

## CHAPITRE VIII

### EXAMEN MICROSCOPIQUE DES MICROORGANISMES.

Les microbes à examiner au microscope sont contenus dans les cultures sur milieux liquides ou solides, dans les divers liquides ou les tissus organiques. Ces tissus organiques peuvent être étudiés sous forme de pulpe fraîche, ou sous forme de coupes histologiques. Enfin l'examen peut se faire avec ou sans coloration : de là les divisions suivantes nécessaires pour mettre de l'ordre dans un sujet un peu complexe :

- I. Examen sans coloration des cultures liquides et solides.
- II. Examen avec coloration des cultures liquides.
- III. Examen avec coloration des cultures solides.
- IV. Examen des liquides et des pulpes organiques.
- V. Recherche des microbes dans les coupes de tissus.

Nous ferons précéder ces divers articles de quelques mots sur les instruments nécessaires à l'examen : lames, lamelles, pincettes, microscopes.

#### LAMES PORTE-OBJETS, LAMELLES, PINCES, MICROSCOPES.

*Lames.* — Ce sont des plaques rectangulaires de verre ou de glace, rodées ou non, sur lesquelles seront montées les préparations. Elles doivent être

aussi minces que possible ; elles seront soigneusement essuyées au moment de l'usage.

*Lames creuses.* — Ces lames, un peu plus épaisses que les précédentes, sont creusées en leur milieu, sur une des faces, d'un godet arrondi : elles servent aux cultures en cellules (Voy. ci-après).

*Lamelles.* — Ce sont de petites plaques de verre très minces, de forme ronde, carrée ou rectangulaire. Elles servent à recevoir les cultures ou les liquides organiques à examiner, et à recouvrir les coupes montées sur lames.

On les conserve dans de l'alcool, et on ne les retire de ce liquide qu'au moment d'en faire usage.

*Pincettes.* — Les pincettes les plus convenables pour manier les lamelles sont les pincettes dites de Cornet, dont les mors se rapprochent automatiquement et immobilisent la lamelle sans la casser.

*Microscopes.* — Nous n'insisterons pas, et pour cause, sur la description de cet instrument ; nous allons seulement indiquer les conditions que doit remplir un microscope destiné à l'usage bactériologique.

Ce microscope doit être pourvu d'une large platine pour les examens des cultures sur plaques ; d'un éclairage Abbe ; d'un revolver porte-objectif à deux ou trois branches qui permet d'amener sans aucun changement de position, sur le champ de la préparation choisi, des objectifs fournissant les divers grossissements les plus usités.

Enfin il est de toute nécessité de posséder un objectif à immersion homogène, en outre des divers objectifs ordinaires donnant des grossissements variés.

Les maisons Verick et Nachet de Paris, Zeiss et Leitz (Allemagne), Powell (Angleterre), fournissent d'excellents instruments.



I. — Examen des cultures liquides et solides sans coloration. — Cultures en cellules.

On doit bien se familiariser avec le mode d'examen des microorganismes sans coloration, car c'est le seul qui permette d'observer les microbes aussi naturellement que possible, leur forme n'étant pas modifiée par les réactifs, et leur volume n'étant pas augmenté ou diminué par les matières colorantes. De plus, on les voit ainsi vivants, et on se rend compte des mouvements propres à certaines espèces.

a. *Examen sans coloration des cultures liquides.* — Pour faire cet examen, on dispose à sa portée un bec Bunsen ou une lampe à alcool, une ou plusieurs pipettes Pasteur stérilisées, et le matras contenant la culture à examiner. On effile finement à la lampe l'extrémité d'une pipette, en donnant à la partie étirée une direction un peu oblique: l'effilure de la pipette est ainsi terminée par un petit tube plus fin, obliquement dirigé; on brise l'extrémité de ce petit tube, et on flambe l'effilure sur la flamme de la lampe à alcool. On ouvre le matras en prenant toutes les précautions que nous avons indiquées au chapitre iv; on y plonge la pipette et on aspire une petite quantité de liquide. On retire et on bouche le matras. On prend alors une lamelle (les lamelles, nous l'avons dit, doivent être conservées dans l'alcool); on l'essuie avec un linge fin; on verse alors à sa surface une gouttelette de la culture contenue dans la pipette; on prend une lame propre sur laquelle on place la lamelle, la face chargée de la gouttelette reposant sur la lame; on a soin de ne pas laisser introduire d'air entre la lame et la lamelle.

Il ne reste plus qu'à examiner au microscope au

grossissement voulu, en écartant le condensateur Abbe, et en se servant du miroir concave. On voit alors des points, des bâtonnets ou des filaments, suivant la culture que l'on examine, réfringents, entraînés dans le courant du liquide ou doués de mouvements propres.

On peut aussi examiner les cultures en se servant d'une lame creuse, c'est-à-dire du *procédé de cultures en cellules*.

On lave la lame creuse représentée ci-contre (fig. 64 et 64 bis) à l'acide sulfurique, on rince à



Fig. 64.

Fig. 64 bis.

La figure 64 représente la lame creuse en entier. — La figure 64 bis montre la coupe.

l'eau et on essuie; on passe plusieurs fois dans la flamme de la lampe à alcool; lorsque la lame est refroidie, on applique sur sa partie creuse la lamelle sur laquelle on a versé une goutte de la culture à examiner: il faut prendre garde que cette goutte touche les bords du disque creux, sans quoi, par capillarité, elle disparaîtrait entre la lame et la lamelle. Ceci fait, on enduit avec un pinceau les bords de la lamelle de vaseline blanche, afin d'éviter l'évaporation de la goutte. On obtient ainsi une véritable chambre humide, dans laquelle on voit, sous le microscope, l'évolution naturelle de la culture. Koch a employé ce procédé pour étudier le cycle de la bactériodie charbonneuse, et il est en effet facile, pour faire évoluer la culture, de porter la lame



creuse dans l'étuve à la température favorable; en l'examinant fréquemment on suivra les diverses phases de l'évolution du microbe. On donne à ces sortes de préparations le nom de *cultures en cellules*.

b. *Examen sans coloration des cultures en provenance de milieux solides*. — Sur une lamelle bien propre, on dépose avec une pipette finement effilée à son extrémité, une gouttelette de bouillon stérile. Avec un fil de platine fin et stérile, on va prélever une *trace* de la culture à examiner, et on dépose cette trace sur la goutte de bouillon. L'opération s'achève ensuite comme ci-dessus.

La culture en cellules avec une culture en provenance de milieu solide est également facile. On ensemence avec une trace de la culture choisie, portée à l'extrémité d'un fil de platine, la gouttelette de bouillon stérile déposée sur une lamelle; on renverse cette lamelle sur l'excavation de la lame creuse, et on achève comme ci-dessus.

Il est possible, par un procédé bien simple, d'examiner les *microbes vivants* et en mouvement — si l'espèce est mobile — en les *colorant* légèrement. La technique est la suivante:

Déposez sur une lame une goutte d'une solution aqueuse très légère d'une matière colorante: le violet dahlia réussit fort bien.

Dans cette goutte déposez une parcelle de culture microbienne soit liquide soit solide; recouvrez d'une lamelle et portez sous le microscope. Les microbes vivants encore se coloreront facilement, et quelques détails intéressants pourront être aisément saisis grâce à ce procédé.

## II. — Examen avec coloration des cultures liquides.

a. *Technique générale*. — Prenez une lamelle, essuyez-la; versez sur une des faces une gouttelette

de la culture recueillie dans une pipette Pasteur; étalez cette gouttelette sur la lamelle avec l'extrémité de la pipette promenée à plat sur la surface de celle-ci; séchez la lamelle (caléfaction) en la plaçant, la face enduite tournée en haut, sur une platine chauffante (voy. fig. 64) dont la température ne doit pas dépasser 35 à 40°; lorsqu'elle est sèche on la passe deux ou trois fois dans la flamme; puis on la

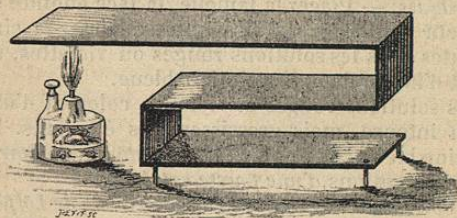


Fig. 65.

dépose, la *face enduite en dessous*, dans la solution colorante choisie. Lorsqu'on juge la coloration suffisante, on retire la lamelle en la saisissant avec une pince, on la lave dans un cristalliseur contenant de l'eau distillée, pour enlever l'excès de couleur. Avec un linge fin on essuie la face non enduite, et on sèche sur la platine chauffante. Lorsque la lamelle est sèche, on éclaircit la préparation en versant sur la face colorée une goutte d'essence de girofle, de bergamote ou d'huile de cèdre; on enlève l'essence avec xylol. On verse alors une goutte de baume sur la face colorée de la lamelle, qu'on dépose aussitôt sur une lame: le baume s'étale, et la préparation montée est prête pour l'examen.

L'examen se fait ici avec des grossissements va-



riables, mais toujours avec l'éclairage Abbe et le miroir plan.

*Quel que soit le procédé de coloration employé le mode de montage de la lamelle est le même ; aussi ne reviendrons-nous plus sur ce sujet dans la suite.*

b. *Technique spéciale.* — Nous allons maintenant passer en revue les divers procédés de coloration des lamelles.

1. *Coloration des lamelles dans les solutions hydro-alcooliques.* — Placez la lamelle, la face enduite en bas, sur la surface de la solution ; laissez-la cinq minutes dans les solutions rouges ou violettes, un quart d'heure dans la solution bleue.

Les solutions rouges et violettes colorent d'une façon intense, mais grossissent les éléments. La solution bleue colore plus légèrement, mais donne des préparations d'une finesse extrême.

2. *Coloration des lamelles par la méthode de Löffler.* — Placez la lamelle, la face enduite en bas, sur la surface de la solution bleue de Löffler, préalablement filtrée et contenue dans un verre de montre, et laissez pendant cinq minutes au moins, une demi-heure au plus.

Décolorez rapidement dans de l'eau acidulée par l'acide acétique (une ou deux gouttes d'acide pour le contenu d'un verre de montre).

Lavez avec soin pour enlever toute trace d'acide, séchez, montez.

Les microbes sont colorés en bleu foncé, le reste de la préparation en bleu pâle.

3. *Coloration au bleu phéniqué de Kühne.* — Plongez la lamelle, la face enduite en dessous, dans la solution de bleu phéniqué de Kühne, pendant cinq minutes à un quart d'heure.

Rincez à l'eau. Le rinçage suffit dans la plupart des cas, mais lorsque la couche étalée sur la lamelle est épaisse, et qu'on peut craindre une sur-

charge gênante de couleur, on décolore au moyen de l'eau acidulée (10 gouttes d'acide chlorhydrique au maximum dans 100 grammes d'eau distillée), dans laquelle on plonge quelques secondes la préparation. Retirez et lavez pendant quelques instants dans la solution aqueuse de carbonate de lithine :

Eau.....	10 gouttes.
Solution aqueuse concentrée de carbonate de lithine.....	VI à VII gouttes.

Lavez ensuite à l'eau distillée.

Séchez la préparation soit en soufflant sur la face enduite un courant d'air produit par une poire en caoutchouc, soit en plaçant la lamelle sur la platine chauffante à douce chaleur.

Éclaircissez en passant rapidement dans un bain de xylol et sans sécher montez dans le baume.

4. *Coloration au violet phéniqué de Nicolle.* — Fixez d'abord la préparation en la plongeant quelques secondes dans un mélange à parties égales d'alcool et d'éther. Séchez, et plongez quelques secondes, une demi-minute au plus, dans le violet phéniqué. Lavez à l'eau, séchez et montez immédiatement dans le baume.

5. *Coloration au rouge de Ziehl* (Fuchsine phéniquée de Kühne). — Nous employons le rouge de Ziehl comme méthode générale de coloration en procédant de la façon suivante :

Immersion de la lamelle dans le bain colorant pendant cinq à quinze minutes.

Rinçage à l'eau aussi complet que possible.

Séchez la lamelle sur la platine à douce chaleur.

Plongez dans un bain d'huile d'aniline jusqu'à décoloration apparente presque totale ; faites passer dans une essence fluide (girofle ou bergamote) et enfin dans le xylol.



Sans sécher montez dans le baume.

Dans ce mode de coloration, seuls les microbes restent colorés en rouge, sur un fond absolument incolore.

6. *Méthode de Gram et ses dérivés.* A. *Méthode de Gram proprement dite.* — Placez la lamelle, la face enduite en bas, sur la surface du violet de Gram, pendant au moins cinq minutes. Portez ensuite la lamelle dans la solution iodo-iodurée pendant une à deux minutes ; la lamelle prend une teinte brun foncé.

La solution iodo-iodurée a la formule suivante :

Iode métallique.....	1	gramme.
Iodure de potassium.....	2	—
Eau distillée.....	300	—

Décolorez aussi complètement que possible dans l'alcool absolu.

Lavez et séchez.

Placez ensuite la lamelle dans une solution hydroalcoolique faible d'éosine, de brun de Bismarck, ou de vésuvine pendant une minute. Lavez, séchez, montez.

Les microbes sont colorés en violet foncé, les éléments figurés en rose ou en brun, suivant qu'on a employé comme coloration de fond, l'éosine, la brun de Bismarck ou la vésuvine.

*Nota.* — Il s'en faut, et de beaucoup, que tous les microbes traités par le procédé de Gram résistent au troisième temps, c'est-à-dire à la décoloration par l'alcool absolu, prennent le Gram, pour nous servir de la locution usitée en bactériologie.

Les microbes qui ne prennent pas le Gram se colorent alors comme le fond, c'est-à-dire en rose pâle par l'éosine, ou en brun par le brun de Bismarck ou la vésuvine.

La méthode de Gram doit toujours être tentée pour tout microbe donné, car elle fournit un élément diagnostique important, suivant que le microbe prend ou non le Gram.

Dans les cultures pures en milieux solides ou liquides, on obtient des préparations fort nettes en traitant les microbes par la méthode de Gram, lorsque cette méthode est apte à les colorer : le microorganisme tranche alors plus vivement sur le fond, dont le distingue sa coloration spéciale, que dans les préparations à coloration simple, où il ne se détache des éléments environnants que par sa coloration plus forte.

La méthode de Gram est cependant passible de plus d'un reproche. Kühne énonce de la façon suivante les objections qu'on peut lui adresser :

« Par l'emploi de la solution de violet dans l'huile d'aniline, il se forme fréquemment sur la préparation des précipités de matière colorante, précipités dont on ne peut se débarrasser, ou dont on ne se débarrasse que très difficilement, et cela même avec des agents d'extraction très énergiques, comme l'alcool ou l'essence de clous de girofles. De plus, le temps que la lamelle doit passer dans l'alcool avant d'être soumise à l'action de l'iode est difficile à apprécier. Si ce temps est trop court, il se produit des précipités ; si la coupe séjourne trop longtemps dans l'alcool, la coloration des bactéries est compromise. De plus la décoloration par l'alcool est souvent lente et exige le renouvellement répété de celui-ci. »

Kühne et Nicolle ont donné de bonnes modifications du procédé de Gram.

B. *Procédé de Kühne.* — Mettez dans un verre de montre quantité égale de solution alcoolique saturée de *Krystall-violet* et de carbonate d'ammoniaque en solution aqueuse à 1 p. 100.



La solution de bleu Victoria (1 p. 100 de bleu Victoria dans 50 d'alcool à 50 p. 100) peut remplacer la solution de *Krystall-violet*. Il est inutile alors d'ajouter du carbonate d'ammoniaque.

Plongez la lamelle dans le bain colorant de cinq à quinze minutes.

Lavez à fond dans l'eau.

Plongez alors deux à trois minutes dans la solution iodo-iodurée de Kühne :

Iode.....	2 grammes.
Iodure de potassium.....	4 —
Eau.....	100 —

Cette solution est ajoutée à de l'eau au moment de l'usage jusqu'à teinte vin de Madère.

Nouveau lavage à l'eau; puis immersion dans un bain de *fluorescéine* alcoolique saturée. Cette solution se fait et se conserve comme les solutions similaires de couleurs d'aniline.

Au sortir du bain de *fluorescéine*, immersion dans l'alcool pur jusqu'à enlèvement de la *fluorescéine*.

Passage enfin dans l'huile d'aniline, l'essence de girofles ou de bergamote, le xylol et inclusion dans la résine dammar.

Les bactéries traitées par cette méthode apparaissent fortement colorées sur un fond incolore et absolument exempt de précipités.

C. *Procédé de Nicolle* (1). — Après avoir étalé la culture sur la lamelle par les procédés ordinaires, fixez avec le mélange d'alcool et d'éther à parties égales que vous laissez quelques secondes au contact; séchez rapidement. Plongez la lamelle dans le bain de *violet phéniqué*.

Laissez au contact 4 à 6 secondes, et faites agir

(1) *Annales Pasteur*, 1895, p. 664.

la liqueur iodo-iodurée de Gram *forte* — qui ne diffère de la liqueur dont nous avons donné la formule que par ce que pour 1 gram. d'iode et 2 d'iodure de potassium elle ne renferme que 200 gram. d'eau distillée — 4 à 6 secondes aussi, mais en la renouvelant 1 ou 2 fois. Décolorez par un liquide composé d'alcool absolu additionné d'un tiers d'acétone. Séchez et montez dans le baume.

7. *Méthode d'Ehrlich et ses dérivés*. — Cette méthode, spéciale à la coloration du bacille de la tuberculose, sera traitée au chapitre *Tuberculose*.

Telle est la série des méthodes qui nous paraissent les plus recommandables. Au point de vue du choix à faire entre elles, voici ce que nous pouvons dire :

Les méthodes de coloration par les solutions hydroalcooliques sont des procédés extemporanés, pouvant rendre de grands services, mais susceptibles de peu de perfection.

La méthode de coloration par le bleu de Kühne ou par le rouge phéniqué est de beaucoup supérieure : le procédé de traitement par le rouge donne des préparations irréprochables.

Enfin, toutes les fois que les microbes sont susceptibles d'être traités par la méthode de Gram ou mieux par ses dérivés, c'est à ces procédés qu'il faudra s'adresser, et ceux de Kühne et de Nicolle sont les plus parfaits.

### III. — Examen des cultures provenant de milieux solides avec coloration.

On prend purement, suivant la méthode indiquée au chapitre v, avec le fil de platine, une parcelle minime de la culture à examiner; on la mélange à une goutte de bouillon stérilisé, placé sur une lamelle bien propre. On a ainsi un liquide lac-



tescent. On nettoie une seconde lamelle qu'on applique sur la face enduite de la première; avec le pouce et l'index on les fait glisser l'une sur l'autre. Les deux lamelles sont ainsi uniformément enduites. Il ne reste plus qu'à les sécher et les colorer par les procédés indiqués au paragraphe II ci-dessus.

IV. — Examen des liquides et des pulpes organiques.

1. *Examen des liquides sans coloration.* — Les liquides étant recueillis dans des pipettes comme nous l'avons dit au chapitre IV, il suffit d'en placer une goutte sur une lamelle, de renverser celle-ci sur une lame. La goutte s'étale entre elles, et l'on porte la préparation sous le microscope, en procédant comme nous l'avons dit au paragraphe I (1).

2. *Examen du sang avec coloration.* — On place une gouttelette de sang sur une lamelle; avec l'effilure de la pipette promenée à plat, on l'étale en couche mince et uniforme sur toute la surface de la lamelle, ou mieux encore, on écrase et on étale cette gouttelette entre deux lamelles. On sèche sur la platine chauffante.

On traite alors par un mélange d'alcool et d'éther à parties égales, afin de bien fixer les globules et de dissoudre les parties grasses; on sèche, et l'on colore par l'un des procédés indiqués ci-dessus de coloration simple ou double si la coloration double est possible.

Dans les colorations simples, la liqueur de Löff-

(1) Il ne faut jamais négliger de procéder à cet examen dans une autopsie, surtout pour le sang. C'est par ce procédé que Pasteur et ses élèves ont découvert le microbe du choléra des poules, du rouget, etc. On sait que pour le charbon il donne des résultats frappants, et plus importants peut-être que ceux qu'on obtient par la coloration.

fler donne d'excellents résultats, car elle permet une sorte de double coloration : les microbes sont en bleu vif, et les globules en vert pâle.

Dans les préparations de sang des oiseaux (poule, pigeon), la solution hydroalcoolique de violet de gentiane donne de très beaux résultats. Le bleu de Löffler teint le noyau du globule sanguin en bleu vif, la partie périphérique en vert pâle.

Dans les doubles colorations il faut colorer les globules à l'éosine qui est ici la couleur d'élection.

M. Nicolle conseille pour la double coloration du sang la méthode suivante : Fixer le sang sur la lamelle par le mélange d'alcool et d'éther à parties égales. Colorer au violet phéniqué. Puis faire agir 4 à 6 secondes, en la renouvelant 1 à 2 fois, l'éosine iodo-iodurée dont la formule due à M. Mérieux est la suivante :

Iode.....	1	gramme.
Iodure de potassium.....	2	—
Eau distillée.....	200	—
Solution saturée d'éosine dans l'alcool à 90°.....	20	cent. c.

Décolorer par l'alcool-acétone au sixième.

3. *Examen de la sérosité péritonéale, pleurale, péricardique avec coloration.* — On étale une goutte du liquide recueilli dans une pipette sur une lamelle; on sèche, on colore et on monte comme s'il s'agissait d'une culture liquide.

Pour la sérosité péritonéale, le meilleur procédé consiste à placer des lamelles bien propres sur la surface du foie qui se trouve toujours enduite de sérosité. On sèche et on colore. La lamelle est ainsi enduite d'une couche uniforme aussi mince que possible.

4. *Examen des pulpes d'organe, et de la moelle osseuse avec coloration.* — Les pulpes ont été recueilli-



lies purement dans la rate, le foie, etc. ; la moelle osseuse a été puisée dans le canal médullaire (Voy. ch. iv). Pour en faire une préparation, il suffit de placer une goutte de la pulpe donnée sur une lamelle ; on applique alors une seconde lamelle sur la première : la goutte est incluse entre les deux lamelles ; en pressant légèrement entre le pouce et l'index, et en faisant glisser les lamelles l'une sur l'autre, on écrase et on étale la pulpe. On sèche et on colore par les procédés divers ci-dessus indiqués.

5. *Examen des muscles avec coloration.* — La méthode la plus simple est la méthode du *frottis*. On coupe un fragment de muscle à l'endroit où la lésion est le plus marquée, et on en frotte légèrement la surface d'une lamelle. On sèche et on colore par les procédés connus.

6. *Examen du pus avec coloration.* — Quand le pus est liquide, on l'étale sur les lamelles comme les pulpes. S'il est caséux, on en dépose une parcelle sur une lamelle, et on verse sur cette lamelle une goutte de bouillon stérilisé. Avec la palette de platine stérilisée, on mélange le pus au bouillon. On obtient ainsi un liquide opalescent épais. On place une deuxième lamelle sur la surface enduite de la première, et on les fait glisser l'une sur l'autre. On a ainsi deux lamelles que l'on sèche et colore.

Pour les *produits pathologiques* en général M. Nicolle conseille soit la coloration au violet phéniqué exposée ci-dessus, soit la coloration à la *thionine phéniquée*. Dans ce dernier cas la lamelle est plongée dans le bain colorant pendant une à deux minutes, lavée, séchée et montée.

*Méthode de coloration des cils ou flagella des microorganismes.* — Quelques bacilles possèdent des *cils* ou *flagella* auxquels ils doivent leur remarquable mobilité.

On doit à M. Löffler une ingénieuse méthode pour colorer ces flagella :

« Cette méthode comprend l'emploi des deux dissolutions suivantes :

» 1° *Mordant.* — A 10 centimètres cubes d'une solution aqueuse de tannin à 20 p. 100 on ajoute goutte à goutte une solution aqueuse de sulfate de fer, jusqu'à ce que le liquide soit violet noir. On ajoute ensuite 3 ou 4 centimètres cubes d'une décoction de campêche (1 p. 100 de bois pour 8 p. 100 d'eau), ce qui donne un liquide d'un violet sale ; il ne faut pas aller jusqu'à produire un précipité granuleux. Cette solution se conserve plusieurs jours en se fonçant. Le mieux est de la conserver dans des vases clos. Une addition de 4 à 5 centimètres cubes d'une solution à 5 p. 100 d'acide phénique la rend plus facile à conserver, sans lui enlever sensiblement de ses qualités comme mordant.

» 2° *Solution colorante.* — A 100 centimètres cubes d'une solution aqueuse saturée d'aniline, on ajoute 1 centimètre cube d'une solution à 1 p. 100 d'hydrate de soude, de façon à lui donner une réaction franchement alcaline, ensuite 4 à 5 grammes de violet de méthyle, ou de bleu de méthyle, ou de fuchsine : on agite jusqu'à dissolution. Ces dissolutions concentrées se conservent plusieurs semaines.

» Quand le liquide contenant les bactéries à étudier est pauvre en albumine, en matières muqueuses ou en sels, on l'étend directement sur le couvre-objet. Dans le cas contraire, on en dilue une petite quantité dans une goutte d'eau distillée, puis un peu de celle-ci dans une autre, et ainsi de suite, deux ou trois fois, jusqu'à ce qu'on ait un liquide très pauvre en albumine. Ces gouttelettes sont étalées, desséchées, et on choisit celle qui convient le mieux.



» Les lamelles séchées à l'air, puis passées à la flamme, sont recouvertes d'une couche de mordant, et maintenues à une distance de la flamme telle que le liquide fume faiblement. Au bout d'un moment on verse l'excédant du liquide, on lave spécialement sur les bords, où il pourrait rester du mordant qui donnerait ultérieurement un précipité avec la matière colorante. La préparation ressort en gris : le verre doit être tout à fait clair. On filtre alors sur le verre 2 ou 3 gouttes de la solution colorante, qu'on promène à la surface, et qu'on chauffe ensuite modérément. Les parties ayant subi l'action du mordant se foncent beaucoup. Quand on juge la teinte suffisante, on lave et la préparation est prête. » (*Analyse Duclaux*, in *Annales Pasteur*, t. III.)

La méthode de Löffler ne réussit pas toujours. Elle a été modifiée par Löffler lui-même, qui a cherché à aider l'action du mordant en traitant par une solution alcaline les bactéries qui rendent acide leur milieu de culture et par une solution d'acide sulfurique celles qui le rendent alcalin. Neuhaus et Trenkmann ont imaginé des procédés ou peu fidèles ou peu expéditifs.

M. Straus a fait connaître en 1892 un procédé *rapide* qui s'adresse surtout aux cils du vibron cholérique : il consiste à faire agir sur une goutte de culture en bouillon datant de vingt-quatre heures déposée sur une lamelle une trace du mélange colorant suivant : liqueur de Ziehl délayée dans 3 à 4 parties d'eau. On recouvre avec une lamelle et on examine au grossissement convenable.

M. Sclavo (1892) a proposé le procédé suivant : *mordancer* la préparation d'abord avec un bain contenant 1 gram. de tannin dans 100 centimètres cubes d'alcool à 50°, puis avec un autre formé d'une solution aqueuse d'acide phospho-

tungstique à 5 p. 100. On plonge une minute dans le premier, on lave, on porte une minute dans le second, on lave rapidement à l'eau distillée, et on laisse ensuite 3 à 5 minutes dans le liquide d'Ehrlich légèrement chauffé. On lave, on dessèche et on monte au baume dissous dans le xylol (1).

Ce procédé n'est pas d'une réussite constante. Il échoue avec le vibron cholérique, etc. Le procédé suivant, dû à MM. Nicolle et L. Morax (*Annales Pasteur*, 1893, p. 554), paraît de beaucoup le plus recommandable :

On prélève une parcelle de culture récente sur gélose et on la dilue dans un verre de montre rempli d'eau de manière à obtenir un liquide à peine trouble. — Répartir alors ce liquide avec une pipette à la surface de lamelles propres et fortement flambées par des passages réitérés dans la flamme chauffante d'un bec Bunsen. On tient ces lamelles par un de leurs angles à l'aide d'une pince de Cornet. Le liquide étant étalé sur toute l'étendue, les incliner et aspirer avec la pipette l'excès de la dilution qui se rassemble au niveau de l'angle inférieur. — Laisser sécher à l'abri de la poussière. — Déposer à la surface d'un des couvre-objets une grosse goutte d'encre de fuchsine et chauffer une dizaine de secondes sur une petite flamme (flamme veilleuse d'un bec Bunsen, par exemple). — Lorsque des vapeurs apparaissent, jeter le mordant, incliner la lamelle et faire tomber sur l'angle supérieur le jet d'une pipette pour bien laver la préparation sans détacher la couche de microbes. — Recommencer encore deux ou trois fois le mordantage et les lavages. Avoir soin, après chaque lavage, d'essuyer la face inférieure du couvre-objet et l'extrémité de la

(1) D'après Duclaux, *Annales Pasteur*, 1893, p. 221.



pince de Cornet; sans quoi, lors du mordantage suivant, l'encre de fuchsine s'écoulerait sous la lamelle et le long de la pince. — Colorer en versant la fuchsine de Ziehl à la surface de la préparation et en chauffant une ou deux fois pendant un quart de minute. — Laver une dernière fois à l'eau et examiner dans ce liquide. — Si la coloration est réussie, faire sécher la lamelle et monter dans le baume au xylol.

V. — Recherche des microbes dans les coupes de tissus.

La coloration des coupes constitue un des points les plus importants de la technique bactériologique : c'est grâce à ce procédé que nous pouvons reconnaître la présence et le siège des microorganismes dans les divers tissus, et nous rendre compte des lésions qu'ils y provoquent.

Les coupes se colorent par deux sortes de méthodes :

1° Les méthodes de coloration simple : toute la préparation est uniformément colorée, mais les microbes tranchent sur le tissu par une teinte plus vive ;

2° Les méthodes de double coloration : les microbes sont teints d'une couleur, le fond d'une autre couleur.

La technique de la manipulation des coupes diffère légèrement suivant que la coupe a été faite par un procédé ou par un autre : les deux sortes de microtomes auxquels nous donnons la préférence sont :

a) Le microtome à congélation ;

b) Le microtome à la paraffine.

Toute pièce destinée à être coupée pour l'examen bactériologique doit être, aussitôt après l'autopsie, débitée en petits fragments cubiques d'un demi-

centimètre de côté au plus, et les fragments doivent être placés dans l'alcool absolu : il faut se servir à cet effet de flacons étroits et élevés, de telle façon que les fragments soient recouverts d'une haute couche d'alcool.

A. PRÉPARATION, COLORATION ET MONTAGE DES COUPES FAITES AU MICROTOME A CONGÉLATION (1).

PRÉPARATION. — La pièce ayant séjourné au moins vingt-quatre heures dans l'alcool absolu, on la place pendant vingt-quatre heures dans une solution de gomme *stérilisée* ; la gomme s'infiltre dans toutes les mailles et les anfractuosités du tissu : elle formera, pour ainsi dire, une charpente intérieure, qui donnera de la fermeté au tissu. Lorsque la pénétration de la gomme est suffisante, la pièce tombe au fond du vase qui contient la solution.

La pièce gommée est portée sur le microtome où elle est coupée d'après la technique spéciale à l'instrument, technique que nous n'avons pas à rappeler ici.

Les coupes sont reçues dans un cristalliseur rempli d'eau distillée : on les laisse dégommer pendant une heure. On les transporte ensuite avec la palette de platine dans l'alcool absolu, où on les laisse se déshydrater pendant une heure.

Les coupes sont alors prêtes pour la coloration (2).

(1) Nous traitons ici de la technique avec le microtome à congélation. On rapportera aisément cette technique aux coupes faites avec tout autre microtome automatique, ou avec le microtome à main (le microtome à paraffine excepté).

(2) On peut avec le microtome à congélation faire des coupes de pièces fraîches ; on congèle la pièce sur le microtome, on la coupe,