

MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

EXAMEN DES RONGEURS ET DES PUCES

Avant de discuter la valeur des méthodes de laboratoire employées en vue de déceler la peste chez des rongeurs pris isolément, il faut souligner l'importance du bon fonctionnement d'un service de renseignements, grâce auquel le personnel de laboratoire est tenu au courant de l'apparition et de l'ampleur d'une mortalité murine anormale. Dans le cas des rongeurs domestiques en particulier, la découverte d'un nombre appréciable d'animaux ayant succombé spontanément peut être considérée comme le signe d'une épizootie de peste, tandis que la rareté manifeste de rongeurs vivants dans une localité qui auparavant présentait une lourde infestation témoigne d'une importante épizootie antérieure. A la lumière des faits énoncés dans le chapitre 4, tout doit être mis en œuvre pour examiner les rongeurs trouvés morts, si l'on veut avoir le maximum de chances de prouver l'existence de l'infection. Les observations récemment publiées par Gross & Bonnet ⁴⁹ et faites par eux pendant la période 1940-50 dans le district d'Hamakua (Hawaii) confirment ce point de vue : ces auteurs ont décelé la peste 358 fois chez 4.808 rongeurs trouvés morts naturellement, contre 23 fois chez 20.623 animaux tués et 20 fois chez 304.807 rongeurs capturés par piégeage.

Valeur des méthodes

Les principales méthodes employées pour dépister la peste chez les rongeurs sont les suivantes :

- 1) l'autopsie;
- 2) les tests bactériologiques (frottis et cultures);
- 3) les tests sérologiques;

- 4) l'inoculation aux animaux d'épreuve de matériel provenant de rongeurs individuels ou de cultures obtenues à partir de ce matériel;
- 5) l'inoculation d'un broyat d'organes de plusieurs rongeurs;
- 6) l'inoculation de broyats de puces.

Autopsie

Si l'on pense que le travail « princeps » de la Commission de recherches sur la peste⁸⁸ a été fait à une époque où la peste aiguë s'observait couramment parmi les rats de l'Inde, il n'est pas surprenant que les membres de la Commission, comparant en 1907 les différentes méthodes proposées pour le diagnostic de la peste murine, aient insisté sur la valeur hors pair des constatations macroscopiques. De l'avis de la Commission, le diagnostic de la maladie chez les rats était justifié par la présence même d'un seul des gros signes pathognomoniques, sans égard aux résultats ultérieurs, positifs ou non, fournis par l'examen des frottis, les cultures ou les inoculations aux animaux d'épreuve.

Il n'est plus possible d'attribuer aux résultats des examens macroscopiques une valeur aussi grande, non seulement parce qu'on peut trouver des animaux qui, pour les raisons exposées dans le chapitre précédent, ne montrent pas de signes marqués d'infection, mais encore parce que les observations effectuées hors de l'Inde ont prouvé que des aspects pathologiques, semblables à ceux que produit le bacille pesteux, pouvaient être imputés à d'autres agents infectieux. A ce sujet, il faut souligner que d'après l'expérience de Macchiavello⁷⁰ à Antofagasta (Chili) des rats qui par la suite ont été reconnus infectés de peste présentaient souvent moins de lésions caractéristiques que beaucoup d'animaux, suspects à l'examen macroscopique, mais en réalité indemnes de peste.

Néanmoins, l'existence de signes tels que des bubons typiques, l'aspect bigarré ou cireux du foie et un liquide pleural clair, ont été considérés comme une forte présomption, dans la plupart des territoires d'endémie pesteuse. Comme on l'a déjà signalé, la fréquence de ces signes pathognomoniques témoigne de l'existence d'une épizootie aiguë, tandis que leur rareté suggère une phase silencieuse de l'infection. Pour interpréter correctement des examens macroscopiques, il est nécessaire, toutefois, de pratiquer l'autopsie avant tout début de putréfaction.

Tests bactériologiques

Par la suite, les auteurs, suivant les directives de la Commission, ont continué à accorder crédit aux résultats directs de l'autopsie des rats. Cependant, ils ont estimé qu'en général il était nécessaire de confirmer le diagnostic à l'aide des méthodes de laboratoire, en particulier de frottis et de cultures.

L'interprétation des résultats de l'examen de frottis exige une grande attention comme on le verra plus loin (page 250). Toutefois, l'abondance de bacilles caractéristiques à coloration bipolaire ou de formes d'involution sur les frottis des organes de rongeurs autopsiés permet, au cours d'épidémies avérées par d'autres méthodes sûres, de confirmer un diagnostic positif.

La culture suffit à identifier l'infection toutes les fois qu'il est possible d'examiner du matériel frais. Mais s'il y a putréfaction, il est difficile ou même impossible d'avoir un résultat valable par l'ensemencement du matériel provenant de bubons ou de viscères d'animaux jugés suspects de peste. Cependant, les chances de démontrer l'existence de la peste chez les rongeurs putréfiés se sont notablement accrues à la suite de la recommandation — faite pour la première fois en 1926 par Pons (cité par Murdock⁸¹), puis par Fusco (cité par Devignat²³) et par Micheletti⁷⁸ et à nouveau séparément par Uriarte et al.¹¹¹ — que, dans de pareilles circonstances, il était préférable d'utiliser pour les examens bactériologiques la moelle osseuse du tibia ou du fémur plutôt que les organes internes.^a

Alors que la grande valeur de cette méthode était confirmée par la plupart des travailleurs opérant sur le terrain et également par l'expérimentation faite au laboratoire par Russo⁹⁸ avec des cadavres de rats et de cobayes, plusieurs auteurs arrivaient à des conclusions moins satisfaisantes. Macchiavello & Paracampos⁷³ en particulier, travaillant sous le climat chaud du nord-est du Brésil, enregistrèrent de nombreux échecs avec ce procédé et ils ont fait les plus expresses réserves contre l'exclusion de l'existence de la peste sur la base de résultats négatifs obtenus de cette façon. Ils ont admis cependant que l'impossibilité de cultiver *P. pestis*, en partant du matériel prélevé chez un nombre appréciable de leurs rongeurs, semblait être surtout due au fait que les souches de peste dominant dans le nord-est du Brésil étaient souvent trop atténuées pour provoquer une septicémie. Les cultures de moelle osseuse provenant d'animaux atteints de peste aiguë ou subaiguë étaient invariablement positives et moins souillées que celles effectuées avec les organes internes. En outre, comme les viscères des rongeurs morts étaient sujets à être détruits par les larves d'insectes, l'emploi de la moelle osseuse était parfois la seule méthode praticable en laboratoire.

Tests sérologiques

Comme les tests sérologiques fournissent des résultats beaucoup plus rapides que les cultures, ils ne sont pas sans valeur pour la confirmation des résultats obtenus de prime abord par l'autopsie et l'examen des frottis. Les méthodes recommandées pour l'exécution de ces épreuves ont été rapportées au chapitre 3; elles feront l'objet d'un plus long développement à la page 256.

^a Petragani⁸⁶ tout en reconnaissant la valeur de l'examen de la moelle osseuse a estimé qu'il était plus avantageux encore de cultiver le cerveau des rats putréfiés dans un milieu composé de huit parties de bouillon ordinaire et de deux parties de bouillon de foie.

Expérimentation sur l'animal

Epreuves individuelles. Les expériences sur l'animal effectuées avec les organes de rongeurs isolés ou avec les cultures isolées de ces derniers fournissent des résultats très satisfaisants si elles sont conduites d'une manière adéquate. Elles sont, par conséquent, de la plus grande valeur pour confirmer le diagnostic, à la fois au début des épizooties de peste et dans les cas sporadiques d'infection murine. Cependant il n'est pas toujours possible d'effectuer des expériences avec du matériel provenant de chaque animal pris isolément au cours d'examen en série d'un nombre considérable de rongeurs.

Epreuves avec mélanges et broyats

a) *Organes* : Une innovation capitale, permettant de pratiquer sur une large échelle l'expérimentation sur l'animal pour le diagnostic de la peste murine, a été apportée par Chapin ¹⁹ en 1909. Trouvant que beaucoup des rats qu'il autopsiait à Seattle (Etats-Unis d'Amérique) étaient trop putréfiés pour que des lésions significatives soient visibles, et ne voulant pas laisser passer des cas d'infection « inapparente », il eut recours à l'inoculation cutanée de cobayes avec les organes, non d'un seul rat, mais de tout un lot de ces rongeurs. Chapin lui-même, peut-être parce qu'il utilisait « les organes de chaque rat d'une capture entière . . . s'élevant parfois à 30 rats ou plus » pour inoculer quelques cobayes, n'eut que des résultats négatifs avec les 400 rats éprouvés de cette manière. Cependant bientôt après, la méthode réussit entre les mains d'autres expérimentateurs tels que Lloyd ^{11, 68} (également à Seattle) en 1914 et Creel ¹¹ à la Nouvelle-Orléans en 1915 et depuis elle a été largement employée.

Swellengrebel & Hoesen ¹⁰⁴ semblent avoir été les premiers à modifier le procédé de Chapin en inoculant des cobayes par voie sous-cutanée avec des suspensions obtenues en recueillant dans un mortier stérile de petits morceaux d'organes de rats à examiner et en broyant ce matériel avec un peu d'eau physiologique. Ces deux auteurs ont traité de cette manière 7.625 rats apparemment normaux et ils ont pu déceler la peste dans 54 broyats.

Cette méthode est restée un des procédés standard pour se rendre compte de l'existence de la peste chez les rats domestiques aussi bien que chez les rongeurs sauvages; sa valeur a été bien démontrée par les résultats suivants rapportés au congrès de la recherche médicale de Calcutta en 1934 (cité par Pollitzer ⁸⁹) :

<i>Espèces</i>	<i>Nombre d'animaux utilisés par groupes</i>	<i>Nombre d'animaux trouvés positifs sur frottis</i>	<i>Nombre de groupes testés</i>	<i>Nombre de groupes trouvés positifs</i>
<i>Rattus rattus</i>	2.107	2	141	13
<i>Mus musculus</i>	1.393	—	100	6
<i>Bandicota malabarica</i>	306	1	95	15

Ces résultats sont d'autant plus remarquables que les rongeurs qui présentaient des signes caractéristiques d'infection n'étaient pas compris dans les groupes à examiner. Les cultures effectuées à partir des suspensions préparées pour l'inoculation au cobaye ont souvent donné des résultats médiocres.

Devignat²⁵ au Congo Belge, au cours des enquêtes mensuelles sur les rongeurs, a mis en pratique une méthode intéressante tirant avantage aussi bien de l'examen de la moelle que du procédé des mélanges. Elle consiste à sectionner juste au-dessus du genou les pattes des rongeurs récemment tués (surtout *Rattus natalensis*), à aspirer la moelle osseuse avec une seringue pourvue d'une aiguille à biseau court suffisamment fine et à mettre ce matériel en suspension dans un flacon contenant 3ml d'eau salée physiologique. Cette opération étant répétée avec chaque animal de la capture quotidienne, il est possible de disposer ainsi d'une mixture contenant de la moelle osseuse provenant de 500 rongeurs. La suspension est employée immédiatement pour inoculer un cobaye qui est alors expédié au laboratoire. Quand les animaux ont de trop petits os pour y recueillir de la moelle, les rates sont utilisées pour inoculer un cobaye par voie cutanée.

Par ces techniques, Devignat a réussi à plusieurs reprises à démontrer l'existence de la peste chez des rongeurs qui semblaient indemnes.

Van Riel & Mol,⁹² travaillant dans la région du Lac Kivu au Congo Belge, ont eu également de bons résultats avec les mélanges de moelle osseuse. Ils employaient la voie sous-cutanée pour inoculer les cobayes sur le terrain, mais préféraient la voie cutanée lorsqu'ils opéraient au laboratoire.

Toutefois, les expériences faites par Heisch⁵³ dans la zone Rongai du Kenya, au Congo Belge, où la peste inapparente paraît exister chez les rongeurs sauvages, n'ont pas confirmé la valeur de cette méthode. Heisch cite en particulier un exemple : des rates, des moelles et des puces provenant d'un lot d'*Arvicanthis* ont été utilisées séparément pour l'inoculation de plusieurs cobayes; seules les rates ont donné des résultats positifs. En conséquence, il conseille vivement d'utiliser des broyats d'organes internes plutôt que des moelles pour déceler la peste inapparente des rongeurs sauvages, et recommande la technique adoptée par Meyer et al.,⁷⁷ qui inoculent les cobayes avec le matériel provenant de cinq écureuils fousseurs au maximum.

b) *Puces* : Plusieurs observateurs tels que Kitasato, la Commission de recherches sur la peste, Petrie & Todd, Jettmar (cités par Pollitzer⁸⁹) ont montré qu'il était d'ordinaire facile de recueillir des puces infectées pour effectuer des recherches de laboratoire, tandis qu'il était souvent malaisé, sinon impossible, de trouver des rongeurs atteints de peste, particulièrement à la fin d'une forte épidémie. Comme l'examen de frottis et la culture sont en règle générale impropres à identifier l'infection chez ces insectes, il était

souvent nécessaire d'avoir recours aux épreuves sur l'animal pour en avoir la preuve péremptoire.

Un premier essai d'examen des puces par le procédé des broyats de puces a été fait par Swellengrebel & Hoesen.¹⁰⁴ Ces auteurs étudiant 15.279 puces ont eu des résultats positifs avec 18 mélanges de puces broyées. Cependant la méthode n'a pas retenu l'attention jusqu'à ce qu'elle fût appliquée à nouveau en 1936 par Eskey⁸² pour déceler des foyers de peste chez des rongeurs sauvages en Californie. Depuis lors, le procédé a été largement exploité en vue du dépistage de l'infection chez les rats domestiques aussi bien que chez les rongeurs sauvages.

Il ne peut y avoir de doute que seul l'emploi sur une vaste échelle de l'un, ou mieux des deux derniers procédés mentionnés, donne toute sécurité pour affirmer l'existence de l'infection pesteuse dans une population murine déterminée.

Comparaison. Pour apprécier la valeur des tests effectués avec des mélanges de matériel suspect par comparaison aux autres méthodes d'examen des rongeurs et des puces, on doit reconnaître, quoique cela puisse sembler à première vue paradoxal, que l'extrême sensibilité de ces tests est de nature à limiter leur utilité. Comme ils peuvent se montrer positifs dans le cas où les mélanges contiennent seulement quelques bacilles pesteux virulents, voire même un seul, ils témoignent sans conteste de l'existence de la peste chez les rongeurs ou les puces examinés, mais ils ne donnent pas d'indication sur l'incidence plus ou moins grande de l'infection. Ce second point peut être négligeable dans certaines circonstances, par exemple au cours d'enquêtes sur les rongeurs sauvages effectuées sur des territoires étendus, mais il est d'un intérêt particulier quand on étudie les manifestations de la peste dans des localités déterminées où l'efficacité de la lutte contre les épidémies est commandée par des informations complètes sur l'évolution de l'infection. Dans ces conditions, ce serait une erreur de négliger les méthodes valables d'examens des rongeurs individuels et de s'en tenir aux méthodes des mélanges.

Comme on l'a signalé plus haut, le procédé qui consiste à utiliser des broyats de puces a le grand avantage d'être applicable même lorsque le nombre des rongeurs a été fortement réduit par suite d'une sévère épizootie. De plus, comme les puces ne sont pas simplement des vecteurs mais aussi, à un très haut degré, des réservoirs du virus pesteux, on est fondé à attendre, avec les broyats de puces, des résultats positifs pendant les saisons interépidémiques, alors qu'il peut être difficile ou même impossible de mettre en évidence la persistance de l'enzootie murine. On doit admettre également que l'examen de mélanges de puces est plus expéditif et moins dangereux que celui des mélanges d'organes.

En conséquence, on ne sera pas surpris d'apprendre que certains auteurs mettent toute leur confiance dans la première méthode, et considèrent

l'examen systématique des mélanges de tissus comme généralement superflu. Récemment Humphreys et al. ⁵⁷ ont souscrit à ce point de vue parce qu'ils ont trouvé que l'étude parallèle de 5.019 mélanges d'organes et de 4.641 broyats de puces n'avait donné de résultats discordants que dans trois opérations où les mélanges d'organes s'étaient montrés positifs et les broyats de puces négatifs. Cependant, en précisant que dans deux des trois cas, une unique puce par animal avait été recueillie, Humphreys et ses collaborateurs admettent la valeur des tests effectués avec les mélanges de tissus lorsque les rongeurs en cause sont indemnes ou presque indemnes d'ectoparasites. Il ne faut pas oublier non plus que les résultats positifs consécutifs à l'inoculation de broyats de puces sont susceptibles de donner lieu à erreur d'interprétation, car les rongeurs intéressés peuvent avoir été parasités par des puces d'espèces sensibles à la peste, sans contracter eux-mêmes la maladie. Par conséquent, il apparaît que l'examen des mélanges d'organes, puisqu'il sert à contrôler les résultats obtenus avec les broyats de puces, doit être pratiqué parallèlement à ces derniers, au moins périodiquement sinon systématiquement.

Techniques

Dans l'étude de la technique de l'examen des rongeurs, on peut concentrer son attention sur les méthodes applicables aux rats domestiques qui constituent, dans la plupart des pays où sévit la peste, la presque totalité du matériel à manipuler; au reste, les procédés à adopter avec d'autres espèces de rongeurs ne diffèrent guère de celles-là.

Collecte et livraison des rats

Si les rats trouvés morts ou tués par la population sont utilisables pour l'examen, ils doivent de préférence être placés dans des sacs individuels en papier ou bien être enveloppés séparément dans du papier, pour le transport au laboratoire.

Un autre procédé adopté en Chine consistait à placer aux points stratégiques des quartiers pesteux de larges baquets métalliques, des boîtes en bois ou encore de larges jarres en terre, le tout muni de couvercles. La population était invitée à déposer les rongeurs morts dans ces récipients collectifs. Ceux-ci étaient visités deux fois par jour; les rongeurs étaient emportés au laboratoire dans des boîtes métalliques fermées. Dans les localités atteintes de peste et où la population était réticente, on parvenait à obtenir des rats morts en allouant des primes aux agents du nettoyage pour la livraison des cadavres qu'ils découvraient eux-mêmes dans les ordures.

Les rats qui sont pris dans des pièges à ressort doivent être transportés au laboratoire dans des sacs individuels en papier ou en toile. Récemment,

à ce sujet Gross & Bonnet ⁴⁹ ont recommandé le procédé particulier suivant : les opérateurs, prenant soin de ne pas toucher les animaux, les libèrent en saisissant le piège par la base et en détendant le ressort qui immobilise le rongeur ; celui-ci tombe alors dans un récipient approprié. Si l'on se propose d'examiner les puces, le rongeur récupéré est mis dans un sac en papier où l'on a projeté la valeur d'une cuiller à thé de cyanure de calcium ; le sac est ensuite agité et fermé hermétiquement par en haut. Un autre procédé consiste à placer les rongeurs dans des bidons contenant du kérosène.

Les trappes dans lesquelles les rats ont été capturés vivants doivent être enfermées dans des sacs en toile pour le transport au laboratoire.

Comment tuer les rats capturés vivants

Omar ⁸⁵ a décrit un grand nombre de procédés qui ont été préconisés pour tuer les rats apportés vivants au laboratoire ; les procédés suivants sont à recommander :

Submersion. Le procédé qui consiste à noyer les rongeurs dans l'eau ou dans d'autres liquides est assurément le plus vulgaire ; il est du moins économique et efficace, d'autant plus qu'il facilite la récolte des puces. L'emploi de liquides antiseptiques au lieu d'eau ne présente pas d'avantages essentiels et doit être proscrit quand on a l'intention d'utiliser les puces pour effectuer des cultures ou des inoculations de broyats.

Liquides volatils. On peut très simplement et avec succès tuer les rats dans les trappes renfermées dans des sacs en toile en plaçant chaque sac contenant la trappe dans une caisse ou dans un récipient métallique de dimensions convenables. On ouvre partiellement le sac et on y introduit un tampon de coton préalablement immergé dans un liquide volatil comme le chloroforme, l'éther ou la gasoline. Le récipient est ensuite fermé pendant 20 minutes environ ; ce délai suffit à tuer le rat et au moins à engourdir les puces. La gasoline est le moins cher des liquides volatils qui conviennent et l'on doit lui donner la préférence parce que, d'après Eskey & Haas, ⁸⁴ le chloroforme ou l'éther peuvent avoir un effet nocif sur le pouvoir infectant des puces.

Gaz toxiques. Les rats capturés aussi bien que leurs puces peuvent être exterminés aisément à l'aide du cyanure de calcium. Pour cela, les trappes dans leurs sacs en toile qui auront d'abord été ouverts sont placées dans un récipient métallique ou dans une boîte en bois pourvu d'un couvercle bien ajusté et d'une couverture adéquate permettant d'y projeter le toxique en poudre après la fermeture hermétique du récipient.

Les rats et leurs puces sont tués rapidement et, si l'on dispose d'un récipient de volume suffisant, plusieurs nasses peuvent être traitées en même temps.

Le cyanure de calcium convient également pour traiter les rats morts livrés au laboratoire, particulièrement ceux qui ne sont pas inclus dans des sacs. A cet effet, une couche du produit est étendue dans un seau métallique muni d'un couvercle exactement ajusté. Les cadavres de rats sont placés sur le cyanure et seront maintenus dans le récipient clos, de préférence pendant toute la nuit. Avant de les retirer le matin, le récipient sera laissé ouvert pendant au moins 15 minutes. En cas d'épizootie sévère, le produit peut être appliqué une fois encore avant la ventilation du récipient.

Pour prévenir des accidents, ces techniques doivent être appliquées à l'air libre par des opérateurs expérimentés.

Récolte des puces

Avant de pratiquer toute dissection, il est nécessaire de débarrasser les rongeurs des puces et autres ectoparasites. On y parvient facilement en brossant et en peignant à fond toutes les parties de la fourrure des cadavres. Ces opérations sont effectuées avec le maximum de garanties, soit dans un bassin émaillé blanc, large et profond, soit en tenant ou en suspendant les rats au-dessus d'une large cuvette émaillée blanc, remplie d'eau. Au préalable, on peut d'abord plonger les rats dans l'eau; certains travailleurs préfèrent les maintenir sous l'eau pendant le brossage et le peignage.

Les puces et tous autres ectoparasites récoltés sur chaque rat sont mis séparément dans un tube bien bouché en attendant leur classification et l'établissement des indices.

Dissection et préparation du matériel

Il serait superflu de traiter en détail la technique de la dissection du rat qui est exécutée selon les méthodes généralement adoptées pour l'autopsie des petits animaux de laboratoire, quoique avec des précautions spéciales, indiquées page 259. Cependant il faut souligner la nécessité d'étudier avec un soin tout particulier les ganglions lymphatiques des cadavres suspects de peste. La recommandation faite par la Commission de recherches sur la peste, de sectionner les muscles pectoraux pour dégager les ganglions axillaires, a déjà été signalée au chapitre 4 ainsi que le conseil donné également par la Commission d'examiner la surface de section des ganglions, même de ceux qui à première vue semblent indemnes. On doit rechercher avec soin, outre les ganglions superficiels, les ganglions lymphatiques profonds, cervicaux, mésentériques, rétro-péritonéaux et pelviens.

Des préparations par frottis ou par impression seront exécutées non seulement à partir des ganglions lymphatiques anormaux, mais aussi avec le sang du cœur, la rate, le foie et les poumons; ces opérations seront toutes faites sur une même lame, d'où économie de temps et de matériel. Les prélèvements destinés aux cultures et aux inoculations de mélanges de

broyats d'organes seront faits sur n'importe quel bubon aussi bien que sur un ou plusieurs des organes internes ci-dessus mentionnés; s'il y a putréfaction, on aura recours à la moelle osseuse.

Enregistrement des résultats

D'après les recommandations formulées dans les instructions contre la peste publiées par l'Office International d'Hygiène Publique en 1937,⁸² des états journaliers seront tenus, indiquant *a)* le nombre de rats et autres rongeurs examinés, classés par espèce; *b)* le nombre de mâles, de femelles et de femelles gravides, dans chaque espèce; *c)* le nombre de rats trouvés infectés dans chaque espèce.

Ces chiffres et leurs totaux servent à calculer les indices pesteux, c'est-à-dire les pourcentages de rongeurs reconnus infectés dans chaque espèce et au total. Comme il est opportun d'établir des graphiques sur la base de ces données numériques, il sera préférable de ne tenir compte, à cet effet, que des moyennes de cinq jours au lieu des chiffres quotidiens (Shih & Pollitzer ⁹⁶).

Examen des puces

Bien que l'expérimentation sur l'animal avec des broyats de puces soit d'une valeur considérable dans les recherches sur la peste, les possibilités de tirer avantage des méthodes bactériologiques pour l'examen des puces suspectes sont plutôt limitées. Webster ¹¹³ a prétendu que les frottis de puces isolées et écrasées pouvaient être colorés et examinés en vue de la recherche de micro-organismes ressemblant aux bacilles pesteux, mais une assez faible proportion seulement de puces pesteuses sera ainsi décelée; et encore la morphologie est-elle insuffisante pour entraîner la conviction. Tiflov ¹⁰⁶ a recherché quelle méthode de culture convenait au mieux à l'identification de la peste chez les puces; pour cela, il a opéré avec des suspensions préparées en broyant de 26 à 100 puces vivantes sur des rongeurs sauvages (*Ceratophyllus consimilis* ou *Ctenophthalmus wagneri*), chaque lot contenant au moins une puce infectée. Les résultats obtenus, d'une part, en inoculant à des cobayes par voie intramusculaire une partie des suspensions et, d'autre part, ceux fournis par la culture ont été les suivants :

<i>Méthode</i>	<i>Nombre de tests effectués</i>	<i>Nombre de résultats positifs</i>
Inoculation au cobaye	40	39
Culture sur gélose	39	33
Culture sur gélose au sang	39	37

Cependant les résultats enregistrés par la plupart des autres expérimentateurs qui ont ensemencé des suspensions de puces écrasées ont été si décevants qu'il a été recommandé de disséquer le proventricule et l'estomac des puces suspectes et d'en prélever le contenu pour les ensemencements

sur milieux nutritifs. Par cette technique, les résultats ont été satisfaisants à la fois avec les puces prises isolément (Gore⁴⁷), et avec des mélanges provenant de 60 à 70 puces (Bichkov & Borzenkov¹⁰), mais ce procédé est beaucoup trop délicat pour convenir à l'expérimentation en série. Aussi les épreuves sur l'animal restent-elles la méthode de choix pour l'examen courant des puces que l'on soupçonne infectées de peste.

EXAMENS DANS LA PESTE HUMAINE

Malades

Peste bubonique

Ponction. La ponction des bubons pour recueillir du matériel en vue du diagnostic bactériologique de la peste bubonique est une méthode qui a été mise largement à profit; toutefois, diverses objections ont été soulevées.

Certains auteurs ont fait remarquer qu'au stade aigu de la maladie il était difficile de récolter par ponction une provision suffisante de matériel pour pratiquer les examens. On notera toutefois que cet inconvénient sera facilement surmonté si, comme l'a recommandé Girard,³⁹ l'aiguille et la seringue sont soigneusement rincées après la ponction avec un peu de solution physiologique; celle-ci est alors utilisée pour effectuer les tests. On a parfois suggéré d'injecter au préalable quelques gouttes de soluté salin stérile ou de bouillon à l'intérieur même du bubon et d'aspirer ensuite; ce procédé est moins recommandable, car il est de beaucoup plus pénible à supporter par le patient.

On a également fait remarquer que, même à la phase aiguë de la maladie, la méthode pouvait se montrer défailante si l'on ponctionnait dans la zone d'œdème souvent très apparente qui masque les ganglions atteints, au lieu d'effectuer la ponction au sein même de l'adénite.^b On a souligné encore qu'au cours d'une évolution favorable, les microbes spécifiques diminuaient de nombre dans les bubons pour disparaître ensuite complètement et que les ponctions tardives ne permettaient souvent pas de confirmer le diagnostic de peste. C'est le cas, en particulier, des bubons supprimés.

Enfin, on a exprimé la crainte que la ponction des bubons pesteux ait des conséquences fâcheuses en facilitant le passage de l'infection dans le courant lymphatique ou sanguin; cette opinion est très discutable étant donné que l'ablation de bubons pesteux a été jadis pratiquée avec succès comme traitement de la maladie; reconnaissons cependant que cette opération est plutôt douloureuse.

Hémoculture. Plusieurs observateurs, auxquels la ponction du bubon n'a pas donné satisfaction, ont conseillé de recourir pour le diagnostic de

^b Comme Smidt¹⁰¹ l'a fait justement remarquer, la sérosité retirée par ponction doit renfermer de nombreuses cellules aussi bien que des bacilles pesteux; l'absence de cellules indique que les bubons n'ont pas été atteints par l'aiguille.

la peste bubonique, à l'hémoculture précoce. Dans ce but, certains tels que Bonebakker¹⁴ ont recommandé les milieux biliés; des auteurs sud-américains comme da Silva⁹⁸ et Barreto & Castro³ ont préféré inoculer directement le sang des malades aux animaux d'épreuve, par voie intrapéritonéale.

Il a été signalé au chapitre 4 que des résultats particulièrement rapides pouvaient être acquis par ce dernier procédé si, comme l'a proposé Gotschlich,⁴⁸ on prélève *in vivo* dans la cavité péritonéale des animaux infectés le matériel pour l'examen microscopique et la culture.

Des méthodes de séro-diagnostic peuvent venir compléter les précédentes (voir page 256).

Evaluation. Pour comparer utilement la valeur de ces méthodes, il faut se souvenir qu'un diagnostic précoce de la maladie est indispensable, car pour donner leur maximum d'efficacité, les médicaments dont on dispose maintenant doivent être administrés aussi tôt que possible. Considérant que dans la peste bubonique l'atteinte ganglionnaire précède la septicémie, il semblerait à priori que l'examen du prélèvement obtenu par ponction du bubon dût être préféré à l'hémoculture en vue d'un diagnostic rapide, et plus encore au séro-diagnostic qui ne peut répondre positivement qu'après le développement du processus morbide. Or, cette remarque ne vaut que pour l'examen de frottis de la sérosité retirée du bubon, parce que la confirmation du diagnostic par les cultures et les épreuves sur l'animal exige autant de temps que s'il s'agit du sang du malade.

La mise en évidence de bacilles nombreux et caractéristiques sur des frottis exécutés à partir du bubon permet d'étayer le diagnostic, mais on se demande si cet examen ajoute à la forte présomption que donne immédiatement, dans les cas typiques, le seul examen clinique. On a, en fait, l'impression que la ponction du bubon suivie de l'examen de frottis, et les tests subséquents d'identification, ne sont vraiment indiqués que dans les cas cliniques douteux ou lorsqu'il s'agit d'affirmer un diagnostic dans une localité jusqu'alors indemne de peste. Ordinairement, la décision d'entreprendre, ou non, le traitement sera basée sur les données cliniques; l'examen du sang, ou (en particulier dans les cas bénins et dans ceux où un traitement précoce aura été institué) les épreuves de séro-agglutination, seront pratiquées pour confirmer le diagnostic.

Peste pneumonique primaire

Il est facile de faire le diagnostic de peste pneumonique primaire dès la première expectoration pathognomonique, diagnostic solidement étayé sur l'examen d'un frottis de crachat qui, dans les cas typiques, révèle une abondance de bacilles caractéristiques. Les cultures et les épreuves sur l'animal effectuées avec ces crachats donnent une réponse relativement rapide.

Comme on le verra plus tard, la peste pneumonique primaire débute par un stade de 20 à 24 heures environ, pendant lequel la toux est absente ou insignifiante, sans expectoration caractéristique. A ce stade, les bacilles pesteux sont, soit entièrement absents de l'expectoration ou de la salive, soit présents en si petit nombre parmi une flore abondante et variée qu'ils sont difficiles à reconnaître. Cliniquement, les malades manifestent des signes d'infection générale aiguë mais pas de processus pulmonaire évolutif. A ce stade de la maladie, il est par conséquent difficile ou impossible de porter un diagnostic avec certitude. Si la peste est en cause, l'observation clinique suivie et l'examen des crachats renouvelé à de fréquents intervalles conduiront éventuellement au diagnostic. Il est clair cependant que pendant les épidémies, et particulièrement quand on observe des malades qui ont été en contact avec des victimes de peste pulmonaire, il est impérieux de ne pas attendre cette confirmation, mais d'entreprendre un traitement énergique dès que l'on soupçonne l'éventualité de cette affection.

Peste septicémique

Le diagnostic de peste sans bubons apparents ou sans manifestation pulmonaire ne présente aucune difficulté au stade terminal de la maladie, car il est alors possible de voir une multitude ou au moins un nombre appréciable de bacilles sur les frottis de sang. Au début de la maladie, les microbes y sont rares; la symptomatologie est celle d'une infection générale aiguë et, de ce fait, n'a rien de pathognomonique. Cependant, ainsi que l'ont signalé Bouffard & Girard,¹⁵ la ponction du foie pourrait être utilisée avec avantage à ce stade; il est intéressant de souligner que Goldstein⁴⁶ a pratiqué avec succès la ponction des poumons dans des cas de peste pulmonaire sans signe évident de pneumopathie. Conseil & Durand²² ont eux aussi recommandé la ponction pulmonaire dans les cas de pneumopeste sans expectoration, en particulier chez les enfants qui, en règle générale, ne crachent pas.

Le diagnostic de peste septicémique peut être aisément établi au laboratoire au moyen de la culture ou des épreuves sur l'animal avec le sang prélevé même au début de la maladie, mais la réponse du laboratoire sera trop tardive pour une action thérapeutique efficace, les malades étant déjà moribonds ou même morts. Le seul espoir réside dans l'entreprise d'un traitement énergique dès que l'on soupçonne l'infection.

Cadavres

Lorsqu'il est possible de pratiquer l'autopsie complète, on n'aura pas de difficulté à poser d'emblée le diagnostic de peste bubonique typique, même si on ne l'a pas soupçonnée, parce que les signes caractéristiques

d'une adénite de type hémorragique ne se rencontrent qu'exceptionnellement dans d'autres étiologies (van den Berg & Vos ⁴).

On peut par contre laisser beaucoup plus aisément les cas où les lésions ganglionnaires ne sont pas nettes, à moins que l'on garde présente à l'esprit l'éventualité de la peste et que l'on recoure aux épreuves de laboratoire adéquates.

Il en est de même pour la confirmation des cas d'infection respiratoire primitive quand les lésions pneumoniques sont légères, parfois même absentes. Dans la peste pneumonique primaire, les lésions des poumons et des plèvres sont tellement particulières qu'elles entraînent sinon un diagnostic immédiat, au moins la suspicion d'un processus non habituel qui impose de sérieux examens bactériologiques. Toutefois, il ne faut pas oublier que dans certaines infections, notamment la grippe, on peut trouver des lésions pulmonaires importantes qui ne sont pas sans analogie avec la peste pulmonaire; dans certains cas, on a même découvert des microorganismes ressemblant étroitement à *P. pestis*, chez des sujets qui présentaient à l'autopsie des signes de pneumonie (Pollitzer ⁸⁹).

Il est souvent impossible de pratiquer des autopsies complètes dans des circonstances où l'on soupçonne un décès par peste non seulement par manque de moyens, mais surtout en raison des préjugés populaires. Dans ces cas, diverses méthodes ont été recommandées pour obtenir du matériel destiné aux recherches de laboratoire.

Excision

Au lieu d'autopsies complètes, des auteurs comme Lefrou ⁶⁴ et, plus récemment, Macchiavello ⁷¹ ont conseillé l'excision des bubons ou le prélèvement de fragments d'organes particuliers (par exemple le foie, la rate ou — s'il y a soupçon de peste pulmonaire — les poumons), mais il est à craindre que ces pratiques, malgré leur simplicité, soient mal acceptées dans les pays où toute mutilation des cadavres inspire de l'horreur. A cet effet, on retiendra la possibilité d'éviter la dissection en se servant du viscérotome, ainsi que l'ont fait avec succès en Equateur des auteurs spécialisés dans l'étude de la peste.¹²

Ponctions

La ponction de divers organes sur le cadavre est un procédé qui a été beaucoup utilisé pour obtenir du matériel en vue des examens de laboratoire. S'il s'agit de peste bubonique, on conseille à l'ordinaire la ponction du bubon, mais on peut recourir aussi avec succès, dans la peste bubonique comme dans la peste septicémique, à la ponction du foie (Bouffard & Girard ¹⁵). S'il s'agit de peste pulmonaire, les auteurs, bien qu'ayant émis des opinions quelque peu divergentes, conseillent pour la plupart de ponctionner les deux poumons à divers étages de la cage thoracique, ainsi que le

foie et le cœur (Girard ; ^{38, 40} Petrie ; ⁸⁷ Kamal ⁵⁹). Ces techniques ont été recommandées à la suite de certains échecs enregistrés lorsque le prélèvement était effectué dans des parties des lobes pulmonaires non atteintes par l'hépatisation (Wu Lien teh ¹¹⁴).

En règle générale, un résultat négatif avec le matériel retiré par ponction des organes sur un cadavre n'exclut pas la possibilité d'une mort consécutive à la peste, notamment si l'on s'est borné, pour étayer le diagnostic, aux examens de frottis. D'un autre côté, en raison de la présence fréquente, dans les cadavres, de germes colimorphes et autres microorganismes ayant des analogies avec *P. pestis*, la pratique exclusive d'examens de frottis peut conduire à des résultats faussement positifs. C'est ainsi que des bacilles Gram-négatifs apparemment suspects se voient sur les frottis de prélèvements provenant du tractus gastro-intestinal ponctionné par erreur au lieu du foie ou de la rate par des opérateurs inexpérimentés. Cependant, sur de telles préparations, les éléments cellulaires font le plus souvent totalement défaut.

Vincke ¹¹² et Girard ^{40, 41} ont recommandé un procédé utile qui facilite les épreuves sur l'animal avec les prélèvements obtenus par ponction de cadavres. Il consiste à laver la seringue, après la ponction, avec du soluté salin stérile et à inoculer ce liquide au cobaye. Vincke ponctionne à plusieurs reprises les bubons ou les divers organes, lave l'aiguille et la seringue après chaque ponction dans 3 ml de soluté salin stérile contenu dans un flacon de 10 ml et se sert de ces suspensions pour infecter des cobayes par friction de la peau rasée avec des tampons de coton. Il a trouvé que le matériel prélevé de cette façon dans les 24 heures après la mort était utilisable pendant 5 jours à condition que la température ne dépasse pas 35°C. C'est une méthode analogue qu'emploie Girard en prélevant le matériel par ponction de tout bubon apparent aussi bien du foie que des parties supérieures, moyenne et inférieure de chacun des poumons.

Examen de la moelle osseuse

Plusieurs auteurs ont eu des résultats satisfaisants en utilisant pour les tests de laboratoire la moelle osseuse de cadavres suspects de peste. C'est ainsi que Ramos Diaz ⁹¹ a pu faire le diagnostic rétrospectif d'une épidémie de peste pulmonaire au Pérou par l'examen de la moelle osseuse d'une côte prélevée sur une des victimes qui avait été inhumée depuis deux mois.

Certains auteurs en Amérique du Sud ont préconisé le prélèvement de la moelle osseuse sur les cadavres par « digitomie », c'est-à-dire l'amputation d'un doigt (de préférence l'index, le plus simple à amputer), et l'ouverture de la deuxième ou de la troisième phalange. Lobo & Silvetti ⁶⁹ ont trouvé que ce matériel ne convenait pas pour l'examen de frottis parce que trop pauvre en bacilles pesteux, mais ils ont eu plus de succès avec la culture et les inoculations aux animaux.

Alvarado,¹ discutant de la technique de la « digitomie », recommandait de désinfecter le doigt avant l'amputation avec de l'alcool. Après l'intervention qui pouvait être pratiquée en toute sécurité sans gants de caoutchouc, la plaie opératoire était recouverte d'un tampon de coton imbibé de formol et fixé par une bande, ou encore, la main était simplement placée sous les vêtements du cadavre. L'extraction de la moelle osseuse était quelque peu malaisée, mais elle était facilitée si la section de l'os était faite longitudinalement et non transversalement. Alvarado a suggéré de rendre la « digitomie » obligatoire dans les régions où sévit la peste dans tous les cas de mort survenus après une maladie aiguë d'une durée de moins de dix jours.

La méthode a été recommandée également par Barreto & Castro.³ Ces auteurs ont conseillé d'utiliser la moelle osseuse extraite immédiatement après amputation pour l'ensemencer sur un tube de gélose sulfitée, fermé d'un bouchon paraffiné et expédié au laboratoire. Le même procédé était employé pour expédier les prélèvements obtenus par ponction du bubon ou par section veineuse.

Il y a tout lieu de craindre que la pratique de ces méthodes d'extraction de moelle osseuse se heurte à une forte opposition dans certains pays affectés par la peste. Cependant il serait possible, en pareilles circonstances, de recueillir la moelle osseuse pour examen post mortem par ponction sternale comme on le fait en clinique.

A ce sujet, on notera que Modica⁷⁹ a obtenu des résultats positifs chez 10 des 12 malades de peste dont il avait examiné la moelle osseuse prélevée par ponction sternale.

Conservation du matériel

Il est capital de s'assurer que le matériel à expédier pour étude parvient dans de bonnes conditions aux laboratoires souvent très éloignés, non seulement dans le cas d'infection de rongeurs sauvages, mais encore de peste murine qui tend de plus en plus à se manifester dans les localités rurales, à plus ou moins grande distance du siège des laboratoires.

On a déjà signalé que certains auteurs, plutôt que de se fier aux méthodes de conservation, préféraient utiliser le matériel à examiner immédiatement après son prélèvement pour procéder à des cultures (voir Barreto & Castro³) ou pour inoculer des animaux d'épreuve (voir Devignat²⁵ et van Riel & Mol⁹²). Mais, pour diverses raisons, il est souvent impossible de tirer avantage de ces procédés. Aussi est-il indispensable de préserver la vitalité et la virulence du matériel destiné aux laboratoires, soit par des moyens physiques, soit en les plaçant dans des liquides ou autres substances qui s'opposent à la putréfaction.

Dans la première catégorie, figurent divers procédés pour maintenir à basse température en cours du transport les produits à examiner.

C'est ainsi qu'en Argentine on utilise pour le transport des rats de larges caisses métalliques pourvues de doubles parois remplies de glace; ces caisses

peuvent contenir de 20 à 60 rats.⁸⁰ Henriques⁵⁵ recommande de mettre les tissus à expédier dans des tubes à essai fermés avec des bouchons paraffinés et d'inclure ces tubes dans des bouteilles isolantes remplies de glace pilée. Une méthode similaire est employée aux Etats-Unis d'Amérique (Link⁶⁷). Macchiavello & Paracampos,⁷² étudiant la viabilité et la virulence de *P. pestis* sous les tropiques, ont signalé que si des organes de cobaye ou de rat étaient conservés à la glacière, la survie des bacilles pesteux était plus longue dans la rate que dans le foie car dans cet organe, l'autolyse, défavorable aux germes, survient rapidement. Pour cette raison, certains laboratoires ne recommandent pas l'envoi de fragments de foie en vue d'examen.

Il est évident que la conservation dans la glace de cadavres et d'organes suspects de peste ne peut être utile que si les distances à parcourir ne sont pas excessives et si l'on dispose de moyens de transport rapides. Ce n'est pas toujours le cas et, de plus, dans de nombreux foyers ruraux de peste, la glace fait défaut. La proposition récemment faite par Amies² d'employer du sel ordinaire au lieu de glace doit, en conséquence, être prise en considération. Sa méthode consiste à mettre les cadavres suspects dans un bocal muni d'une fermeture à vis, d'ajouter 60-80 g de sel et d'agiter le bocal pour s'assurer que le sel recouvre le cadavre. L'examen de la moelle osseuse d'animaux conservés de cette manière a donné les meilleurs résultats. Ils ont été positifs même après 67 jours de conservation.

Broquet a préconisé la conservation des organes présumés pesteux dans un liquide composé de 20% de glycérol et de 2% de carbonate de calcium. Il a établi que *P. pestis* restait virulente dans les organes conservés de cette manière¹⁶ pendant des périodes allant jusqu'à 13 jours. La valeur de cette méthode a été confirmée par plusieurs auteurs. Uriarte & Morales Villazon¹¹⁰ ont rapporté à ce sujet que dans les rates d'animaux infectés expérimentalement, et maintenues dans le liquide de Broquet, soit à la température du laboratoire soit au frigidaire, les bacilles pesteux restaient habituellement virulents de 12 à 19 jours, quelquefois même davantage. Prado jr.⁹⁰ a été satisfait du liquide de Broquet pour l'expédition au laboratoire des ganglions lymphatiques de rats suspects de peste. A leur arrivée, les tissus étaient placés sur du papier filtre stérile de façon à enlever l'excès de glycérol; ils étaient ensuite utilisés pour inoculer les animaux d'épreuve par voie cutanée ou sous-cutanée. Issaly & de Issaly⁵⁸ recommandent la formule suivante pour préparer le liquide de Broquet : 20 ml de glycérol pur neutre (30° Baumé), 2 g de carbonate de calcium et eau distillée q.s.p. 100 ml. Le liquide est stérilisé pendant 10 minutes à 100°C et mis alors en flacons dont les bouchons sont stérilisés par la chaleur sèche et imprégnés ensuite avec de la paraffine fondue stérile, pour prévenir le développement de moisissures. Ces auteurs ont trouvé que les rates extraites même deux jours après la mort de cobayes infectés expérimentalement renfermaient des bacilles pesteux virulents pendant 15 jours lorsqu'elles étaient conservées dans ce liquide. Ils ont recommandé son emploi pour expédier au laboratoire les

organes d'animaux suspects de peste, de préférence la rate ou la moelle osseuse. Pour prévenir l'acidification du liquide, laquelle, au même titre que les moisissures, réduit son efficacité, ils conseillent de le tamponner avec un mélange de phosphate disodique et d'acide citrique (respectivement 1,1046 g et 0,0230 g par 100 ml de liquide).

Devignat²⁴ et Henriques⁵⁵ ont établi que les animaux d'épreuve pouvaient être infectés avec des broyats de puces pesteuses conservées dans le milieu de Broquet pendant des périodes allant jusqu'à 6 jours.

De bons résultats ont été obtenus également en substituant au liquide de Broquet des solutions salines, pour la conservation d'organes ou de puces suspects de peste. Webster,¹¹³ qui semble avoir été le premier à proposer cette méthode, recommandait, dans le cas de cadavres frais, de prélever quelques gouttes de sang du cœur à l'aide d'une pipette stérile, après cautérisation de l'endroit choisi, et de les mélanger à un millilitre de solution citratée stérile dans un petit tube à essai. Ces échantillons étaient utilisables au laboratoire pendant quelques jours.

Comme l'a démontré Girard,³⁹ les suspensions en eau salée physiologique obtenues par ponction d'organes des animaux infectés expérimentalement, faites de 3 à 10 heures après la mort avec rinçage de la seringue, restaient virulentes jusqu'à 6 jours lorsqu'elles étaient conservées à une température de 16° à 26°C, mais pendant 3 jours seulement à 37°C. Les suspensions faites après 48 heures à partir des cadavres d'animaux maintenus à dessein pendant ce délai à 21°C restaient virulentes pendant 24 heures seulement, mais les organes de tels animaux étaient encore infectants après 3 jours.

Eskey & Haas^{33, 34} ont préconisé la solution de chlorure de sodium à 2% pour l'envoi des puces au laboratoire. Cette concentration, tout en empêchant le développement des germes de souillure, n'est pas nuisible au bacille pesteux. Meyer⁷⁵ a même employé l'eau salée à 3% pour expédier les puces pendant l'été, mais il prenait soin de les laver dans la solution physiologique avant de les broyer pour les inoculer à l'animal d'épreuve.

Les procédés de conservation des organes suspects de peste dans la paraffine à un point de fusion de 42°-44°C (Henriques⁵⁵) ou dans des mélanges d'huile de vaseline et de vaseline (ou lanoline ou paraffine), suivant les formules données par Berlin & Bacheva,⁵ n'ont été que peu utilisés. Pour différentes raisons, Girard⁴² a estimé que cette dernière méthode n'offrait pratiquement qu'un intérêt restreint.

Résumé des méthodes de diagnostic et de diagnostic différentiel

Les méthodes de laboratoire employées pour le diagnostic et le diagnostic différentiel de la peste ont déjà été discutées aux chapitres 3 et 4. Néanmoins, il semble opportun de les résumer ici et en même temps d'indiquer leur valeur respective.

Tests de mobilité

En traitant la bactériologie de la peste, il a été souligné que les tests de mobilité pour le diagnostic différentiel n'avaient pas une spécificité absolue puisque, si *P. pestis* est toujours immobile, *P. pseudo-tuberculosis*, mobile dans sa forme typique, peut occasionnellement être dépourvu de mobilité. En règle générale, ces tests ont cependant l'intérêt de confirmer rapidement le fait que des souches, par ailleurs suspectes mais qui sont mobiles, ne peuvent être des souches de peste.

Au lieu d'examen en goutte pendante, des auteurs ont recommandé la méthode de Levinthal⁶⁵ dont une variante a été décrite comme suit par Himmelfarb :⁵⁶

De petites gouttes de culture de *P. pestis* en bouillon sont disposées sans étalement sur une mince couche de gélose en boîte de Petri qui est mise à l'étuve à 20°C pendant 24 à 48 heures. Une lamelle est posée près d'une colonie bien repérée, et une seconde lamelle, dont l'un des bords repose sur la première, est inclinée au-dessus de la colonie. On introduit alors par capillarité avec une fine pipette Pasteur un peu d'eau salée sur la colonie. La mobilité est alors recherchée au microscope avec un fort objectif à sec ou à l'objectif à immersion.

Pour faciliter la distinction entre les mouvements browniens et la motilité vraie, Himmelfarb conseille de substituer à l'eau salée une solution de chlorure mercurique à 1/100, laquelle, sans aucun effet sur le mouvement brownien, a pour effet de rendre immobiles les microorganismes effectivement mobiles.

Frottis

Fixation. Le procédé classique de fixation des frottis à la flamme ne tue pas régulièrement les bacilles pesteux, et ceux qui sont ainsi fixés n'apparaissent pas toujours nettement colorés aux deux pôles. Pour ces deux raisons, nombre d'auteurs préfèrent fixer les frottis à l'alcool. Après séchage à l'air libre, ceux-ci sont traités pendant au moins une minute, soit par l'éthanol à 95 %, soit par mélange à parties égales d'éthanol et d'éther, ou mieux encore par le méthanol absolu ; ce dernier, non purifié ou dénaturé tel qu'il est employé comme combustible, peut également convenir. Si les lames à examiner sont nombreuses, il sera plus pratique de les immerger dans des boîtes à coloration remplies d'alcool. Après fixation, on égoutte l'alcool et les lames sont séchées. Certains auteurs conseillent de chasser l'alcool par lavage à l'eau avant de sécher les frottis à l'air ou à l'aide de papier buvard. Si les préparations doivent être envoyées à un laboratoire éloigné chargé de l'examen, il est préférable, d'après Webster,¹¹³ de les fixer à l'alcool pendant 10 minutes et, après séchage, de les expédier non colorées.

Coloration. Bien que divers auteurs recommandent des méthodes variées et parfois compliquées, on peut dire que, outre la méthode de Gram, les colorants simples en usage dans les laboratoires tels que la fuchsine phéniquée diluée, le bleu de Loeffler, la thionine phéniquée à 1 % donnent

toute satisfaction. Si la coloration bipolaire n'est pas suffisante, on traitera les préparations fixées à l'alcool par l'acide acétique à 0,5 % pendant 30 secondes avant la coloration (Gaffky cité par Dieudonné & Otto²⁸). Petragani⁸⁶ substitue au bleu de méthylène de Loeffler un colorant préparé en ajoutant à 10 ml d'eau distillée 2 à 3 gouttes de bleu de méthylène saturé à froid et 12 gouttes d'une solution à 1‰ d'acide lactique; la coloration est faite à une douce chaleur pendant une demi-heure.

La méthode de Gram est particulièrement indiquée pour l'étude des crachats, du pus de bubons ou de matériel provenant de cadavres humains ou d'animaux, car elle facilite la discrimination entre *P. pestis* Gram-négatif et d'autres microorganismes Gram-positifs, tels que le pneumocoque ou certains germes sporulés qui ont quelque analogie avec le bacille pesteux sur les préparations traitées par les colorants simples.

Webster¹¹³ a conseillé la modification apportée par Jensen à la méthode de Gram, tandis que de Smidt¹⁰¹ préconisait le procédé suivant :

Les frottis fixés à l'alcool sont colorés pendant 15 secondes par une solution composée de 1 g de crystal-violet, 10 ml d'éthanol absolu et 300 ml d'eau distillée; après lavage, les frottis sont couverts pendant quelques secondes avec le liquide de Gram jusqu'à coloration brune ou gris fer; puis on traite directement par l'acétone jusqu'à décoloration complète. Après un rapide lavage, le fond des préparations est coloré, par contraste, avec une solution de rouge neutre à 1 %.

Evaluation. Tous les auteurs récents sont d'accord pour estimer l'insuffisance des seuls examens de frottis pour établir le diagnostic de peste, en particulier tout au début d'une épidémie ou dans des cas sporadiques.

On a vu plus haut (page 234) que les cas d'infection « inapparente » dans lesquels les frottis sont négatifs alors que les épreuves sur l'animal se révèlent positives, sont fréquents chez les rongeurs. De même, les cultures ou les inoculations permettent parfois de porter le diagnostic de peste humaine dans des circonstances où les frottis ont été négatifs. La présence de bacilles pesteux de forme atypique peut également induire en erreur si l'on s'en rapporte uniquement à l'examen de frottis.

Par ailleurs, des investigations ne portant que sur des frottis risqueront souvent de suggérer un diagnostic de peste là où elle n'est pas en cause. D'autres *Pasteurellae* que *P. pestis*, dont la morphologie est analogue et même identique, ont maintes fois été vues chez les rongeurs et occasionnellement chez l'homme. En outre, dans les cadavres humains ou animaux en voie de putréfaction, des micro-organismes appartenant à des genres différents sont susceptibles de présenter au microscope des aspects semblables à ceux des *Pasteurellae* ; il en est de même de la flore microbienne des frottis de crachats de malades suspects de peste pneumonique où la présence de ces germes conduirait à des erreurs d'interprétation comme l'ont souligné certains observateurs, notamment de Smidt¹⁰¹ et Hennesey.⁵⁴

Les limites de l'examen des frottis ressortent nettement des expériences de Girard ⁴⁵ résumées ci-après, dans lesquelles le matériel obtenu par ponction sur des victimes humaines de la peste a été soumis à l'examen microscopique et aux épreuves sur l'animal :

Frottis;	Nombre total d'examens combinés	Epreuves sur l'animal		Inoculations positives (%)
		Positives	Négatives	
Positifs	781	690	91	88,3
Incertains	962	409	553	42,5
Négatifs	2.642	124	2.518	4,7

Malgré ses lacunes, l'examen des frottis est indispensable pour suivre l'évolution d'épizooties dûment confirmées. Ces examens sont aussi importants pour la découverte des cas de peste humaine, en particulier du type bubonique, qui ne s'imposeraient pas du seul point de vue clinique.

Cultures

Les méthodes de culture qui apparaissent d'une importance primordiale pour l'identification de *P. pestis* et pour sa différenciation des autres espèces bactériennes, peuvent être groupées sous 3 rubriques selon que l'on se propose de considérer soit :

- 1) les caractères morphologiques et culturaux;
- 2) les exigences nutritives;
- 3) les exigences d'une croissance sélective.

Caractéristiques morphologiques et culturelles. a) Formes d'involution : Il importe de noter, comme Hankin & Leuman ⁵² l'ont montré les premiers, que la culture du bacille pesteux sur gélose salée à 3 % provoque l'apparition de formes nettes d'involution. Les affirmations sur la spécificité de ce phénomène chez *P. pestis* à l'exclusion de *P. pseudotuberculosis* ne sont qu'insuffisamment étayées. Cependant, cultivée sur gélose à 3 ‰, *P. pseudotuberculosis* présente une morphologie différente de celle de *P. pestis*, dans les mêmes conditions.

Ainsi Topping et al. ¹⁰⁷ utilisant cette technique avec une souche de pseudotuberculose d'origine humaine ont observé des bâtonnets plus longs, des cocci et quelques éléments en massue, mais ils ont souligné que « ce n'était pas là le pléomorphisme caractéristique de la peste ». De même Haas ⁵¹ cultivant une souche de pseudotuberculose d'origine murine sur le même milieu salé a vu des formes d'involution qui se présentaient comme « des bâtonnets ordinairement longs, minces, légèrement incurvés ou des bâtonnets de taille moyenne rassemblés en paquets sous un aspect rappelant celui des bacilles diphtériques; les volumineuses formes rondes à pourtour coloré et ressemblant aux éléments en « ballon » communs chez *P. pestis* étaient plus rares.

De plus, il semble que, ainsi que l'a signalé pour la première fois Zlatogoroff (cité par Dieudonné & Otto²⁸) et le fait a été confirmé par d'autres observateurs,¹³ les formes involutives des bacilles pesteux sur gélose salée à 3 % apparaissent déjà après 24 heures, beaucoup plus rapidement que chez d'autres espèces bactériennes.

b) *Développement en « stalactite »*: Le développement particulier en grumeaux et en « stalactite » de *P. pestis* dans les cultures en bouillon ne peut plus être considéré comme un caractère valable de diagnostic différentiel parce qu'il n'est pas constant chez *P. pestis* et qu'il n'est pas exceptionnel chez les formes R de *P. pseudotuberculosis*. Cependant, la culture en bouillon d'une souche de peste identifiée garde sa valeur, car l'absence de trouble du milieu laisse présumer que la culture est pure.

Exigences nutritives. a) *Gélose ordinaire*: Pour distinguer les bacilles pesteux des bacilles pseudotuberculeux, on peut tirer avantage du fait que sur gélose ordinaire, les premiers poussent généralement discrètement en colonies isolées tandis que les derniers se développent abondamment après 24 heures d'incubation (Bezsonova et al.⁸). Pour s'en assurer, il faut avoir soin de faire des ensemencements suffisamment larges pour permettre au bacille pesteux de croître. D'autre part, il ne faut pas oublier que si le matériel ensemencé provient directement de l'animal ou de l'homme, l'apport de sang ou de sérosités organiques peuvent activer largement la culture de *P. pestis* sur gélose ordinaire.

b) *Ensemencements d'un nombre réduit de micro-organismes*: On a préconisé de nombreuses méthodes pour provoquer le développement de *P. pestis* au départ de quelques unités microbiennes; la plus simple, recommandée dans le *Report of the Haffkine Institute for the Year 1931*,¹⁰⁵ qui donne toute satisfaction pour les besoins du diagnostic et du diagnostic différentiel, est la suivante :

A l'aide d'une anse de 1 mm, on fait des dilutions du germe à l'étude dans des tubes contenant chacun 10 ml de soluté salin. Ensuite, des tubes de gélose au sang sont ensemencés par étalement d'anses de 1 mm avec ces dilutions, tandis qu'on opère de même sur des tubes de gélose ordinaire, mais avec des anses de 5 mm. S'il s'agit de bacilles pesteux, des colonies distinctes apparaissent sur la surface de la gélose au sang, mais aucune ne se développe sur la gélose ordinaire. Par contre, les bacilles pseudotuberculeux croissent également bien sur les deux milieux.

c) *Milieux « épuisés »*: Se référant à un travail antérieur de Fabiani,³⁵ Petragani⁸⁶ a préconisé pour la différenciation des bacilles pesteux d'avec les autres espèces bactériennes, l'emploi de vieux milieux sur lesquels des bacilles pesteux avaient cultivé et qui avaient été stérilisés, après addition d'un volume d'eau correspondant à l'évaporation. Les bacilles pesteux ne poussaient pas sur ces milieux « épuisés » alors que les autres germes s'y développaient normalement.

d) *Milieux « pauvres »*: Bezsonova⁶ (voir aussi Bezsonova et al.⁷) a constaté que la gélose « pauvre », sans peptone, permettait un diagnostic différentiel; le bacille pseudotuberculeux s'y développe aisément alors que le bacille pesteux y donne une culture très grêle ou même ne s'y multiplie pas du tout.

e) *Milieux biliés*: Il y a lieu d'ajouter que les milieux biliés, bien que n'étant pas indiqués pour différencier le bacille pesteux du bacille pseudotuberculeux, ont été utilisés avec avantage pour enrichir les hémocultures. Kirschner⁶⁰ a trouvé que la bile pure, recommandée antérieurement par La Rosa,⁶² stérilisée par filtration ou par la chaleur pendant 20 minutes à 110°C, convenait bien pour la culture préliminaire de sang ou de pus. Par cette méthode, un développement satisfaisant était obtenu avec de faibles ensemencements (10 à 40 bacilles pesteux par millilitre); en fait, même l'addition d'une goutte de sang à 5 ml de bile suffisait à mettre en évidence une légère bactériémie. Ohoto^{83, 84} a préconisé d'abord l'emploi du milieu bilié de Conradi & Kayser pour l'isolement de *P. pestis* par hémoculture, mais il a, par la suite, utilisé un milieu composé de 500 ml de bile de bœuf fraîche additionnée de 5 g de peptone. Ce milieu était stérilisé à l'autoclave pendant deux heures, réparti dans 50 tubes à essai et chauffé à nouveau pendant une heure.

Pour le travail courant, le procédé simplifié de Sokhey & Wagle¹⁰³ donne toutefois entière satisfaction. Il consiste à ensemencer 0,5 ml de sang, prélevé par ponction veineuse, sur deux tubes de gélose inclinée (0,25 ml par tube) qui sont ensuite laissés pendant 48 heures à la température du laboratoire.

Exigences requises pour une culture sélective. a) Basses températures: En vue d'isoler *P. pestis* de matériel souillé, on s'est inspiré de la propriété que possède ce micro-organisme de cultiver à basse température. Petragnani⁸⁶ recommande à cet effet l'incubation à 10°C, mais comme on l'a signalé lorsqu'il a été question de la culture de *P. pestis* sur gélatine, on a même utilisé la congélation des milieux ensemencés avec des produits contaminés.

b) *Milieux défavorables aux germes de souillure*: Outre la méthode ci-dessus mentionnée, la culture sur des milieux capables de contrarier le développement des germes contaminants a été recommandée lorsqu'on doit opérer avec du matériel souillé. Drennan & Teague²⁹ préconisent un milieu gélosé à base de cœur de bœuf auquel on ajoute 0,025 % de sulfite de soude et 0,00143 % de crystal-violet. De même, Meyer & Batchelder⁷⁶ recommandent l'addition de 0,025 % de sulfite de soude et de 0,0025 % de violet de gentiane à de l'extrait de cœur de bœuf — hormone gélosé. Kister⁶¹ utilise le milieu d'Endo pour les organes de rats en putréfaction, milieu qui s'oppose au développement de *Proteus vulgaris*, mais il est nécessaire de rechercher empiriquement les quantités de sulfite de sodium et de fuchsine

les plus favorables. Aussi l'emploi des deux premiers milieux mentionnés est-il plus pratique.

Réactions biochimiques

Substances hydrocarbonées. a) *Techniques:* Comme Pollitzer⁸⁹ l'a déjà montré dans un exposé critique, les milieux solides ont été utilisés pour étudier l'action de *P. pestis* sur les substances hydrocarbonées. Francis³⁷ a obtenu de bons résultats avec le milieu semi-solide de Enlows;³¹ cependant, pour ces réactions, la plupart des auteurs récents donnent la préférence aux milieux liquides. La technique adoptée par Chen,²⁰ sur le conseil de K. F. Meyer et Pollitzer, est la suivante : de l'eau peptonée à 1 % (préparée avec une marque de peptone ne contenant pas de fractions hydrocarbonées qui pourraient donner de faux résultats positifs) constitue le milieu de base; on lui ajoute les substances fermentescibles dans la proportion de 1%. On y incorpore l'indicateur d'Andrade et le pH final du milieu est ajusté à 7,4. Les cultures à éprouver sont d'abord ensemencées en stries à la surface d'une gélose au sang afin de déceler une contamination éventuelle; leur pureté étant confirmée, des anses de cultures sont mises en suspension dans les milieux appropriés et les tubes mis à l'étuve à 37°C. Conformément à la recommandation de de Smidt,¹⁰⁰ les cultures sont aérées journallement par agitation. Les cultures sont faites quotidiennement pendant une période de 21 jours. Pour s'assurer que ce procédé maintient la vitalité des germes, des repiquages sur plaques de gélose au sang sont effectués une fois par semaine, à partir de chacun des tubes.

Une autre source d'erreur possible à prévoir, notamment en pays tropical, c'est l'hydrolyse spontanée du saccharose, aussi faut-il contrôler en permanence la pureté du saccharose par la liqueur de Fehling (Devignat & Boivin²⁷).

Dans leurs récents travaux, Devignat & Boivin²⁷ ont tiré avantage de la « boîte à sucres », imaginée par le premier de ces auteurs.²⁶ Pour la pratique de cette méthode rapide et économique, Devignat & Boivin cultivent préalablement les souches de peste à éprouver dans 12 ml d'eau peptonée additionnée d'indicateur d'Andrade pendant 48 heures à 30°C. Ensuite, 0,5 ml de ces cultures est mis dans les tubes du dispositif, chacun contenant 0,5 ml d'un des hydrates de carbone en solution à 4% dans l'eau bi-distillée. Une période d'observation de 8 jours est estimée suffisante avec ce procédé.

En marge de ces différents tests, un procédé utile et d'exécution facile imaginé par Uriarte & Morales Villazon¹⁰⁹ retient encore l'attention. Ces auteurs emploient l'eau peptonée à 2% légèrement alcaline au tournesol, avec 8 g de glucose ou de lévulose et 4-6 ml d'une solution aqueuse de rouge neutre à 1%, par litre. Après stérilisation à 110°C, le mélange est réparti dans des tubes de Durham. Uriarte & Morales Villazon déclarent que la culture des bacilles pesteux dans ce milieu produit trois réactions caracté-

ristiques : a) une acidité légère avec un virage au jaune; b) l'absence de production de gaz; c) la formation d'un sédiment floconneux dans le fond du tube, le liquide surnageant restant clair. Ils prétendent qu'aucun des micro-organismes ayant quelque analogie morphologique avec *P. pestis* ne présente cet ensemble de réactions.

Devignat & Boivin,²⁷ tout en confirmant dans l'ensemble ces résultats, ont constaté dans 3 cas sur 36 un léger trouble au lieu d'un dépôt floconneux.

Un autre procédé simple, recommandé par Webster,¹¹³ consiste dans l'emploi d'eau peptonée à 1% contenant glucose, mannite, lactose et saccharose avec un indicateur. Après séjour de 48 heures à l'étuve à 37°C, il y aurait production d'acide, mais absence de gaz dans les tubes de Durham avec le glucose et la mannite, aucune modification ne survenant dans les tubes des milieux lactosés et saccharosés.

b) *Evaluation* : On a discuté précédemment de la valeur des tests effectués sur les milieux glycérolés, auxquels les premiers observateurs attachaient une valeur considérable pour différencier *P. pestis* de *P. pseudotuberculosis*. Ces tests ne peuvent plus être retenus comme valables. On a également insisté sur l'importance des réactions observées sur les milieux rhamnosés, mais à cet égard il faut signaler que : a) selon les observateurs russes, des souches de peste glycérol-positives isolées dans le sud-est de la Russie et en Asie centrale pouvaient être séparées en variétés acidifiant le rhamnose et en variétés rhamnose-négatives; b) l'acidification tardive au rhamnose par des souches de peste a été constatée; et c) Devignat & Boivin,²⁷ étudiant 40 souches isolées au Congo Belge, ont observé dans un cas une légère acidification du rhamnose. Il serait, par conséquent, imprudent de dénier toute identité avec *P. pestis* à une souche par ailleurs suspecte, du seul fait qu'elle ferait fermenter le rhamnose. Retenons cependant, et les exceptions de ce genre n'infirmant pas la règle, que, contrairement aux bacilles pseudotuberculeux, les bacilles pesteux (aussi bien que les *Pasteurellae* sensu stricto) n'acidifient pas les milieux rhamnosés.

Hydrogène sulfuré et indol. La recherche de l'hydrogène sulfuré et de l'indol n'offre qu'un intérêt restreint pour le diagnostic différentiel parce que ni la peste ni la pseudotuberculose ne produisent aucune de ces substances dans les milieux de culture. Webster¹¹³ a imaginé le dispositif simplifié suivant pour l'exécution de ces tests : On ensemence un tube d'eau peptonée à 1% avec les germes à éprouver, et quelques gouttes de solution d'acétate de plomb à 5% sont déposées sur la partie intérieure du bouchon qui doit être de coton blanc. S'il n'y a pas de dégagement d'hydrogène sulfuré, le coton ne noircit pas après 24 heures d'incubation à 37°C. Sur l'extrémité interne du bouchon de la même culture (recouvrir le bouchon avec une nouvelle couche d'ouate blanche si nécessaire) on ajoute une goutte de persulfate de potassium à 1%, puis une goutte du réactif rosindole

d'Ehrlich.^c En l'absence d'indol, le bouchon ne se teintera pas en rose après le même temps d'incubation à 37°C.

Lait. Les cultures en lait tournesolé (voir aussi chapitre 2) ne sont guère plus utiles à la différenciation de *P. pestis* d'avec *P. pseudotuberculosis* parce que certaines souches de celle-ci ne produisent qu'une très faible alcalinité. Les résultats obtenus par la culture du bacille pesteux en lait tournesolé sont aussi quelque peu contradictoires; par exemple Devignat & Boivin²⁷ ont trouvé sur 38 souches éprouvées : 33 réactions inchangées, 4 acidités légères, 1 faible alcalinité.

Nitrates. Ainsi qu'on l'a vu au chapitre 3, il ne faut accorder qu'une valeur relative à la réduction des nitrates en nitrites et à la production d'acide nitreux pour distinguer *P. pestis* de *P. pseudotuberculosis*. Dans les régions où *P. pestis* donne habituellement des réactions positives, des résultats négatifs ont été occasionnellement signalés. Le test préconisé par Webster¹¹³ est le suivant : une anse de 5 mm de la culture qui sert à la recherche de l'hydrogène sulfuré est déposée sur une plaque de verre et mélangée avec une anse de 2 mm du réactif de Ilosvay.^d Une coloration rosée apparaît en moins d'une minute en présence de nitrites.

L'attention a été attirée par Fauconnier³⁶ sur un moyen de différencier les bacilles pesteux des bacilles pseudotuberculeux par la recherche de l'activité uréasique propre à *P. pseudotuberculosis*. Cependant les résultats favorables rapportés par cet auteur demandent à être vérifiés.

Réactions sérologiques

Comme on l'a signalé en traitant du problème du séro-diagnostic, on pourrait recourir à l'agglutination pour éprouver, d'une part, des souches inconnues avec des immun sérums antipesteux de titre connu et, d'autre part, les sérums de malades suspects à l'aide de cultures connues.

Des procédés satisfaisants, tels que l'agglutination sur lame, ont été mis au point pour le diagnostic rapide de la peste humaine; par contre, on ne sait pas encore dans quelle mesure on peut se fier à l'agglutination pour identifier des souches inconnues et, en conséquence, pour différencier les bacilles pesteux des bacilles pseudotuberculeux. Les méthodes proposées par Bhatnagar⁹ et par Seal⁹⁵ le laissent espérer, mais leur valeur diagnostique différentielle devra être confirmée par des investigations effectuées sur une large échelle.

Outre les méthodes d'agglutination, d'hémagglutination et de fixation du complément exposées au chapitre 3, les méthodes sérologiques suivantes

^c On prépare le réactif rosindole d'Ehrlich en prenant 1 g de *p*-diéthylamino-benzaldéhyde, 95 ml d'éthanol absolu et 20 ml d'acide chlorhydrique concentré, que l'on ajoute à une quantité égale d'éther de pétrole.

^d On prépare le réactif d'Ilosvay en mélangeant en parties égales a) 1 g d'acide sulfanilique, 14,7 ml d'acide acétique glacial, 285 ml d'eau distillée et b) 0,2 g de naphthylamine, 14,7 g d'acide acétique glacial et 325 ml d'eau distillée.

semblent avoir un intérêt pratique pour le diagnostic, en particulier le diagnostic rétrospectif de la peste humaine : a) l'épreuve de floculation proposée par Girard⁴³ (voir chapitre 3) qui utilise le sérum de malades ou de convalescents et des filtrats ou des extraits toxiques de *P. pestis*; et b) la réaction allergique recommandée par da Silva, jr. & de Albuquerque⁹⁹ (voir aussi da Silva, jr.⁹⁷). Ces auteurs emploient un antigène préparé en enlevant immédiatement après la mort le bubon d'un cobaye infecté de peste par voie sous-cutanée; on le fait bouillir pendant deux heures dans l'eau salée physiologique; on le broie dans un mortier stérile dans la proportion de 1 g pour 20 ml de soluté salin, on filtre sur une gaze stérile et finalement on ajoute 0,5% de phénol. La stérilité une fois contrôlée, ce liquide est utilisé à la dose de 0,1 ml en injection intradermique. Une injection témoin d'une quantité égale de lait est pratiquée à 4 cm du point d'injection de l'antigène. Les lectures sont effectuées après 24, 36 et 48 heures. Dans les cas positifs, il se développe une papule entourée d'une zone inflammatoire, la réaction est à son maximum après 36 heures.

Quelques auteurs, tels que Cambosu,¹⁷ Menezes⁷⁴ et Tumansky,¹⁰⁸ ont préconisé l'usage des méthodes sérologiques en vue du diagnostic rapide de la peste des rongeurs. Récemment, un test basé sur la réaction des précipitines a été recommandé par Larson et al.⁶³ Ces auteurs ont établi, par des recherches préliminaires, que l'ébullition du matériel à éprouver, comme on la pratiquait jadis dans l'épreuve des thermoprécipitines (Piras et autres, cités par Pollitzer⁸⁹), provoquait un affaiblissement du potentiel antigénique. Aussi le diéthyléther remplace-t-il l'ébullition pour stériliser les cultures ou les suspensions de tissus à mettre en contact avec les immunosérums anti-pesteux. La réaction des précipitines exécutée avec des antigènes préparés de la sorte avec des tissus d'animaux morts de peste ont révélé la présence d'antigènes solubles en quantité suffisante pour avoir une valeur diagnostique dans des cas où le matériel avait été conservé à 37°C pendant au moins 14 semaines.

Dans les régions où les laboratoires sont équipés à cet effet, les épreuves de fixation du complément, effectuées selon la méthode de Chen et al.²¹ (voir chapitre 3, page 178) peuvent avoir leur intérêt pour le diagnostic de la peste des rongeurs.

Epreuve du bactériophage

Ainsi qu'on l'a vu en traitant la question du bactériophage, Gunnison et al.⁵⁰ ont découvert récemment que les tests effectués avec le bactériophage pesteux à 20°C offraient un moyen de différencier les bacilles pesteux des bacilles pseudotuberculeux.

Aussi remarquable que soit ce résultat, il devra être confirmé par l'examen de nombreuses souches isolées dans les divers territoires d'endémie pesteuse. En outre, il doit encore être prouvé jusqu'à quel point le concours du laboratoire permettra de retirer partout avantage de ce procédé.

Pour faciliter ces épreuves, Cavanaugh & Quan¹⁸ trempent des bandes de papier filtre stérilisées dans un filtrat de culture de *P. pestis* en bouillon qui a subi l'action d'un phage d'activité épouvée, et soumettent ces bandes à la lyophilisation ou à la dessiccation dans le vide. Si ces bandes sont appliquées sur de jeunes subcultures de *P. pestis* sur gélose au sang, maintenues à 20°C, une zone de lyse de 1 mm environ, apparaît après 18-24 heures autour des bandes imprégnées de phage, tandis qu'aucune lyse ne se manifeste autour des bandes témoins, non imprégnées. Des épreuves effectuées dans les mêmes conditions avec *P. pseudotuberculosis* donnèrent des résultats négatifs. D'après les résultats connus jusqu'à maintenant, le pouvoir phagique des bandes imprégnées et lyophilisées se maintint durant trois mois, à condition que les bandes, en tubes scellés sous azote, aient été conservées à la température du laboratoire.

Si la valeur de cette épreuve se confirmait, on disposerait d'un moyen facile de différencier *P. pestis* de *P. pseudotuberculosis*, et d'autant plus appréciable qu'il serait accessible aux travailleurs sur le champ même des opérations, les bandes servant à l'épreuve étant préparées dans des laboratoires centraux.

Expériences sur l'animal

Discutant la valeur respective des méthodes mises en œuvre pour l'identification au laboratoire de la peste des rongeurs, on a insisté tout particulièrement sur l'importance des inoculations pratiquées sur l'animal avec les broyats d'organes et de puces. Mais on soulignait en même temps que cette méthode, si utile pour donner une véritable vue d'ensemble de la situation, ne pouvait fournir de précisions sur l'étendue et la gravité de l'infection pesteuse. Par conséquent, pour combler cette lacune, d'autres méthodes doivent être utilisées parallèlement aux inoculations de broyats. De simples épreuves sur l'animal avec du matériel provenant de rongeurs individuels infectés ne suffiraient pas à mesurer le degré de cette infection; il ne saurait en être question au cours de sévères épizooties. Il faut néanmoins avoir recours à ce procédé lorsqu'on étudie les manifestations premières ou sporadiques de la peste chez les rongeurs.

Un comportement analogue s'impose vis-à-vis de la peste humaine. Là aussi il est capital de confirmer le diagnostic par toutes méthodes utiles, y compris les expériences sur animal, dans les cas initiaux ou sporadiques de peste des rongeurs. Il serait naturellement impossible de poursuivre l'identification complète chez chaque malade pendant une épidémie manifeste étendue.

Le choix des animaux d'expérience pour le diagnostic de la peste est subordonné à la nature des recherches indiquées par les circonstances. En règle générale, les cobayes seront préférés pour les épreuves à exécuter avec les broyats et conviendront également au mieux pour confirmer un diagnostic

dans les manifestations initiales ou sporadiques de la peste. Comme l'a recommandé Lloyd,⁶⁸ trois cobayes inoculés respectivement par voie cutanée, par voie sous-cutanée et par voie intrapéritonéale seront utilisés pour l'étude de ces manifestations particulières. Tandis que l'animal infecté par voie péritonéale répond généralement plus vite, la chance d'isoler d'emblée une culture pure est plus grande avec celui qui a été inoculé par voie cutanée. Dans les climats tropicaux spécialement, il est bon de sacrifier au moyen du chloroforme, les animaux moribonds (c'est-à-dire ceux qui sont couchés sur le côté); on y gagne d'abord du temps et, par la même occasion, on réduit les risques de contamination secondaires qui nuiraient à l'isolement de cultures pures.

L'inoculation intrapéritonéale à la souris blanche est un procédé idéal, qu'aucun autre ne surpasse pour affirmer une bactériémie et, en même temps, pour confirmer le diagnostic dans la peste humaine. De plus, il sera souvent possible d'utiliser ces animaux sur une plus large échelle que les cobayes, car ils s'élèvent facilement et à peu de frais. Mais la souris présente l'inconvénient d'être beaucoup plus sensible que le cobaye à l'infection pneumococcique (Girard ⁴⁴).

Les rats blancs sont indiqués pour différencier les bacilles pesteux des bacilles pseudotuberculeux. Il est vrai que quelques souches de ceux-ci ont été trouvées pathogènes pour les rats blancs, mais il n'est pas de méthode qui ne donne parfois un résultat anormal. Quand un problème de diagnostic différentiel se pose, c'est l'ensemble des résultats acquis par les divers procédés d'investigation qu'il faut prendre en considération, plutôt que les résultats d'une méthode isolée (Schütze ⁹⁴.)

Précautions recommandables

Les travailleurs de laboratoire doivent se prémunir contre trois dangers :

1) La possibilité de contracter la peste bubonique par l'intermédiaire de la piqûre d'insectes hématophages et singulièrement celle des puces de rongeurs;

2) La possibilité de contracter directement la peste bubonique en pratiquant des autopsies ou en manipulant du matériel infecté;

3) La possibilité de contracter la peste pneumonique par des projections ou des pulvérisations de matériel chargé de bacilles pesteux.

Infection bubonique transmise par puces

Quand la nécessité s'impose de pénétrer dans des immeubles contaminés de peste ou d'avoir des contacts avec des personnes infectées, des cadavres, ou des rongeurs suspects d'héberger des puces infectées, il est le plus sûr de revêtir un costume spécial constitué, dans son ensemble, par une combi-

naison analogue à celle que portent les clowns et faite d'une seule pièce recouvrant tout le corps, sauf la tête et les mains. On l'enfile jusqu'au cou, puis on la fixe solidement autour du cou et des poignets. Ce costume est complété par de hautes bottes en caoutchouc ou en cuir, un chapeau en toile et le cas échéant par des gants de caoutchouc, de toile ou de cuir. On y adjointra un masque s'il y a danger d'infection pulmonaire.

Comme il est plutôt pénible de porter cet accoutrement sous le climat tropical, on peut y substituer de longues bottes de toile recouvrant les pieds et les jambes et attachées au-dessus des genoux, ou seulement de hautes bottes (en caoutchouc ou en cuir) à l'intérieur desquelles on enfonce le pantalon.

Il a été recommandé récemment d'imprégner les sous-vêtements avec la poudre DDT qui assurerait la protection contre les puces, ou d'imprégner les pièces du costume avec d'autres insecticides modernes (Elishewitz; ³⁰ Linduska et al.; ⁶⁶ Smith & Burnett¹⁰²). Cette pratique conjuguée avec le port de longues bottes de toile ou de hautes bottines serait particulièrement efficace.

Des méthodes éprouvées, pour manipuler les rongeurs apportés au laboratoire aux fins d'examen, ont été décrites précédemment (voir page 238). Les animaux d'expérience gardés au laboratoire seront logés dans des pièces aménagées à l'abri des rats ou au moins dans des cages répondant au même objectif. Pour protéger les animaux infectés contre des puces errantes, les récipients où ils sont placés seront recouverts de gaze, entourés de papier-piège ou surélevés.

Infection directe, bubonique ou pneumonique

Si l'on manipule avec la propreté et la vigilance indispensables dans tout travail de laboratoire, point ne sera besoin de recourir à des précautions spéciales pour procéder aux recherches bactériologiques sur le matériel pesteux. Pour réduire au minimum le risque d'accidents, on n'emploiera que de la verrerie d'excellente qualité dont l'usage sera exclusivement réservé à ce travail. Les lames seront plongées dans un bocal contenant un liquide antiseptique (de préférence de l'alcool industriel) immédiatement après l'examen, et seront soumises à l'ébullition avant d'être nettoyées.

Quand on pratique des autopsies chez l'homme, on doit revêtir une tenue convenable, y compris un tablier et de hautes bottes en caoutchouc. De solides gants en caoutchouc sont indispensables. Pour les autopsies qu'il a pratiquées avant la découverte des sulfamides et des antibiotiques dont on dispose maintenant en thérapeutique, l'auteur de cet ouvrage utilisait deux paires de gants de caoutchouc; les poignets de sa blouse étaient fixés au-dessus d'une paire de gants intérieurs d'un modèle et de poids moyens, les mains et les avant-bras étaient ensuite recouverts par une longue paire de solide gants d'autopsie.

Pour parer au danger de projections possibles, on portera un masque et surtout des lunettes.

La dissection des animaux pesteux n'exige pas ce luxe de précautions parce que les opérateurs doivent apprendre à pratiquer ces autopsies à l'aide de longs instruments appropriés sans toucher aux cadavres. Cependant, ce mode de faire ne dispense pas de l'usage de gants de caoutchouc, pour le cas où la main entrerait accidentellement en contact avec les animaux ou recevrait des projections de matériel infecté.

Les cadavres des animaux seront brûlés immédiatement après l'autopsie en même temps que le contenu des récipients qui les auront conservés. La crémation est également préférable après l'autopsie des personnes victimes de la peste. Si elle s'avère impossible, les corps seront enveloppés dans des linceuls immergés au préalable dans des solutions fortement antiseptiques, avant d'être placés dans des cercueils étanches, ou mieux recouverts de chaux vive.

L'infection expérimentale des animaux d'épreuve sera effectuée en prenant les mêmes précautions que pour l'autopsie. Quand on pratique des inoculations, on doit prendre soin d'éviter le danger des projections de produits infectés; l'idéal est de porter un masque toutes les fois qu'on inocule des animaux à la seringue.

Toutes les précautions possibles doivent être observées quand on fabrique des vaccins ou des sérums avec des souches virulentes de peste et lorsqu'on effectue des recherches expérimentales, parce que, comme plusieurs incidents déplorables en témoignent, c'est au cours de ces opérations que les contaminations pulmonaires peuvent survenir.

Une stricte surveillance des assistants et du personnel employé dans les laboratoires de peste s'impose pour s'assurer qu'il n'y a aucune négligence dans l'application des consignes prophylactiques.

Si au cours des manipulations de laboratoire quelque accident malheureux survient, on procédera sans délai aux mesures de désinfection vestimentaire et corporelle sur les personnes intéressées, aussi bien que de la pièce entière. Toutes les plaies des doigts ou des mains, préexistantes ou produites au cours de l'accident seront immédiatement traitées, de préférence en plongeant les mains entièrement dans l'alcool.

Si le risque de contamination de travailleurs victimes d'accidents professionnels semble sérieux, on aura recours à l'administration préventive de sulfamides.

A cet égard, il est nécessaire de s'assurer que le personnel de laboratoire ne prend pas de sulfamides inconsidérément, en vue de se protéger contre un danger imaginaire. Pollitzer a observé un cas d'affection grave des reins (hématurie et oligurie) chez un technicien détaché pour un travail sur le terrain, qui avec l'idée de se protéger contre la peste avait absorbé 1 à 2 g de sulfadiazine par jour pendant plusieurs semaines. Fort heureusement, l'incident n'eut pas de suite fâcheuse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alvarado, C. A. (1942) *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.*, **21**, 129
2. Amies, C. R. (1952) *Publ. Hlth, Johannesburg*, **16**, 169
3. Barreto, J. de Barros & Castro, A. de (1946) *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **44**, 505
4. Berg, W. J. R. van den & Vos, J. J. T. (1932) *Geneesk. Tijdschr. Ned.-Ind.* **72**, 465, 531
5. Berlin, A. L. & Bacheva, V. (1937) *Rev. Microbiol., Saratov*, **16**, 26
6. Bezsonova, A. (1929) *Rev. Microbiol., Saratov*, **8**, 264
7. Bezsonova, A., Egorov, A., Koslovskaya, A. & Melnikova, Z. (1940) *Rev. Microbiol., Saratov*, **19**, 210
8. Bezsonova, A., Lenskaya, G., Molodtsova, P. & Mossolova, O. (1936) *Rev. Microbiol., Saratov*, **15**, 151
9. Bhatnagar, S. S. (1940) *Indian J. med. Res.* **28**, 17
10. Bichkov, V. & Borzenkov, A. (1929) *Rev. Microbiol., Saratov*, **8**, 20
11. *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.* 1936, **15**, 799
12. *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.* 1937, **16**, 49
13. *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.* 1943, **22**, 458
14. Bonebakker, A. (1936) *Geneesk. Tijdschr. Ned.-Ind.* **76**, 1410, 1890
15. Bouffard, G. & Girard, G. (1923) *Bull. Soc. Path. exot.* **16**, 501
16. Broquet, C. (1912) *Report of the International Plague Conference... Mukden, 1911*, p. 78
17. Cambosu, G. (1938) *Igiene mod.* **31**, 193
18. Cavanaugh, D. C. & Quau, S. F. (1953) *Amer. J. clin. Path.* **23**, 619
19. Chapin, C. W. (1909) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **24**, 854
20. Chen, T. H. (1948) *J. infect. Dis.* **85**, 97
21. Chen, T. H., Quan, S. F. & Meyer, K. F. (1952) *J. Immunol.* **68**, 247
22. Conseil, E. & Durand, P. (1930) *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **19**, 229
23. Devignat, R. (1936) *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **16**, 43
24. Devignat, R. (1938) *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **18**, 215, 543
25. Devignat, R. (1940) *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **20**, 41
26. Devignat, R. (1944) *J. Bact.* **48**, 491
27. Devignat, R. & Boivin, A. (1951) *Bull. Soc. Path. exot.* **44**, 279
28. Dieudonné, A. & Otto, R. (1928) Dans : Kolle, W., Kraus, R. & Uhlenhuth, P. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, 3. Aufl. Jena, **4**, 179
29. Drennan, J. G. & Teague, O. (1917) *J. med. Res.* **36**, 519
30. Elishewitz, H. (1947) *Soap*, **23**, 127
31. Enlows, E. M. A. (1923) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **38**, 2129
32. Eskey, C. R. (1936) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **51**, 786
33. Eskey, C. R. & Haas, V. H. (1939) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **54**, 1467
34. Eskey, C. R. & Haas, V. H. (1940) *Publ. Hlth Bull., Wash.* No. 254
35. Fabiani, G. (1933) *C.R. Soc. Biol., Paris*, **113**, 1198
36. Fauconnier, J. (1950) *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 104
37. Francis, E. (1943) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **58**, 1379
38. Girard, G. (1925) *Bull. Soc. Path. exot.* **18**, 603
39. Girard, G. (1934) *C.R. Soc. Biol., Paris*, **117**, 601
40. Girard, G. (1937) *Bull. Soc. Path. exot.* **30**, 240
41. Girard, G. (1938) *Bull. Soc. Path. exot.* **31**, 669
42. Girard, G. (1939) *Arch. Inst. Pasteur Tananarive*, p. 30
43. Girard, G. (1939) *Arch. Inst. Pasteur Tananarive*, p. 32
44. Girard, G. (1946) *Ann. Inst. Pasteur*, **72**, 708
45. Girard, G. (1952) *Bull. Org. Mond. Santé*, **5**, 109

46. Goldstein, B. (1942) *E. Afr. med. J.* **19**, 33
47. Gore, S. N. (1929) *Indian med. Gaz.* **64**, 429
48. Gotschlich, E. (1900) *Z. Hyg. InfektKr.* **35**, 195
49. Gross, B. & Bonnet, D. D. (1951) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **66**, 1541
50. Gunnison, J. B., Larson, A. & Lazarus, A. S. (1951) *J. infect. Dis.* **88**, 254
51. Haas, V. H. (1938) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **53**, 1033
52. Hankin, E. A. & Leumann, B. H. F. (1897) *Zbl. Bakt. (1. Abt., Orig.)*, **22**, 438
53. Heisch, R. B. (1952) *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, **46**, 547
54. Hennessey, R. S. F. (1938) *E. Afr. med. J.* **19**, 183
55. Lhenriques, A. (1942) *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.* **21**, 227
56. Himmelfarb, I. (1937) *Rev. Microbiol., Saratov*, **16**, 273
57. Humphreys, F. A., Campbell, A. G. & Smith, E. S. (1951) *Canad. J. Publ. Hlth*, **42**, 437
58. Issaly, A. S. & Issaly, I. S. M. de (1949) *Rev. Inst. bact. Malbrán*, **14**, 191
59. Kamal, A. M. (1937) *J. Egypt. publ. Hlth Ass.* **12**, 1
60. Kirschner, L. (1934) *Geneesk. Tijdschr. Ned.-Ind.* **74**, 1141
61. Kister, J. (1924) *Zbl. Bakt. (1. Abt., Orig.)* **21**, 280
62. La Rosa, G. (1930) *G. Batt. Immun.* **5**, 1768
63. Larson, C. L., Philip, C. B., Wicht, W. C. & Hughes, L. E. (1951) *J. Immunol.* **67**, 289
64. Lefrou, G. (1932) *Bull. Soc. Path. exot.* **25**, 399
65. Levinthal, W. (1930) *Z. Hyg. InfektKr.* **111**, 140
66. Linduska, J. P., Cochran, J. H. & Morton, F. A. (1946) *J. econ. Ent.* **39**, 767
67. Link, V. B. (1950) *CDC Bull.* **9**, No. 8, p. 1
68. Lloyd, B. J. (1941) *J. trop. Med. Hyg.* **44**, 119
69. Lobo, M. M. & Silvetti, L. M. (1941) *Sem. méd., B. Aires*, **48**, 262
70. Macchiavello, A. (1939) *Rev. chil. Hig.* **2**, 47
71. Macchiavello, A. (1945) *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.* **24**, 704
72. Macchiavello, A. & Paracampos, H. (1941) *Arch. Hyg., Rio de J.* **11**, 119
73. Macchiavello, A. & Paracampos, H. (1941) *Arch. Hyg., Rio de J.* **12**, 41
74. Menezes, J. P. (1941) *Annual report of the Haffkine Institute for 1939*, Bombay, p. 37
75. Meyer, K. F. (1937) *Amer. J. publ. Hlth*, **27**, 777
76. Meyer, K. F. & Batchelder, A. P. (1926) *J. infect. Dis.* **39**, 370
77. Meyer, K. F., Holdenried, R., Burroughs, A. L. & Jawetz, E. (1943) *J. infect. Dis.* **73**, 144
78. Micheletti, E. (1932) *Ann. Med. nav. colon.* **38**, 677
79. Modica, R. (1941) *Gazz. Osp. Clin.* **19**, No. 1
80. Moll, A. A. & O'Leary, S. B. (1945) *Plague in the Americas*, Washington, D.C. (Publication 225 du Bureau Sanitaire Panaméricain), p. 69
81. Murdock, J. R. (1939) *Bul. Off. int. Hyg. publ.* **31**, 1022
82. Office International d'Hygiène Publique (1937) *Bull. Off. int. Hyg. publ.* **29**, 528
83. Ohoto, O. (1923) *Jap. med. World*, **3**, 136
84. Ohoto, O. (1924) *J. infect. Dis.* **35**, 291
85. Omar, W. (1936) *J. Egypt. med. Ass.* **19**, 526
86. Petraghani, G. (1937) *Bull. Off. int. Hyg. publ.* **29**, 2522
87. Petrie, G. F. (1928) *Trop. Dis. Bull.* **25**, 314
88. Plague Research Commission (1907) *J. Hyg., Camb.* **7**, 324, 457
89. Pollitzer, R. (1936) *Immunology; Pathology*. Dans : Wu Lien-teh, Chun, J. W. H., Pollitzer, R. & Wu, C. Y. *Plague : a manual for medical and public health workers*, Shanghai
90. Prado, F., jr., (1940) *Bol. Ofic. sanit. pan-amer.* **19**, 971
91. Ramos Diaz, A. (1938) *Bol. Ofic. sanit., pan-amer.* **17**, 776
92. Riel, J. van & Mol, G. (1939) *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **19**, 453
93. Russo, C. (1939) *R.C. Ist. sup. San.* **2**, 197

94. Schütze, H. (1929) Dans : Great Britain, Medical Research Council. *A system of bacteriology in relation to medicine*, London, **4**, 446
95. Seal, S. C. (1951) *Ann. Biochem. exp. Med.* **11**, 143
96. Shih, F. I. & Pollitzer, R. (1944) *Chin. med. J.* **62**, 45
97. Silva, M. da, jr. (1941) *Arch. Hyg., Rio de J.* **11**, 151
98. Silva, M. da, jr. (1943) *Bol. Hig. Saúde públ.* **1**, No. 2, p. 1
99. Silva, M. da, jr. & Rodrigues de Albuquerque, A. F. (1940) *Brasil-med.* **54**, 759
100. Smidt, F. P. G. de (1929) *J. Hyg., Camb.* **29**, 201
101. Smidt, F. P. G. de (1942) *E. Afr. med. J.* **19**, 15
102. Smith, C. N. & Burnett, D., jr. (1948) *Amer. J. trop. Med.* **28**, 599
103. Sokhey, S. S. & Wagle, P. M. (1943) *Report of the Haffkine Institute for the years 1940-1941*, Bombay, p. 37
104. Swellengrebel, N. H. & Hoesen, H. W. (1915) *Zbl. Bakt. (1. Abt., Orig.)*, **75**, 456
105. Taylor, J. (1933) *Report of the Haffkine Institute for the year 1931*, Bombay, p. 23
106. Tiflov, V. E. (1946) *Med. Parasitol., Moscow*, **15**, 69
107. Topping, N. H., Watts, C. E. & Lillie, R. D. (1938) *Publ. Hlth Rep., Wash.* **53**, 1340
108. Tumansky, V. M. (1939) *Rev. Microbiol., Saratov*, **18**, 244
109. Uriarte, L. & Morales Villazon, N. M. (1924) *C.R. Soc. Biol., Paris*, **91**, 1041
110. Uriarte, L. & Morales Villazon, N. M. (1936) *Rev. Inst. bact., B. Aires*, **8**, 5
111. Uriarte, L., Morales Villazon, N. M. & Anchezar, B. (1935) *Rev. Inst. bact., B. Aires*, **7**, 5
112. Vincke, I. (1934) *C. R. Soc. Biol., Paris*, **118**, 61
113. Webster, W. J. (1932) *Indian med. Gaz.* **67**, 693
114. Wu Lien-teh (1926) *A treatise on pneumonic plague*, Genève (Document C.H. 474 de la Société des Nations)