 pH : 7,3 à 7,4.

Glucide et indicateur sont ajoutés après la stérilisation du milieu à 110°. L'ensemencement est pratiqué avec 1 goutte d'une culture de 24 heures dans une eau peptonée identique, mais sans glucide ni indicateur.

Lecture : elle a été journalière jusqu'au 30^e jour.

Nous avons observé deux types de réaction :

- réaction positive avec virage au jaune franc,
- réaction négative, le milieu restant bleu ou prenant une teinte bleu-verte.

Remarque : KAUFFMANN (3) signale pour certaines variétés de *S. enteritidis* et de *S. dublin*, pour *S. moscow* et *S. blegdam* des réactions faiblement positives en 2 à 4 jours (en abréviation — +).

Comme nous n'avons pas rencontré ce type de réaction, nous avons ensemencé les souches suivantes de la Collection du Centre International des Enterobacteriaceae (Pr KAUFFMANN) :

N° 225 *S. enteritidis* v. *chaco*,

N° 226 *S. enteritidis* v. *essen*,

en eau peptonée rhamnosée,

N° 227 *S. dublin* v. *coeln*,

en eau peptonée dulcitée.

Avec les deux premières souches, la réaction a été positive (virage au jaune) au 4^e jour, avec la troisième le milieu n'a présenté aucune modification.

Nous avons donc supprimé ce type de virage qui tombe dans le cadre des virages tardifs (voir ci-dessous).

Interprétation des résultats : la rapidité du virage joue un rôle capital dans le diagnostic des différentes variétés de *S. dublin* et dans celui des Salmonelles voisines (2, 3).

Le virage rapide en un jour (ou +) est un caractère constant quelque soit le glucide attaqué. Nous avons observé aussi des réactions positives rapides légèrement retardées : le virage ne se produit qu'en 30 à 40 heures, principalement avec les souches de la variété 1 et en rhamnose ; après vérification, ce virage était du type + précédent.

Le virage tardif, en 3 à 30 jours, est irrégulier, comme on l'a observé depuis longtemps et comme nous l'avons vérifié pour un

grand nombre de nos souches. Nous désignerons ces réactions tardives et irrégulièrement positives ou négatives, qui s'observent avec l'arabinose, la dulcité et le rhamnose par le signe \times .

Le virage positif en 2 jours est soit un virage rapide retardé comme nous l'avons dit plus haut (ou +), soit un virage tardif anormalement précoce (ou \times). En présence d'une telle réaction, il est nécessaire de pratiquer une réaction de contrôle pour classer de façon précise ce type de virage.

Les virages constamment négatifs (ou -) ne s'observent pas avec ces trois sucres ou seraient à nos yeux peut-être exceptionnels. En effet avec quelques souches négatives, nous n'avons obtenu un résultat positif qu'au 3^e, 4^e et même 5^e essai.

Variétés biochimiques: l'action combinée sur les trois glucides précités permet d'individualiser 5 variétés de souches locales, dont 3 correspondent aux variétés déjà décrites. Nous y reviendrons plus loin dans la discussion finale.

La répartition des souches écart la suivante :

- Variété 1 : 32 souches. (*S. dublin*).
- Variété 3 : 1 souche. (*S. dublin* v. *coeln*).
- Variété 4 : 25 souches.
- Variété 5 : 1 souche.
- Variété 6 : 6 souches. (*S. dublin* v. *accra*).

2^o) Stern-glycérol -

Pour la composition du milieu, nous renvoyons à la publication de KAUFFMANN (3). A la place d'Extrait Liebig, nous avons eu recours à la macération double de viande de bœuf. La préparation du milieu est délicate et après décoloration on doit obtenir une teinte jaune sans reflets rosés. Mais, pas plus dans la publication originale (5) que dans celles de KAUFFMANN (2, 3) aucune indication n'est donnée pour le mode de stérilisation. La sensibilité varie suivant que l'on stérilise à l'autoclave ou par filtration. Des essais comparatifs nous ont fait adopter la stérilisation à 105° pendant 20 minutes. Après refroidissement rapide, le milieu doit être très légèrement rosé. Conservé en glacière, à l'abri de la lumière, il doit être utilisé rapidement. Malgré l'emploi d'un tube témoin non ensemencé, nous pensons qu'un contrôle du lot avec des souches éprouvées Stern -, + et ++ est nécessaire.

Lecture: elle a donné lieu à de nombreuses interprétations.

Le mode de lecture préconisé par KAUFFMANN en 1911 (2) et celui de KRISTENSEN et BOULEN (2) prêtent à confusion et nous obtenions avec nos souches des résultats contradictoires, pour une même variété.

Nous aurions préféré l'interprétation suivante qui évite les causes d'erreur dans la zone du rouge et qui n'est qu'une simplification de la notation de KAUFFMANN 1951 :

- virage au violet en 1 à 8 jours : réaction positive,
- virage au rouge ou identique au tube témoin : réaction négative.

Cependant pour rester en accord avec KAUFFMANN, nous avons adopté le procédé de lecture décrit en 1951 (3) :

- lecture journalière pendant 8 jours,
- virage au violet : réaction positive forte ou ++.
- virage au pourpre : réaction positive faible ou +.
- pas de virage ou virage au rouge peu accentué : réaction négative.

Résultats : dans ces conditions les souches témoins nous ont donné des résultats conformes au Tableau 3a de KAUFFMANN (3) ou Stern +, tandis que toutes les souches locales ont été Stern ++.

3°) Milieux de Simmons.

Nous avons suivi les techniques de préparation et d'ensemencement données par KAUFFMANN (3). La lecture journalière a été prolongée jusqu'au 8^e jour. 18 souches seulement ont été étudiées sur milieux gélosés non citratés et sur milieux liquides.

Milieux gélosés : sur gélose citratée et glucosée, les résultats ont été en général parallèles. La majorité des souches a cultivé faiblement et tardivement. Le virage au bleu ou au jaune a commencé en général vers le 3^e jour. L'intensité de la coloration finale est relativement faible mais très nette dans la plupart des cas. Cette action positive faible s'oppose au virage rapide et de couleur bleu roi que l'on observe avec la plupart des souches de *S. enteritidis*. Elle se différencie aussi nettement des résultats négatifs que nous ont donné quelques souches de *S. dublin*.

Avec l'arabinose, la dulcité et le rhamnose toutes les souches ont été négatives.

Milieux liquides : en dehors de quelques exceptions s'étant produit avec le citrate et le glucose, les réactions sont négatives.

4°) Milieux aux acides organiques.

Les techniques de préparation, d'ensemencement et le mode de lecture ont été ceux indiqués par KAUFFMANN (3). Nous n'avons utilisé que quatre des cinq sels préconisés : d et l-tartrate, citrate et mucate. Le test à l'acétate de plomb a été pratiqué journalièrement. Toutes les souches ont été ensemencées sur d-tartrate et citrate, 18 seulement sur les deux autres milieux.

A l'exception de 3 souches d-tartrate encore négatives au 7^e

jour (*variantes individuelles*), les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux observés jusqu'à présent avec *S. dublin*, la positivité étant toujours obtenue en moins de 3 jours.

5°) *Résumé des actions précédentes.*

Le Tableau II donne les caractères différentiels biochimiques de quelques unes des souches iraniennes et ceux des souches témoins.

*
**

D - DISCUSSION. CLASSIFICATION.

Les divers milieux différentiels ne présentent pas tous le même intérêt.

1°) *Milieux de Simmons.*

Les géloses de Simmons avec glucose, arabinose, dulcité et rhamnose n'ont qu'une valeur d'appoint secondaire pour séparer uniquement *S. dublin* des espèces antigéniquement voisines du groupe D.

Seule, on le sait, la gélose citratée est d'un usage courant et présente un certain intérêt dans l'orientation du diagnostic, surtout si l'on tient compte des réactions positives faibles qui caractérisent nombre de souches de *S. dublin*.

Le schéma fermentatif sur les géloses à l'ammonium est le suivant :

Citrate	:	+ t ou - .
Glucose	:	+ t ou - .
Arabinose	:	- .
Dulcité	:	- .
Rhamnose	:	- .

+ t : positif tardif.

- : négatif.

2°) *Milieux aux acides organiques.*

Les différences légères constatées avec les différents sels d'acides organiques ne peuvent servir à caractériser les diverses variétés de *S. dublin* même secondairement.

Par contre les résultats obtenus priment toute leur valeur en temps que « type fermentatif » d'ensemble permettant d'opposer *S. dublin* aux espèces voisines, *S. roslock* exceptée.

TABLEAU II

Caractères différentiels de quelques souches locales et témoins

Variété	Arab.	Dulc.	Rham.	Xyl.	Stern	Milieux du Simmons			Acides organiques				Observations		
						Citr.	Glic.	Ar-Dl-Rh.	d	l	c	m			
Variété 1	×	+	+		+,++										
N° 65	+13	+	+	+	+	+4	+3	-	+2	+1	+1	+1			
N° 481	+4	+	+	+	++	+3	+3	-	+2	+2	+1	+1			
N° 529	+12	+	+	-	++	+4	+3	-	+2	+3	+2	+1			
N° 535	+3	+	+	-	++	+3	+2	-	+3	+3	+2	+1			
Variété 3	×	+	×		++										
N° 227	+17	+	-	+	++	-	-	-	+2		+1	+1			
N° 412	+9	+	+16	+	++	+3	+3	-	+1	+2	+1	+1			
Variété 4	×	×	×		++										
N° 411	+22	+7	+14	+	++	+3	+4	-	+2	+2	+1	+1			
N° 466	-	+22	+8	+	++	+3	+3	-	+2	+2	+2	+1			
N° 532	+4	-	-	+	++	+2	+3	-	+2	+2	+1	+1			Gaz : -
Variété 5	+	+	×		++										
N° 531	+	+	+5	+	++	+3	+3	-	+2	+2	+1	+1			H ₂ S : traces
Variété 6	+	+	+		+,++										
N° 228	+	+	+	+	+	+4	+3	-	+1	+2	+1	+1			
N° 468	+	+	+	+	++	-	-	-	+1	+2	+1	+1			
N° 469	+	+	+	+	++	+3	+3	-	+2	+2	+1	+1			
N° 471	+	+	+	+	++	+5	+2	-	+2	+3	+2	+1			H ₂ S : traces
Formule gén.	v	v	v	+,-	+,++	+t,-		-	+1,3	+1,3	+1,2	+1			
Pour tous les milieux le chiffre indique le jour du virage.						<i>Stern-glycérol</i> : + : pourpre au 8 ^e jour. ++ : violet en 1 à 8 jours.									
<i>Glucides</i> : + : positif 1 jour.						<i>Simmons</i> : +t : positif tardif faible. - : négatif.									
× : irrégulièrement positif ou négatif.						<i>H₂S</i> : tr : négatif le 1 ^e jour, positif faible par la suite.									
- : négatif 30 jours.															
v : + ou ×.															

Conformément à KAUFFMANN (2), le type fermentatif de *S. dublin* est :

d-tartrate : + .

l-tartrate : + .

i-tartrate : - .

citrate : + .

mucate : + .

+ : positif 14.

- : négatif 14 jours

i-tartrate : d'après KAUFFMANN (3).

mucate : exceptions d'après KAUFFMANN (3);

3°) Glucides - Stern.

Comme nous l'avons précisé plus haut, le comportement en arabinose, dulcité et rhamnose a permis de classer nos souches locales en 5 variétés, dont 3 correspondent à celles déjà décrites par KAUFFMANN.

Le Tableau III en donne la liste et la clé d'identification, ainsi que le comportement sur Stern-glycérol.

TABLEAU III

Variétés biochimiques de *S. dublin*

Variété	Arabinose	Dulcité	Rhamnosc	Stern
<i>Salmonella dublin</i> 1 . .	×	+	+	+++
2 . .	×	×	+	+
<i>S. dublin</i> 3 ou v. <i>coeln</i> . .	×	+	×	++
<i>S. dublin</i> 4 ou v. <i>leheran</i>	×	×	×	++
<i>S. dublin</i> 5 ou v. <i>hessarek</i>	+	+	×	++
<i>S. dublin</i> 6 ou v. <i>accra</i> . .	+	+	+	+++
Formule générale	v	v	v	+++
<p><i>Glucides</i> : + : positif 1 jour. v : types biochimiques divers. × : tardivement et irrégulièrement positif ou négatif. <i>Stern</i> : + : couleur pourpre au 8^e jour. ++ : couleur violette en 1 à 8 jours.</p>				

4°) Commentaires :

a) Suivant le tableau 3^e de KAUFFMANN (3) *S. dublin* est

dulcité v c'est à dire types biochimiques divers. D'après ce que nous avons dit de l'action de cette Salmonelle sur les trois glucides différentiels, le signe v ne peut s'interpréter que deux façons + ou X. 32 de nos souches locales et la souche témoin n° 65 se rangeaient dans cette variété *S. dublin* proprement dite et étaient dulcité +.

Nous avons demandé à Mr le Pr KAUFFMANN une souche du type dulcité X. Comme il n'en avait pas isolé ces derniers temps, nous avons pour mémoire inclus sous le nom de *S. dublin* 2 un tel type de réaction.

b) Les souches des variétés 1 et 6 (*accra*) locales étaient toutes Stern ++ alors que les souches décrites antérieurement sont Stern +.

c) Nous avons eu 20 souches xylose négatives. Elles ont toutes fait partie de la variété 1. Nous ne pouvons affirmer si cette action particulière est propre à cette variété.

d) Mentionnons l'origine des variétés *teheran* et *hessarek*:
variété 4 : veau et chevreau, atteints de diarrhée avec sépticémie terminale, chien (porteur de germes) et enfant (syndrome typhoïdique).
variété 5 : veau (diarrhée avec sépticémie).

..

CONCLUSION

A l'occasion de recherches sur la Salmonellose des bovidés et sur les Salmonelles en Iran, nous avons été amenés à faire l'étude bactériologique de 65 souches de *Salmonella dublin*.

A côté de la mise en évidence de variantes biochimiques individuelles, nous avons retrouvé en Iran les trois variétés biochimiques décrites à ce jour :

S. dublin, *S. dublin* v. *coeln* et *S. dublin* v. *accra*.

Un certain nombre de souches présentaient des caractères biochimiques les différenciant des variétés précédentes. Nous avons été amenés à les grouper en deux variétés nouvelles :

S. dublin v. *teheran* et *S. dublin* v. *hessarek*.

Institut d'Etat des Sérums et Vaccins
(*Institut Razi*) - *Hessarek*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) B. WHITE – J. Hyg. 1929-30, 29, 433.
- 2) F. KAUFFMANN – Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe. Copenhague 1941.
- 3) F. KAUFFMANN – Enterobacteriaceae 1951 Copenhague.
- 4) H. I. FIELD – Bull. Off. Int. Epiz. 1950, 34, 338.
- 5) M. LEVINE et H. W. SCHOENLEIN – A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. Baltimore. 1930.