

En règle absolue, dès que le fil de platine a été mis en usage, il doit être soigneusement stérilisé, de façon qu'il ne reste à la surface aucune parcelle de substance virulente.

Aiguilles de verre. — Dans certains cas on emploie avec grand avantage des aiguilles de verre qu'on peut faire aussi longues que l'on veut. Ces aiguilles trouvent surtout leur emploi dans les cultures des microbes anaérobies, et remplacent le fil de platine souvent trop court. Ces aiguilles ont la forme des pipettes Pasteur; elles se fabriquent comme celles-ci, à cette seule différence qu'on prend pour les faire des baguettes de verre plein. L'extrémité de l'aiguille doit être coupée droit, et non boutonnée. Ces aiguilles se stérilisent par plusieurs passages rapides dans la flamme.

La figure ci-contre (fig. 38) représente un de ces petits appareils.

I. — CULTURE DANS LES MILIEUX LIQUIDES

Culture dans les bouillons.

Nous ne parlerons dans cet article que de la culture dans les bouillons; ce que nous en dirons sera facilement appliqué, s'il y a lieu, au lait, à l'urine, aux liquides minéraux, etc.

Les bouillons de culture sont contenus, nous l'avons dit, dans des appareils variés dont la mise en état a été étudiée au chapitre I. Ces appareils sont :

- Les matras Pasteur;
- Les matras coniques bouchés à l'émeri;

Fig. 38.

- Les matras cylindriques à long col ou à col bas;
- Les flacons d'Erlenmeyer;
- Les tubes à essai.

Nous continuons à donner la préférence aux matras Pasteur, dont le seul inconvénient est le prix relativement élevé, et c'est la culture dans ces vases que nous prendrons pour type de notre description. Il sera d'ailleurs facile de faire l'application des principes exposés ci-dessous aux autres appareils. Les matras coniques bouchés à l'émeri, qu'on emploie quand on veut une culture plus largement exposée à l'air, se traitent absolument comme les matras Pasteur. Il en est de même pour les matras cylindriques à col bas.

Les tubes à essai, les matras cylindriques à long col, les flacons d'Erlenmeyer, tous bouchés à l'ouate, se traitent à peu de chose près de la même façon que les matras Pasteur, et d'une manière générale ce qu'on fait pour les tubes à essai on le fait pour les deux autres catégories d'appareils. En exposant la technique des cultures en gélatine et en gélose, nous dirons tout ce qu'il est nécessaire de savoir sur la manière de tenir les tubes à essai pour l'ensemencement, d'enlever leurs tampons d'ouate, d'éviter l'introduction des germes dans ces tubes pendant l'ensemencement, etc.

Culture dans les matras Pasteur.

On prend un matras Pasteur contenant un bouillon stérilisé suivant les règles indiquées, et ayant, sans se troubler, supporté l'épreuve d'un séjour prolongé à l'étuve entre 33° et 40°. La technique générale de la culture qu'on se propose de faire dans ce bouillon comprend deux opérations :

- A. L'ensemencement;
- B. La mise à la température voulue.

- A. *Ensemencement*. — Cette opération comporte :
- L'ouverture du matras ;
 - L'ensemencement proprement dit, c'est-à-dire l'acte de déposer la semence dans le bouillon ;
 - La fermeture du matras.

Pour ouvrir un matras, placez-le dans la main gauche *horizontalement*, c'est-à-dire le col regardant directement en avant. Le matras est maintenu et fixé dans cette position par l'index et le

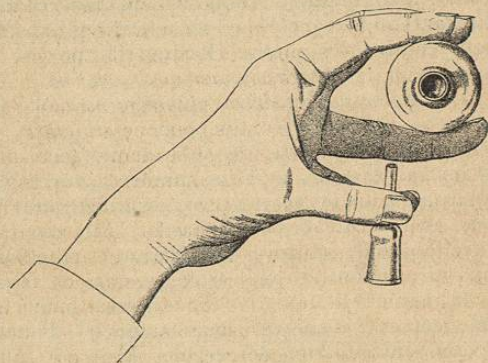


Fig. 39.

médius en dessus, l'annulaire en dessous; le pouce et le petit doigt restent libres. De la main droite enlevez le bouchon, et placez-le entre le petit doigt et le pouce de la main gauche de telle façon que l'ouverture de la partie large, la partie rodée, regarde directement en bas. La figure ci-dessus montre la position du matras qu'on vient de déboucher (fig. 39).

Alors, sans *changer la position du ballon*, sans *faire un mouvement avec la main* qui le tient, effec-

tuez l'opération (ensemencement ou prélèvement de semence).

Pour *fermer* le matras, rebouchez-le, maintenant toujours et *l'inclinaison* du ballon et *l'immobilité* de la main; quand il est bouché, vous pouvez le redresser, mais seulement alors.

En ouvrant et en fermant le matras suivant cette technique, vous éviterez que les poussières atmosphériques ne viennent en souiller le contenu.

L'ensemencement proprement dit consiste, dès que le matras est ouvert, à porter avec la main droite la semence contenue dans une pipette Pasteur ou à l'extrémité d'un fil de platine stérilisé sur le *fond* du ballon. On dépose en cet endroit rapidement la semence, et on retire aussitôt la pipette ou le fil de platine.

Les matras ensemencés doivent être pourvus tout aussitôt d'une étiquette indiquant la nature de la culture, sa provenance, et la date de l'opération.

Telle est la *technique générale* de l'ensemencement d'un bouillon; nous allons maintenant passer en revue les divers cas qui peuvent se présenter dans la pratique de cet ensemencement.

1. *Ensemencement immédiat des produits recueillis à l'autopsie*. — Ces produits sont, ainsi que nous l'avons dit (voy. chap. iv), recueillis dans des pipettes Pasteur. Dès que la semence est prélevée dans l'organe, *sans fermer la pipette*, prenez un des matras Pasteur que vous aurez placés à votre portée, disposez-le dans la main gauche, ainsi qu'il a été dit, débouchez-le et portez rapidement l'extrémité de la pipette sur le fond. Si la semence est liquide, une goutte tombera d'elle-même en donnant à la pipette une légère inclinaison; si la semence est plus épaisse, soufflez à travers le tampon d'ouate par la grosse extrémité de la pi-

pette, de façon à faire tomber une parcelle de cette semence sur le fond du matras.

Dans certains cas (quelques lésions tuberculeuses par exemple), l'ensemencement des pulpes exige certaines précautions préalables; il faut broyer la pulpe pour mettre les bacilles en liberté; on devra, dans ces cas, renoncer à l'ensemencement immédiat, fermer la pipette, et agir comme nous allons le dire ci-dessous.

2. *Ensemencement tardif des produits recueillis à l'autopsie.* — Dans ce cas les pipettes ont été fermées et c'est dans leur intérieur qu'il faut aller prélever la semence.

Disposez à votre portée le matras à ensemen- cer, une pipette B ou un fil de platine. Prenez la pipette A qui enferme la semence, enfoncez le tampon d'ouate dans l'intérieur du tube jusqu'à petite distance de la face supérieure de la semence; faites sur le verre, au niveau du milieu du tampon d'ouate, un trait de ligne circulaire, et coupez en cet endroit la pipette avec le charbon de Berzélius ou une pointe de verre rouge à blanc sur le chalumeau à gaz.

Préparez alors la pipette B, c'est-à-dire brisez son extrémité effilée et flambez sa surface externe, ou le fil de platine, c'est-à-dire passez-le dans la flamme.

Enlevez le tampon d'ouate de la pipette A que vous venez de couper, flambez son extrémité ouverte (1) et portez la pipette B, ou le fil de platine, dans l'effilure où est contenue la semence.

(1) Cette pratique est fort importante: elle a pour but de détruire tous les germes qui se sont déposés sur la surface extérieure de la pipette au niveau du point où l'on a fait l'ouverture. Ces germes pourraient souiller l'extrémité de la pipette B ou du fil de platine si, au moment où on va les porter dans l'effilure de la pipette A, ces instruments venaient à entrer en contact avec cette surface.

Si vous faites usage de la pipette pour prélever la semence, opérez de la façon suivante: la main gauche tenant la pipette A, aussi inclinée que possible, avec la main droite portez l'effilure de la pipette B sur la semence et aspirez.

Rejetez aussitôt la pipette A, et sans déposer la pipette B, qui restera dans la main droite, saisissez le matras, disposez-le dans la main gauche, ouvrez-le et portez-y la semence.

Si vous faites usage du fil de platine, il sera com- mode de placer horizontalement la pipette A dé- bouchée, ouverte et flambée à son extrémité entre deux des doigts de la main gauche; dans cette même main on disposera le matras, on le débou- chera, et la main droite tenant le fil de platine stérilisé le plongera dans l'effilure de la pipette A, et immédiatement après le portera dans le matras.

Dans certains cas, avons-nous dit, la pulpe doit être broyée avant d'être ensemencée. Cette pra- tique a pour but de mettre en liberté les microbes emprisonnés dans les tissus. L'opération se fait facilement avec un fil de platine fort, de diamètre un peu inférieur au diamètre intérieur de l'effi- lure de la pipette qui contient la semence. On introduit le fil de platine stérilisé et refroidi dans l'effilure de cette pipette coupée, ouverte et flambée, comme nous l'avons dit; on imprime au fil de pla- tine des mouvements de rotation, de va-et-vient, et lorsqu'on juge que la trituration est suffisante, on procède à l'ensemencement du matras soit avec ce même fil de platine, soit avec une pipette qu'on plonge dans la substance broyée. Une pré- caution fort importante à observer est de laisser l'extrémité du fil de platine cachée dans l'effilure de la pipette, si on se sert de cet appareil, jus- qu'au moment précis de l'ensemencement.

3. *Ensemencement de matras à matras.* — Dans

un matras A contenant la culture donnée, prélevez *purement* avec une pipette quelques gouttes de liquide.

La manœuvre est simple : nous en avons indiqué, en traitant de la façon *d'ouvrir et de fermer purement les matras*, les éléments essentiels.

Ouvrez donc purement le matras A; allez, avec une pipette bien flambée à l'extérieur, cueillir quelques gouttes du liquide qu'il contient; fermez le matras A, prenez immédiatement, et sans déposer la pipette (1), le matras B à ensemer, ouvrez-le et portez-y une goutte de la semence dont est chargée la pipette.

4. *Ensemencement dans un bouillon d'une culture provenant d'un milieu solide.* — Que la culture provienne d'un tube de gélatine, de gélose, de sérum, d'une pomme de terre, la technique est la même. Recueillie purement avec un fil de platine, suivant des procédés que nous indiquerons en traitant des cultures sur milieux solides, la parcelle de culture prélevée est portée tout aussitôt dans le matras Pasteur, en observant toutes les précautions de règle.

B. *Mise à l'étuve à la température voulue.* — La température extérieure avec ses variations infinies, ses minima très bas, convient peu au développement cyclique parfait des cultures. Il est donc nécessaire de soumettre celles-ci, *quand le milieu de culture ne s'y oppose pas*, à une température de 35° à 40° qui permettra une multiplication régulière, normale et rapide des germes.

Nous avons, au chapitre III, indiqué les deux

(1) Il arrive parfois qu'une pipette chargée de semence ne peut être utilisée immédiatement, mais seulement après un court délai; il conviendra dans ce cas de rejeter, en les laissant écouler de la pipette sur un papier-filtre (que l'on brûlera ensuite) les premières gouttes de la semence : onensemencera ensuite sans crainte.

modèles d'étuve qui nous semblent suffisants pour répondre à tous les besoins : l'étuve Roux qui sera de préférence l'étuve à usage général et sera en conséquence réglée d'une façon continue à 37-38°; l'étuve d'Arsonval qui répondra aux indications particulières, permettant l'exposition des cultures à telle ou telle température précise.

II. — CULTURES DANS LES MILIEUX SOLIDES : GÉLATINE, GÉLOSE ET SÉRUM.

La gélatine, la gélose simple ou additionnée de glycérine, etc., le sérum sont contenus, nous l'avons dit au chapitre II, dans des tubes à essai.

La culture dans l'un quelconque de ces milieux comprend deux opérations *communes* :

- 1° L'ensemencement du milieu;
- 2° La mise à la température voulue.

Ensemencer un de ces tubes comprend trois phases :

- a) L'ouverture du tube;
- b) L'ensemencement proprement dit, ou *inoculation*, c'est-à-dire l'acte de déposer la semence dans l'épaisseur ou à la surface du milieu;
- c) La fermeture du tube.

Indiquons tout d'abord, et en tête de cet article, la manière *d'ouvrir* et de *fermer* un tube de culture *purement*, c'est-à-dire de façon à n'y introduire aucun germe étranger. Qu'il s'agisse d'un tube de gélatine, de gélose ou de sérum; qu'il s'agisse de porter la semence dans le tube ou de l'y prélever, la technique est la même : en l'exposant ici nous éviterons des redites incessantes.

Pour *ouvrir* purement un tube de culture, placez-le entre le pouce et l'index gauches, le pouce en dessous, l'index en dessus; donnez-lui entre ces