



**HAL**  
open science

## **Actinomyces pyogenes : étude bactériologique conventionnelle et sur galeries Api de 103 souches isolées chez les ruminants**

V Guérin-Faublée, S Karray, B Tilly, Y Richard

### ► **To cite this version:**

V Guérin-Faublée, S Karray, B Tilly, Y Richard. Actinomyces pyogenes : étude bactériologique conventionnelle et sur galeries Api de 103 souches isolées chez les ruminants. Annales de Recherches Vétérinaires, 1992, 23 (2), pp.151-160. hal-00902058

**HAL Id: hal-00902058**

**<https://hal.science/hal-00902058v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## **Actinomyces pyogenes : étude bactériologique conventionnelle et sur galeries Api de 103 souches isolées chez les ruminants**

V Guérin-Faubleé \*, S Karray, B Tilly, Y Richard

*École nationale vétérinaire de Lyon, 1, avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy-l'Étoile, France*

(Reçu le 12 novembre 1991; accepté le 31 janvier 1992)

**Résumé** — Les caractères morphologiques, cultureux et biochimiques de 103 souches d'*Actinomyces pyogenes* isolées de ruminants ont été recherchés par des techniques conventionnelles et sur des galeries Api 50 CH et Api Coryne. Il n'a pas pu être mis en évidence de biotypes mais de rares souches atypiques peu ou pas protéolytiques à différencier de celles d'*Arcanobacterium haemolyticum*. Les caractères permettant l'identification d'*A pyogenes* au laboratoire ont été précisés : examen microscopique, culture sur gélose au sang, gélose profonde et milieu de Loeffler, recherche de la catalase, de la nitrate réductase et de la fermentation du xylose, test d'Hugh et Leifson. Les galeries Api Coryne n'ont permis l'identification que de 56% des souches ce qui nécessiterait une réévaluation avant l'emploi dans les laboratoires de diagnostic.

**Actinomyces pyogenes / bactériologie / galerie Api / identification / ruminant**

**Summary** — *Actinomyces pyogenes*: standard and Api bacteriological studies of 103 strains isolated from ruminants. One hundred and three strains of *Actinomyces pyogenes* isolated from ruminants were examined for morphological, cultural and biochemical properties by standard tests and by the Api 50 CH and Api Coryne methods. No biotype could be demonstrated, but a few atypical non- or practically non-proteolytic strains were detected which should be differentiated from *Arcanobacterium haemolyticum*. Criteria for laboratory identification of *A pyogenes* were established: Gram stain; culture on blood agar; deep agar and Loeffler's medium; catalase, nitrate reduction, acid formation from xylose; Hugh and Leifson test. The Api Coryne system correctly identified only 58 of 103 *A pyogenes* cultures, which implies that it should be re-evaluated before use in veterinary diagnosis laboratories.

**Actinomyces pyogenes / bacteriology / Api system / identification / ruminant**

---

\* Correspondance et tirés à part

## INTRODUCTION

*Actinomyces pyogenes* (Glage, 1903; Reddy Cornell et Fraza, 1982) est un hôte normal des muqueuses de l'animal, responsable d'infections suppurées graves chez les ruminants domestiques, le porc et, exceptionnellement, les oiseaux, le cheval et l'homme (Smith, 1966). De distribution apparemment mondiale, c'est probablement la bactérie pyogène la plus souvent isolée chez les bovins et les caprins. Elle induit des abcès superficiels et profonds, de localisations variées, des arthrites, des bronchopneumonies et, chez la vache et la truie, des métrites accompagnées d'avortements et des mammites. Des infections généralisées sont observées, chez le jeune en particulier (Verge et Senthille, 1941).

Rattaché en 1918 par Ebersson au genre *Corynebacterium*, *A. pyogenes* a été reclassé en 1982 (Reddy *et al*) dans le genre *Actinomyces* d'après des caractéristiques chimiques et physiologiques (Collins et Jones, 1982). Contrairement aux bactéries du genre *Corynebacterium*, sa paroi ne possède pas d'acides mycoliques ni d'arabinogalactane et l'acide diaminé du peptidoglycane est de la L-lysine (Cummins et Harris, 1956; Goodfellow *et al*, 1976; Collins *et al*, 1982a). De plus, les quinones respiratoires sont des ménaquinones (ménaquinones tétrahydrogénées à 10 unités d'isoprène) (Collins *et al*, 1982a). Le seul cytochrome présent est de type b (Reddy *et al*, 1977, 1982). En atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>, les produits terminaux majeurs de la fermentation du glucose sont l'acide succinique, l'acide acétique et l'acide formique (Reddy et Cornell, 1982). Les acides gras cellulaires sont linéaires, saturés et mono-insaturés (14 : 0, 16 : 0, 18 : 1 ω 9, 10 : 0, 12 : 0) (Collins *et al*, 1982a; Bernard *et al*, 1991). Les analyses de taxinomie numérique sont en accord

avec cette classification (Harrington, 1966; Schofield et Schaal, 1981).

La structure, la composition chimique et la physiologie d'*A. pyogenes* sont donc bien connues de même que ses besoins nutritifs (Reddy et Cornell, 1982; Reddy *et al*, 1982).

L'identification d'*A. pyogenes* ne nécessite pas, comme pour la plupart des bactéries dites corynéformes, le recours aux techniques chimiotaxinomiques. Néanmoins, elle peut poser des problèmes pour un laboratoire de diagnostic vétérinaire.

L'étude bactériologique de 103 souches d'*A. pyogenes* d'origine animale a été entreprise par des techniques conventionnelles afin de préciser les caractères qui doivent être recherchés pour une identification correcte en pratique de laboratoire de diagnostic vétérinaire. L'emploi des galeries Api Coryne, commercialisées en 1990, lui a été comparé.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Souches bactériennes*

Cent trois souches d'*A. pyogenes* ont été utilisées dans cette étude. Collectées par le Laboratoire de pathologie bovine (CNEVA, Lyon, France) de 1984 à 1990, la plupart (97) provenait de bovins, 4 de moutons et 2 de chèvres; 52 ont été isolées à partir de l'appareil respiratoire d'animaux malades ou sains, 20 à partir de laits, 10 à partir de l'appareil génital ou d'avortons; les autres étaient issues de lésions suppurées diverses ou d'origine inconnue. Elles ont toutes été initialement lyophilisées puis, ultérieurement, conservées congelées à -70 °C dans un bouillon cœur-cerveau (réf 0037-01-6, Difco, Détroit, USA) additionné de 10% de glycérol.

La souche 103 129 T (ATCC 19411) de la Collection nationale de cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur (Paris) a été incluse comme référence.

### Milieux de base

Cinq milieux de base ont été utilisés :

- bouillon trypcase-glucose-extrait de levure : bioTrypcase, réf 5 364 1, BioMérieux, 69 Marcy l'étoile, France : 30 g; glucose, réf 8342, Merck, Darmstadt, Allemagne : 5 g; extrait de levure, réf 0127-01-7, Difco Détroit, USA : 20 g; L-cystéine, réf C-7880, Sigma, St Louis, USA : 0,5 g; eau distillée : QSP 1 l;
- gélose trypcase-glucose-extrait de levure de même composition plus bacto agar (réf 0140-01, Difco) à la concentration de 15 g/l;
- bouillon trypcase-extrait de levure semblable au précédent mais sans glucose;
- gélose cœur-cerveau (réf 0418-01-5, Difco);
- bouillon cœur-cerveau (réf 0037-01-6, Difco).

Dans certains cas, les bouillons ont été supplémentés par du Tween 80 (réf 822 187, Merck).

### Caractères morphologiques

Un examen microscopique (x 400) à l'état frais et un examen microscopique (x 1 000) après coloration de Gram ont été réalisés à partir d'un bouillon cœur-cerveau incubé à 37 °C durant 1, 3, 7 et 10 j.

### Caractères cultureux

Les caractères cultureux ont été étudiés pendant 14 j à 37 °C sur bouillon trypcase-glucose-extrait de levure, sur gélose cœur-cerveau et sur gélose trypto-caséine soja (réf 64554, Diagnostics Pasteur, 92 Marnes-la-Coquette, France) additionnée de 5% de sang défibriné de mouton (réf 5 582 2, BioMérieux).

La sérophilie a été recherchée en comparant la croissance des souches d'une part sur une gélose cœur-cerveau et d'autre part sur une gélose cœur-cerveau additionnée de 5% de sérum (réf 295 990, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Allemagne).

### Métabolisme respiratoire

Le type respiratoire a été déterminé par croissance en gélose profonde trypcase-glucose-extrait de levure (milieu semi-gélosé à 6 g/l) et le caractère anaérobie préférentiel a été mis en évidence en comparant la croissance des souches sur 2 géloses cœur-cerveau incubées l'une en aérobiose et l'autre en anaérobiose (Generbag Anaer, réf 4 550 1, BioMérieux).

L'oxydase (réf 58 831, Diagnostics Pasteur), a été recherchée à partir de colonies isolées sur gélose cœur-cerveau et la catalase d'une part sur les cultures en gélose profonde et d'autre part à partir de colonies isolées sur gélose au sang en utilisant le réactif ID color (réf 5 556 1, BioMérieux). La nitrate réductase a été mise en évidence par adjonction des réactifs de Griess (réf 7 044 0 et 7 045 0, BioMérieux) à un bouillon trypcase-extrait de levure additionné de 0,1% (m/v) de nitrate de potassium (réf 26 869.234, Prolabo, 75 Paris).

### Métabolisme protidique

La protéolyse a été mise en évidence sur milieu de Loeffler (réf 4 168 4, BioMérieux), sur gel d'agar au lait (Marchal *et al*, 1982), sur une gélose trypcase-glucose-extrait de levure additionnée d'1% (m/v) de caséine (réf 2242, Merck) et la gélatinolyse par la méthode de Frazier (Marchal *et al*, 1982) sur une gélose trypcase-glucose-extrait de levure additionnée de 8% (m/v) de gélatine (réf 5 324 1, BioMérieux).

La production d'indole à partir du tryptophane a été recherchée sur un bouillon trypcase-extrait de levure additionné de 0,02% de tryptophane (réf 5190, Prolabo). La lecture a été faite après extraction de l'indole par l'éther par addition du réactif d'Ehrlich Kovacs (réf 7 041 0, BioMérieux).

La production d'hydrogène sulfuré à partir des acides aminés a été mise en évidence sur une gélose cœur-cerveau additionnée de 0,02% (m/v) de cystéine (réf C-7880, Sigma), et de 0,05% (m/v) de citrate ferrique (réf 3862, Merck). Le milieu de Falkow (Marchal *et al*, 1982) contenant de la L-arginine (réf 1543,

Merck, à la concentration de 0,5% (m/v) a permis la recherche de l'arginine dihydrolase et le milieu de Christensen (réf 63725, Diagnostics Pasteur) celle de l'uréase.

### **Métabolisme des sucres**

La production de gaz lors de la fermentation du glucose a été mise en évidence sur une gélose cœur-cerveau supplémentée par 5% de sérum de cheval, coulée en tube, régénérée au moment de l'emploi et close par de la paraffine solide (réf 26 154.291, Prolabo) après ensemencement. Le milieu d'Hugh et Leifson (Marchal *et al*, 1982) additionné de glucose à la concentration finale de 0,5% a servi à étudier l'oxydation-fermentation du glucose.

Les galeries Api 50 CH (réf 5030, BioMérieux) ont permis l'étude de la fermentation de 49 sucres et dérivés. Le milieu de suspension des bactéries a été préparé par addition d'une solution de rouge de phénol (réf 3.16836, RAL, 92 Villeneuve-la-Garenne, France) (Marchal *et al*, 1982) au milieu suivant (G Wagener, communication personnelle) : Casitone, réf 0259-01, Difco : 6 g; extrait de levure, réf 0127-017, Difco : 0,5 g; eau d'Évian (Évian-les-Bains, France) : QSP 1 l. Il a été supplémenté par 5% de sérum de cheval. Des études préliminaires de reproductibilité sur 4 souches nous ont amenés à noter comme fermentés les sucres pour lesquels on observait sur galerie Api 50 CH une coloration jaune franc même si elle n'était pas stable dans le temps. De plus, quand la souche avait une croissance lente (c'est-à-dire quand le D-arabinose, le galactose, la N-acétyl glucosamine, le mélézitose et le L-fucose n'étaient pas fermentés au 3<sup>e</sup> j d'incubation), la galerie Api 50 CH a été recommencée.

La fermentation du xylose a aussi été recherchée en tube par mesure du pH après ensemencement d'une eau peptonée (casitone : 20 g; NaCl : 5 g; eau distillée : QSP 1 l) additionnée d'1% (m/v) de D-xylose (réf 29 013.237, Prolabo).

L'hydrolyse de l'amidon a été recherchée par inondation par du lugol d'une gélose trypcase-glucose-extrait de levure additionnée d'1% (m/v) d'amidon (réf 1259, Merck).

### **Métabolisme lipidique**

Lipase et lécithinase ont été mises en évidence sur une gélose trypcase-glucose-extrait de levure additionnée de 5% (v/v) d'une émulsion stabilisée de jaune d'œuf (réf SR47, Oxoid, Basingstoke, Angleterre). Le milieu de Sierra (Marchal *et al*, 1982) additionné d'1% (v/v) de tween 80, 60, 40 ou 20 (réf 822 187, 822 186, 822 185, 822 184, Merck) a permis la caractérisation des Tween-estérases.

### **Autres caractères**

La désoxyribonucléase a été révélée sur gélose à l'ADN (réf 5 174 1, BioMérieux) par inondation par une solution de bleu de toluidine (réf 3.61596, RAL) à 1% (m/v) en eau distillée.

La production d'une hémolysine a été recherchée sur la gélose au sang de mouton utilisée pour l'étude des caractères cultureux. On a aussi réalisé un test de CAMP (Christie *et al*, 1944) vis-à-vis d'une souche  $\beta$ -hémolytique de *Staphylococcus aureus* et d'une souche de *Streptococcus agalactiae* ensemencées en même temps qu'*A. pyogenes*. Les 2 souches d'épreuve étaient d'isolement récent.

Les galeries Api Coryne (réf 2090, BioMérieux) ont permis la mise en évidence, outre de caractères fermentaires d'un certain nombre d'activités enzymatiques (tableau I). Elles ont été révélées par l'adjonction de réactifs selon la technique préconisée par le fabricant après 24 h d'incubation à 37 °C. Un profil numérique en a été déduit qui peut être comparé aux profils des différentes espèces bactériennes obtenus sur ces galeries et répertoriés dans le catalogue analytique Api Coryne (réf 2 099 0, BioMérieux). La lecture de l'uréase, de la gélatinase et des caractères fermentaires a été renouvelée à 48 et 72 h.

### **Inoculum**

Chaque souche a été isolée sur une gélose au sang de mouton puis cultivée sur un bouillon cœur-cerveau additionné de 0,1% (v/v) de tween 80 à 37 °C pendant 48 h.

**Tableau I.** Propriétés biochimiques sur galeries Api Coryne de 103 souches d'*Actinomyces pyogenes* isolées chez les ruminants.

Réactions	Souches positives (%)	
	24 h	72 h
Réduction des nitrates	0	ND
Pyrazinamidase	29	ND
Pyrrolidonyl arylamidase	60	ND
Phosphatase alcaline	39	ND
$\beta$ -Glucuronidase	100	ND
$\beta$ -Galactosidase	58	ND
$\alpha$ -Glucosidase	93	ND
N-acétyl- $\beta$ -Glucosaminidase	0	ND
Esculine ( $\beta$ glucosidase)	0	ND
Uréase	0	0
Hydrolyse de la gélatine	77	97
Fermentation du glucose	100	100
ribose	100	100
xylose	100	100
mannitol	0	0
maltose	100	100
lactose	100	100
saccharose	53	74
glycogène	13	34

Pour la détermination de la majorité des caractères, l'inoculum a été obtenu en ensemencant 10 ml d'un bouillon cœur-cerveau additionné de 5% (v/v) de sérum de cheval et de 0,1% (v/v) de Tween 80 par 400  $\mu$ l de la culture précédente. Le Tween 80 ajouté aux milieux de préparation des bactéries prévient la formation d'agrégats et permet d'obtenir des inoculums reproductibles. Après 48 h d'incubation à 37 °C, la densité optique a été mesurée à 430 nm et ajustée à 1 avec de l'eau distillée. Les milieux liquides ont été ensemencés avec 500  $\mu$ l de cette suspension bactérienne pour 10 ml de milieu et les milieux solides coulés en boîtes de Pétri par des gouttes de 5  $\mu$ l. La même suspension a servi à ensemencer la gélose profonde et les milieux pour la recherche de la production de gaz et d'H<sub>2</sub>S. Gélose à l'ADN, milieu de Loeffler et urée de Christensen ont été ensemencés à partir de colonies isolées sur milieu solide.

La recherche de la sérophilie et du caractère anaérobie préférentiel a nécessité l'emploi de faibles inoculums (environ 10<sup>4</sup> CFU). À cette fin, la bouillon cœur-cerveau supplémenté a été ensemencé par 30  $\mu$ l de la culture initiale en milieu liquide et après 18 h de culture à 37 °C dilué en fonction de la densité optique à 430 nm selon les règles suivantes :

dilution	DO 430 nm
1 / 10	0,1 – 0,2
1 / 25	0,2 – 0,4
1 / 50	0,4 – 0,7
1 / 100	≥ 0,7

Les géloses ont été ensemencées par des gouttes d'1  $\mu$ l délivrées à l'aide d'un inoculateur multipointes (réf A 400, Denley, Nattslane Billingshurst, Angleterre).

Les galeries Api Coryne ont été ensemencées à partir d'une suspension bactérienne d'opacité 6 de la gamme de McFarland; les bactéries ont été obtenues par centrifugation puis lavage et remises en suspension dans de l'eau distillée. Le protocole a été ensuite celui préconisé par le fabricant. La même suspension a servi à ensemencer le milieu de Falkow et les galeries Api 50 CH après dilution au 1 / 10 dans le milieu.

Tous les milieux ont été incubés en aérobiose à 37 °C à l'exception de ceux permettant la mise en évidence des Tween-estérases cultivés à 30 °C.

## RÉSULTATS

*A. pyogenes* est un bacille, immobile, assez trapu, d'environ 2 x 0,5  $\mu$ m, pléiomorphe. Dans les cultures jeunes, les bacilles droits ou légèrement incurvés, faiblement irréguliers ou réguliers, à extrémités arrondies, parfois en massue ou effilées prédominent. Ils sont isolés, en «pelotes d'épingles» ou assemblés en courtes chaînes, en palissades, en V, en Y, en T. Dans les cultures de plus d'une semaine, ils sont plus courts devenant des coccobacilles irréguliers. Ce sont des bactéries qui prennent le Gram de manière non uni-

forme et qui ont une tendance très nette à apparaître à coloration Gram négative en vieillissant.

*A. pyogenes* croît en milieu liquide en formant un trouble homogène, rarement grumeleux, accompagné d'un dépôt. En vieillissant, les bactéries sédimentent plus ou moins vite selon les souches et au 14<sup>e</sup> j, le milieu est totalement éclairci avec un culot abondant se remettant facilement en suspension. Sur gélose au sang, les colonies visibles dès 24 h (0,1 à 0,2 mm) deviennent bien observables à 48 h : elles sont rondes, à bords nets, convexes, lisses, brillantes, blanches à gris-blanchâtres, de 0,4 à 1,1 mm. Une zone d'hémolyse complète étroite (0,1 à 0,3 mm) les entoure. Vers 5 j, elles atteignent 1 à 2,5 mm avec une zone d'hémolyse un peu plus large (0,2 à 0,5 mm). En vieillissant, elles peuvent devenir brunâtres ou grisâtres et leurs contours sont plus irréguliers. Certaines sont acuminées. Leur taille, très variable, est au maximum de 3-4 mm avec une zone d'hémolyse complète d'1 mm. Les colonies, de même aspect, poussent plus lentement, sont plus petites et de taille beaucoup plus variable sur gélose cœur-cerveau : 0,1 mm à 48 h, 0,4 à 0,8 mm au 7<sup>e</sup> j et 1 mm à 2 semaines.

La sérophilie de toutes les souches est observée facilement après 48 ou 72 h de culture.

Toutes les souches produisent un facteur de CAMP vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* si la lecture est prolongée 3 j et aucune vis-à-vis de *Streptococcus agalactiae*.

Les caractères biochimiques des 103 souches étudiées se sont avérés très constants et identiques à ceux de la souche de référence. En gélose profonde, *A. pyogenes* apparaît aéro-anaérobie facultatif mais croît mieux dans le fond du tube

et pour environ 10% des souches dans la zone microaérophile. Le caractère anaérobie préférentiel est confirmé par une culture plus abondante en 24 h en anaérobiose qu'en aérobiose.

Aucune souche ne produit de catalase ni d'oxydase après 3 j d'incubation; de nitrate réductase, d'uréase, d'ADH, d'hydrogène sulfuré à partir des acides aminés, d'indole, de lipase et lécithinase, de Tween 80-estérase après 14 j d'incubation. Aucune n'hydrolyse l'amidon et l'esculine.

Toutes les souches hydrolysent l'ADN en 24 h.

Soixante-cinq pour cent des souches ont une Tween 40-estérase, 40% une Tween 60-estérase, 0,9% une Tween 20-estérase; ces caractères apparaissent tardivement et sont peu reproductibles.

L'importante activité protéolytique d'*A. pyogenes* a été vérifiée sur 100 souches : elles hydrolysent la gélatine, la caséine et digèrent le sérum coagulé dans un délai de 24 h. Une souche est faiblement protéolytique : seule, la gélatinolyse révélée par la technique de Frazier est positive tardivement. Deux autres souches sont non protéolytiques quelle que soit la technique utilisée et en prolongeant l'incubation 2 semaines.

*A. pyogenes* a un métabolisme fermentaire et acidifie plus vite et plus fortement le tube fermé que le tube ouvert. Le glucose est fermenté sans production de gaz. Le profil fermentaire des 103 souches d'*A. pyogenes* est particulièrement homogène, surtout si l'incubation est prolongée 10 j. Ne sont jamais fermentés, le L-arabinose, le L-xylose, le  $\beta$ -méthyl-xyloside, le L-sorbose, le rhamnose, le dulcitol, le mannitol, le sorbitol, l' $\alpha$ -méthyl D-mannoside, l'amygdaline, l'arbutine, la salicine, le cellobiose, le mélibiose, l'inuline, le D-raffinose,

le  $\beta$ -gentiobiose, le D-tagatose, le D-fucose et le 2-cétogluconate. Toutes les souches fermentent en 24 h le ribose, le D-xylose, le D-glucose, le maltose, le lactose, l'amidon et le glycogène; un peu plus lentement (3-7 j), le D-arabinose, l'adonitol, le galactose, le D-fructose, l'inositol, la *N*-acétyl glucosamine, le mélézitose, le D-turanose, le D-lyxose, le L-fucose et le gluconate; plus tardivement (vers 10 j), l'érythritol et le tréhalose. Sont aussi fermentés par plus de 90% des souches le glycérol, le saccharose, le xylitol, le D-arabitol et le L-arabitol. Seuls, 3 caractères fermentaires sont variables : le D-mannose (76% de souches positives), l' $\alpha$ -méthyl D-glucoside (31%) et le 5 céto-gluconate (85%). La fermentation du xylose est aussi observable en tubes pour toutes les souches avec un pH abaissé en moyenne à 5,1 après 3 j d'incubation.

Les résultats obtenus sur galeries Api Coryne sont reportés dans le tableau I. Comme observé avec les techniques précédentes, aucune souche n'hydrolyse l'urée ni l'esculine et ne réduit les nitrates. L'activité gélatinase n'apparaît, pour 20% des souches, que dans un délai de 48 à 72 h. Les 3 souches atypiques peu ou pas protéolytiques par les techniques conventionnelles sont gélatinase négatives. Le glycogène et, dans une moindre mesure, le saccharose, sont fermentés beaucoup moins souvent que sur galeries Api 50 CH. Toutes les souches possèdent une  $\beta$ -glucuronidase. Les caractères pyrrolidonyl arylamidase et pyrazinamidase ne sont pas reproductibles. Après 24 h d'incubation, de nombreux profils numériques sont obtenus (tableau II) qui reflètent la variabilité de certaines activités enzymatiques; sur 46, 24 sont répertoriés dans le catalogue analytique Api Coryne et 58 souches, soit 56%, sont identifiées comme *A. pyogenes*.

**Tableau II.** Profils numériques obtenus sur galeries Api Coryne de 103 souches d'*Actinomyces pyogenes* isolées chez les ruminants.

Profils numériques	Nombre de souches
0612761*	9
4712761	8
0210760*	5
4712760	5
0212760*	4
0612760*	4
6612761	4
6712761	4
0212761*	3
4210760	3
4212763	3
4612760	3
4612761	3
6312761	3
0312760*	2
0610760*	2
2202760*	2
4212760	2
4312761	2
4610760	2
4710760	2
4710761	2
6712760	2
6712763	2
0210761*	1
0212763*	1
0612763*	1
2202763*	1
2210760*	1
2212760*	1
2212763*	1
2602761*	1
2612760*	1
2712761*	1
2712763*	1
4202760	1
4210763*	1
4212761	1
4302760	1
4310760	1
4612762	1
4710763	1
6202760*	1
6310763*	1
6312760	1
6710761	1

\* Profils non répertoriés dans le catalogue analytique Api Coryne.



## DISCUSSION

Les 103 souches d'*A pyogenes* isolées de ruminants ont des caractères morphologiques, culturels et biochimiques identiques à ceux de la souche de collection ATCC19411.

Nos résultats sont en accord avec ceux des autres auteurs. Les caractères fermentaires sont difficilement comparables, les techniques (milieu, inoculum, atmosphère d'incubation) n'étant pas les mêmes mais néanmoins, tous les résultats s'accordent à affirmer qu'*A pyogenes* fermente le glucose, l'amidon, le fructose, le galactose, le lactose, le maltose, le ribose, le xylose et ne fermente pas l'amygdaline et le dulcitol (Roberts, 1968a; Hoi Sorensen, 1974; Schofield et Schaal, 1981; Reddy *et al*, 1982; Tainaka *et al*, 1983; Schaal, 1986; Morrison et Tillotson, 1988; Lämmli et Blobel, 1988). Des divergences sont notées par rapport à Schaal (1986) concernant la fréquence de l'hydrolyse des Tweens 60, 40 et de l'amidon. Aucune souche n'a d'activité *N*-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase alors qu'elle est détectée, d'après le fabricant, chez 41% des souches sur galeries Api Coryne, chez plus de 90% des souches sur galeries Api Zym ou par macrométhode (Schaal, 1986; Lämmli et Blobel, 1988; Kakfas et Edwardsson, 1990) et que 100% des souches fermentent la *N*-acétyl glucosamine. De même, les fréquences de mise en évidence des activités pyrrolidonyl arylamidase et  $\beta$ -galactosidase sont basses par rapport aux données du fabricant sur galeries Api Coryne et à celles de Morrison et Tillotson (1988) ou de Lämmli et Blobel (1988) sur galeries Api 20 strep et Api Zym respectivement. Une faible taille des inoculums (perte éventuelle de vitalité des bactéries lors des centrifugations) pourrait expliquer ces résultats. Il est d'ailleurs à noter que la société API préco-

nise de préparer les suspensions bactériennes à partir de cultures sur milieux solides sans autre traitement, ce qui peut apporter des facteurs de croissance que nous désirions supprimer dans le cadre de cette étude. Ceci rend aussi compte du nombre important de profils numériques non répertoriés dans le catalogue analytique Api, la majeure partie commençant par 0 ou 2 ce qui correspond à des souches notées pyrrolidonyl arylamidase moins.

D'autres critiques peuvent être faites quant aux techniques retenues. *A pyogenes* est une bactérie anaérobie aérotolérante capnophile (Reddy *et al*, 1982). Les caractères biochimiques auraient pu être déterminés dans des conditions de croissance optimales. Nous avons néanmoins choisi d'incuber en aérobiose pour nous rapprocher des techniques mises en œuvre dans les laboratoires vétérinaires départementaux. *A pyogenes* est une bactérie à croissance lente. Dans notre étude, du fait de cette croissance lente, la densité des inoculums a été accrue, les incubations prolongées ou les milieux supplémentés par du sérum, ce qui peut interférer avec la recherche de certains caractères fermentaires. La standardisation de l'inoculum est délicate, la mesure des DO dénombrent les bactéries vivantes et mortes. De plus, cette bactérie a tendance à former des agrégats, ce que n'évite pas constamment l'adjonction de Tween 80 aux bouillons de culture.

Les 103 souches étudiées apparaissent phénotypiquement très uniformes et il n'est pas possible de décrire de biotypes chez *A pyogenes* malgré la recherche d'un plus grand nombre de caractères que Roberts (1968a, b), Hoi Sorensen (1974) et Tainaka *et al* (1983). Néanmoins, Lämmli (1990) a décrit des bactériocinotypes et Lovell (1937) puis Tainaka *et al* (1983) des sérotypes, signes d'une certaine hétérogénéité.

L'existence de rares souches atypiques non protéolytiques a déjà été signalée (Hartwigk, 1961). La perte du pouvoir protéolytique n'a pas de cause apparente et ne semble pas liée au nombre de subcultures. Ces souches doivent être distinguées de celles d'*Arcanobacterium haemolyticum*, espèce phénotypiquement proche d'*A pyogenes* mais non ou faiblement protéolytique, ne fermentant pas le D-xylose et possédant une lipase (Collins *et al*, 1982b; Wagener, com pers). D'autres critères de séparation ont été proposés : présence chez *A pyogenes* d'un antigène reconnu par les sérums anti-streptocoques du groupe G (Lämmli et Blobel, 1986, 1988); inhibition de l'activité  $\beta$ -hémolytique de *Staphylococcus aureus* par *A haemolyticum* et renforcement de celle de *Streptococcus agalactiae* (Fraser, 1964) contrairement, comme nous l'avons vérifié, à *A pyogenes*. Des travaux complémentaires sur *A haemolyticum* seraient nécessaires pour préciser l'intérêt des profils fermentaires, de l'étude de l'étendue des températures de croissance, de la recherche de la  $\beta$ -glucuronidase et de l' $\alpha$ -glucosidase dans la distinction de ces 2 espèces (Schofield et Schaal, 1981; Lämmli et Blobel, 1988; Morrison et Tillotson, 1988).

D'un point de vue pratique, l'identification d'*A pyogenes*, dans un laboratoire de diagnostic, peut se limiter à un examen microscopique, une culture sur une gélose au sang, en gélose profonde et sur un milieu de Loeffler, une recherche de la catalase, de la nitrate réductase et de la fermentation du xylose et un test d'Hugh et Leifson. Pour les souches non protéolytiques, il faut, de plus, rechercher la gélatinolyse par la technique de Frazier après une incubation de plusieurs jours, la production d'une lipase sur gélose à l'œuf et effectuer des tests de CAMP. Les galeries Api Coryne permettent une identification

correcte des bactéries corynéformes (Freney *et al*, 1991). Néanmoins, 44% des 103 souches examinées ont un profil numérique non répertorié ce qui nécessiterait une réévaluation avant l'emploi dans les laboratoires de routine.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier JL Martel (CNEVA, laboratoire de pathologie bovine, Lyon) pour nous avoir procuré les souches d'*Actinomyces pyogenes* ayant servi à cette étude. Nos remerciements vont également au professeur Flandrois (Faculté de médecine, Lyon-sud) pour ses critiques et conseils lors de la rédaction de cet article.

## RÉFÉRENCES

- Bernard KA, Bellefeuille M, Ewan EP (1991) Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic Gram-positive rods. *J Clin Microbiol* 29, 83-89
- Christie R, Atkins NE, Munch-Petersen E (1944) A note on a lytic phenomenon shown by Group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med Sci* 22, 197-200
- Collins MD, Jones D (1982) Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the genus *Actinomyces*, as *Actinomyces pyogenes* comb nov. *J Gen Microbiol* 128, 901-903
- Collins MD, Jones D, Kroppenstedt RM, Schleifer KH (1982a) Chemical studies as a guide to the classification of *Corynebacterium pyogenes* and "*Corynebacterium haemolyticum*". *J Gen Microbiol* 128, 335-341
- Collins MD, Jones D, Schofield GM (1982b) Reclassification of "*Corynebacterium haemolyticum*" (MacLean, Liebow and Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen nov as *Arcanobacterium haemolyticum* nom rev, comb nov. *J Gen Microbiol* 128, 1279-1281
- Cummins CS, Harris H (1956) The chemical composition of the cell wall in some Gram-

- positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J Gen Microbiol* 14, 583-600
- Fraser G (1964) The effect on animal erythrocytes of combinations of diffusible substances produced by bacteria. *J Pathol Bacteriol* 88, 43-53
- Frenay J, Duperron MT, Courtier C, Hansen W, Allard F, Bœufgras JM, Monget D, Fleurette J (1991) Evaluation of Api Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J Clin Microbiol* 29, 38-41
- Goodfellow M, Collins MD, Minnikin DE (1976) Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolysates of coryneform and related taxa. *J Gen Microbiol* 96, 351-358
- Harrington BJ (1966) A numerical taxonomic study of some *Corynebacteria* and related organisms. *J Gen Microbiol* 45, 31-40
- Hartwigk H (1961) A typische Merkmale von *Corynebacterium* (C) *pyogenes* beim Rind. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 68, 38-41
- Hoi Sorensen G (1974) *Corynebacterium pyogenes*. A biochemical and serological study. *Acta Vet Scand* 15, 544-554
- Kalfas S, Edwardsson S (1990) Identification procedures for oral *Actinomyces* species. *Oral Microbiol Immunol* 5, 39-42
- Lämmli C (1990) Typing of *Actinomyces pyogenes* by its production and susceptibility to bacteriocin-like inhibitors. *Zentralbl Bakteriol* 273, 173-178
- Lämmli C, Blobel H (1986) Tentative identification of *Actinomyces pyogenes* with antisera against group G streptococci. *Zentralbl Bakteriol Hyg A* 262, 357-360
- Lämmli C, Blobel H (1988) Comparative studies on *Actinomyces pyogenes* and *Arcanobacterium haemolyticum*. *Med Microbiol Immunol* 177, 109-114
- Lovell R (1937) Studies on *Corynebacterium pyogenes*, with special reference to toxin production. *J Pathol Bacteriol* 45, 339-355
- Marchal N, Bourdon JL, Richard C (1982) *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Doin, Paris
- Morrison JRA, Tillotson GS (1988) Identification of *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes* with the Api 20 Strep system. *J Clin Microbiol* 26, 1865-1866
- Reddy CA, Cornell CP (1982) Physiological and nutritional features of *Corynebacterium pyogenes*. *J Gen Microbiol* 128, 2851-2855
- Reddy CA, Cornell CP, Kao M (1977) Hemin-dependant growth stimulation and cytochrome synthesis in *Corynebacterium pyogenes*. *J Bacteriol* 130, 965-967
- Reddy CA, Cornell CP, Fraga AM (1982) Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb nov. *Int J Syst Bacteriol* 32, 419-429
- Roberts RJ (1968a) Biochemical reactions of *Corynebacterium pyogenes*. *J Pathol Bacteriol* 95, 127-130
- Roberts RJ (1968b) A numerical taxonomic study of 100 isolates of *Corynebacterium pyogenes*. *J Gen Microbiol* 53, 299-303
- Schaal KP (1986) Genus *Actinomyces* Harz 1877. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds) 2, 9<sup>e</sup> edn Williams and Wilkins, Baltimore, 1383-1418
- Schofield GM, Schaal KP (1981) A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J Gen Microbiol* 127, 237-259
- Smith JE (1966) *Corynebacterium* species as animal pathogens. *J Appl Bacteriol* 29, 119-130
- Tainaka M, Kume T, Takeuchi S, Nishio S, Saito H (1983) Studies on the biological and serological properties of *Corynebacterium pyogenes*. *Kitasato Arch Exp Med* 56, 105-117
- Verge J, Senthille F (1941) Les infections pyobacillaires (deuxième mémoire). Étude clinique et expérimentale. *Recl Méd Vét* (Alfort) 117, 257-278