

Identification sérologique rapide de *Clostridium perfringens* par une microtechnique d'immunodiffusion sur lame

par J.-P. GUILLOU et L. CHEVRIER

— L'isolement et l'identification des principaux germes anaérobies sporulés ont certes connu une amélioration au cours des dernières années, grâce à une meilleure connaissance des facteurs indispensables à la croissance des germes, à la large commercialisation de milieux complexes de croissance bactérienne et de toxinogénèse et aussi à la possibilité d'un choix nuancé de conditions d'anaérobiose, poussées ou ménagées.

— Toutefois lors d'examens de routine effectués sur des prélèvements souvent en mauvais état, la flore anaérobie de pollution surajoutée retarde l'isolement et l'identification des clostridies pathogènes. Quant à la séroprotection *in vivo* par les sérums monovalents spécifiques, elle se révèle toujours onéreuse et parfois infidèle.

— Il paraît donc utile de proposer une méthode sérologique d'immunodiffusion, analogue à celle d'Ellner et Green, pour mettre rapidement en évidence les principales espèces de clostridies, même au sein d'un prélèvement polymicrobien. A titre d'exemple la méthode sera décrite pour le germe le plus fréquent et l'un des plus redoutables, *clostridium perfringens*.

MATÉRIEL. MÉTHODE. TECHNIQUE

A. — Souches.

Plusieurs dizaines de souches de *clostridium perfringens*, type A, ont été isolées à partir d'organes animaux ou de denrées d'origine animale et identifiées à la fois sur milieux de Willys, et sur cobayes séroprotégés. Une souche (souche 70 A), a été sélectionnée en raison de la fixité de ses caractères pathogènes et toxinogènes.

B. — Antigènes.

— La souche 70 A, a servi à préparer deux antigènes :

1) Un antigène ultrasonné comprenant après centrifugations et lavages répétés, 5×10^7 germes environ par ml, destiné à l'inoculation aux lapins (antigène « vaccinal »).

2) Un antigène « diagnostic », comprenant d'une part les corps microbiens lavés et centrifugés, et d'autre part le liquide surnageant ou « toxine ». Ces deux fractions ont servi à préparer six antigènes, qui figurent sur la planche I :

N° 1 : Liquide surnageant ou « toxine ».

N° 2 : Préparation précédente additionnée de pepsine (1/10 de pepsine titre 100 au 1/20 dans l'eau physiologique à ph 7,2), « toxine activée ».

N° 3 : Corps microbiens additionnés avec moitié de lysozyme.

N° 4 : Corps microbiens avec glycoColle à saturation.

N° 5 : Corps microbiens traités aux ultrasons (3 minutes).

N° 6 : Corps microbiens chauffés (10 minutes à 100 °C).

— D'autres antigènes ont été préparés de la même façon, avec les souches 62/1, 1491, 838/1, 2565, 62/2 ; 838/2, 2377 et 101 (planches II et III).

C. — Sérums.

— Deux catégories de sérums ont été utilisés :

1) Des sérums obtenus après inoculation de l'antigène « vaccinal » ultrasonné 70 A, à des lapins (sérums S₂.41 — S₅.41 — S₂.31, planche II).

Ces sérums traités par du sulfate d'ammonium à saturation, puis centrifugation, reprise du culot dans une solution de NaCl à 0,136 M (au total 7 traitements), ont permis d'obtenir des globulines purifiées, correspondant à 95 p. 100 de gamma globulines (G.05.66 et G.02.66 de la planche IV).

2) Des sérums hyperimmuns de l'Institut Pasteur : holosérum antiperfringens (S₁), sérum antiperfringens A (S₂), sérum antiperfringens C (S_c), sérum antiperfringens D (S_d), sérum anti-œdématisiens (SØ), sérum antichauveï (SØ), sérum antisepticum (S§), qui figurent dans la planche IV.

— A partir du sérum antiperfringens A (S₂) des globulines purifiées ont été préparées de la même façon que précédemment.

D. — *Méthode.*

La méthode utilisée est celle de l'immunodiffusion d'Ourcherlony sur lames. Celles-ci sont des lames ordinaires porte-objet, très propres sur lesquelles on coule quelques gouttes d'une solution chaude d'agarose A 45 à 3 p. 100 dans un tampon véronal (ph 8,2). Après séchage à l'étuve on verse sur les lames 4 ml d'une solution d'agarose 1,2 p. 100, en tampon véronal et après on perce des trous réguliers à l'emporte-pièce, ou mieux avec le système Egaton.

Les cupules sont alors garnies avec les sérums et les antigènes choisis et on laisse le tout à la température du laboratoire pendant 24 à 48 heures.

Ce temps écoulé, on lave les lames par immersion dans un bain de sérum physiologique (0,136 M), tamponné (ph 7,2) sous agitation magnétique. Le bain est renouvelé 3 à 4 fois en 48 heures. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée, recouvertes de papier filtre et séchées quelques heures à l'étuve à 37 °C. On peut alors colorer ces lames par immersion pendant 3 minutes dans une solution d'Amido Schwartz (*), et différenciation par la solution d'Heremans (**), et puis séchage à l'étuve à 37 °C.

RÉSULTATS

A) *Choix de l'antigène.*

Les photographies et schémas de la planche I, reproduisent une partie des résultats obtenus. Les six préparations antigéniques entourant les cupules centrales d'holosérum (S₁), ou de sérum anti A (S₂), ont pour toutes les souches (62/1 — 1491 — 838/1, etc...), la même disposition (décrite au chapitre antigène).

Les deux photographies et les schémas accolés montrent les précipitations observées avec deux souches différentes (62/1 et 1491), en présence du même holosérum (S₁).

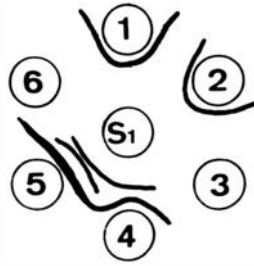
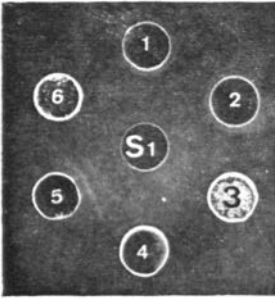
Deux schémas reproduisent les résultats notés avec deux autres souches (838/1 et 2565), en présence du même sérum monovalent anti A (S₂).

Les deux derniers schémas montrent les précipitations constatées avec la même souche (70 A), en présence des deux sérums : l'holosérum (S₁) et le sérum anti A (S₂).

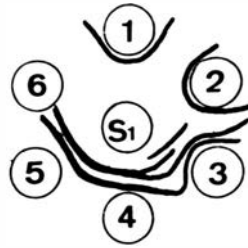
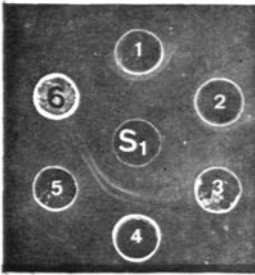
(*) Amido Schwartz 1 g — Acétate de sodium (3 H₂O) 3.45 g-ac. acétique crist. 15 ml — eau distillée — 500 ml.

(**) Ethanol à 95° : 400 ml — ac. acétique 100 ml — H₂O : 500 ml.

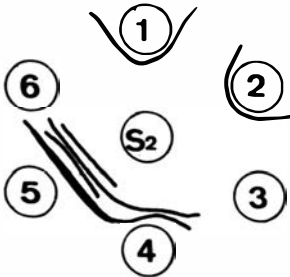
PLANCHE I



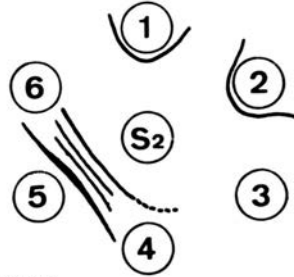
SOUCHE N° 62/1



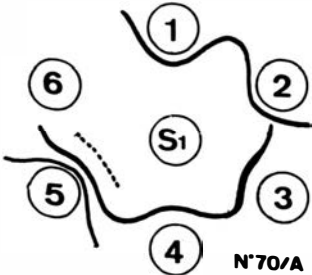
N° 1491



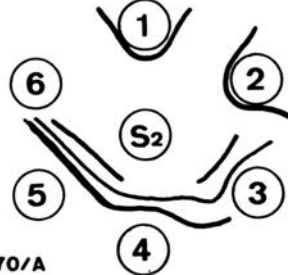
N° 838/1



N° 2565



N° 70/A



N° 70/A

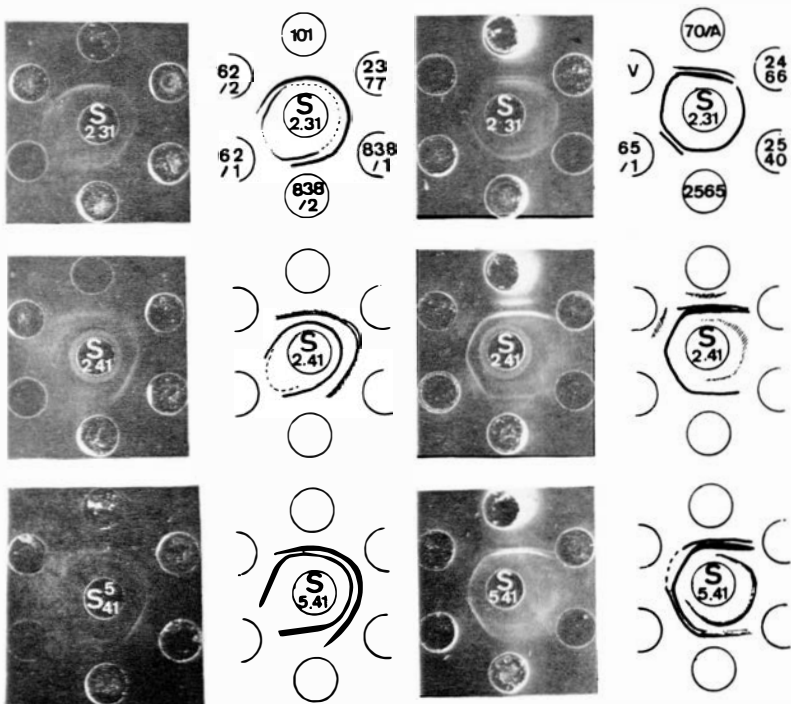
Photographies et schémas des lignes de précipitations obtenues avec six préparations antigéniques (l'antigène ultrasonné est en position 5), de *Cl. perfringens* en présence d'un holosérum antiperfringens (S₁), et d'un sérum monovalent anti A (S₂).

Les lignes de précipitation sont plus nombreuses avec le sérum monovalent anti A (S₂). Elles n'existent pas avec l'antigène 6 (corps microbiens soumis à un traitement thermique), et sont rares avec l'antigène 3 (corps microbiens traités au lysozyme). On note des raies faibles en 1 (surnageant recueilli après centrifugation et contenant la toxine microbienne brute), et en 2 (surnageant traité par la pepsine). Ces lignes sont plus constantes et plus nombreuses pour toutes les souches en 5 (corps microbiens soumis aux ultrasons), ce qui nous permet de choisir cette dernière préparation antigénique pour la suite de notre travail.

B) Choix du sérum.

La planche II reproduit les résultats observés avec trois sérums anti A obtenus sur lapins (dont les différences résident dans les

PLANCHE II



Photographies et schémas des lignes de précipitations observées entre douze préparations antigéniques ultrasonnées de *Cl. perfringens* A, et trois sérums monovalents anti A, préparés sur lapins (S₂31 - S₂41 - S₅41).

doses d'inoculation et les délais d'obtention), en présence de 12 souches de *clostridium perfringens* A, traitées aux ultra-sons.

Sur les photographies et schémas explicatifs, les antigènes sont les mêmes et ont la même disposition pour les trois rangées. Seuls les sérums sont différents.

La comparaison verticale montre un certain nombre de similitudes. Les lignes de précipitations sont faibles ou nulles avec la souche 62/1 ; elles sont plus nettes d'une façon générale, avec le sérum S_{5.41}. On note une légère discordance entre le sérum S_{2.31}, qui révèle un précipité avec les souches 24/66 et 25/40 (en haut à droite de la planche II), et les deux autres sérums pour lesquels ce précipité est très faible. Il est possible que, pour ces deux souches, les précipités aient été dissous dans un excès d'anticorps des sérums 2.41 et 5.41. En revanche, ces deux sérums donnent un précipité plus net avec l'antigène vaccinal (V), que celui qu'on observe avec le sérum S_{2.31}.

En résumé, la comparaison entre trois sérums anti A, préparés sur lapins, ne montre pas de différence importante. On peut reconnaître un léger avantage au sérum S_{5.41}.

La planche III, rapporte les résultats enregistrés avec les mêmes antigènes que ceux qui figurent dans la planche II, mais en présence, cette fois, de sérums du commerce et de globulines préparées à partir de ces sérums.

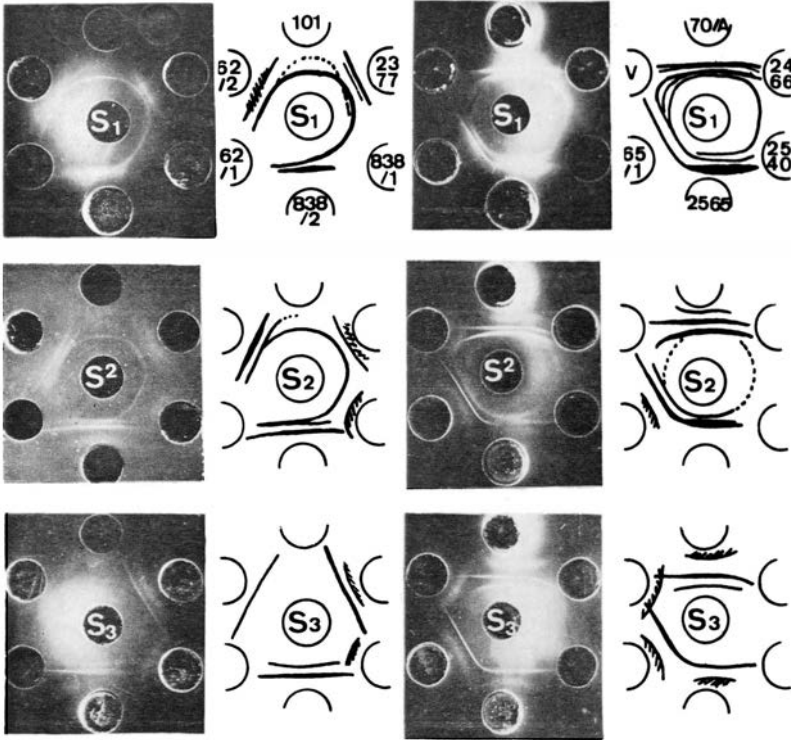
La rangée supérieure contient un holosérum antiperfringens (S₁), celle du centre contient un sérum monovalent antiperfringens A (S₂), et celle du bas contient des globulines purifiées (S₃) préparées à partir de S₂ (de la façon qui est rapportée au chapitre « sérums »).

Les images obtenues avec S₁, S₂ et S₃ sont semblables. Il n'y a aucune ligne de précipitation avec l'antigène 62/1 ; et les autres antigènes donnent des précipités analogues.

La comparaison peut être recherchée entre les images de S₂ (planche III), et l'ensemble de la planche II, dont les trois sérums sont également des sérums anti A, notamment S_{5.41}, qui a donné les meilleurs résultats. On voit alors que les lignes de précipitations sont plus nombreuses, et dans l'ensemble plus nettes avec le sérum S₂ (planche III), que celles de S_{5.41} (planche II), mais ces dernières sont toutefois plus visibles avec les antigènes 101, et surtout avec l'antigène V (vaccinal).

En conclusion, le choix de notre sérum se portera sur S₂, sérum monovalent antiperfringens A.

PLANCHE III



Photographies et schémas des lignes de précipitations observées entre douze préparations antigéniques ultrasonnées de *Cl. perfringens* A (les mêmes que celles qui figurent sur la planche II), et un holosérum anti-perfringens (S_1), un sérum monovalent anti A (S_2), sérums du commerce, et des globulines purifiées (S_3), préparées à partir du sérum monovalent S_2 .

C) *Spécificité de la réaction.*

La planche IV reproduit, en haut, les résultats obtenus avec quatre antigènes perfringens A, choisis parmi ceux qui figurent sur les planches II et III, en présence des sérums suivants :

S_1 = holosérum antiperfringens.

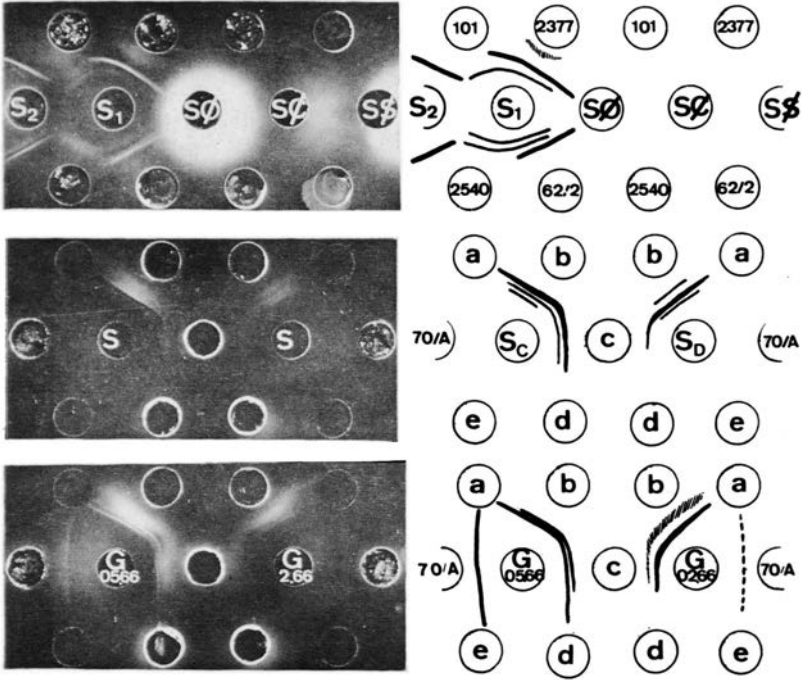
S_2 = sérum antiperfringens A.

$S\emptyset$ = sérum anti œdematiens.

$S\mathcal{L}$ = sérum anti chauveï.

$S\mathcal{S}$ = sérum anti septicum.

PLANCHE IV



En haut : Images obtenues entre quatre préparations antigéniques de *Cl. perfringens* A (101 - 2377 - 2540 - 62/2), et un holosérum antiperfringens (S_1), un sérum monovalent anti A (S_2), un sérum anti œdematiens (S_0), un sérum anti Chauveï (S_s), et un sérum anti septicum (S_c).

Au milieu : Images obtenues avec un sérum antiperfringens type C (S_c), et un sérum antiperfringens type D (S_d), en présence de différentes préparations antigéniques (*Cl. perfringens* type A figure seul en b, et en 70/A, et en mélange avec six autres germes en c).

En bas : Lignes de précipitations observées avec les mêmes préparations antigéniques que celles qui figurent au milieu de la planche et les globulines purifiées (G05/66 et G02/66), préparées à partir d'un sérum monovalent anti A, obtenu sur lapin.

Il y a spécificité d'espèce. Les précipitations existent seulement avec les deux sérums antiperfringens S_2 et S_1 .

La planche IV reproduit, au centre, les résultats obtenus avec un sérum antiperfringens, type C (S_c) et un sérum antiperfringens, type D (S_d) de l'Institut Pasteur, en présence des préparations antigéniques suivantes :

- a* = surnageant de culture de perfringens A,
b = culot culture de perfringens A, traité aux ultra-sons.
c = mélange culots perfringens, bacillus, colibacille, salmonelle, proteus, pyocyanique et shigella,
d = *idem* à *c*, mais sans perfringens,
e = surnageant de *d*,
f = souche 70 A vaccinale.

La spécificité d'espèce est conservée, puisque seuls *b* et *c*, qui contiennent des antigènes perfringens, donnent des précipités. La spécificité de type n'existe pas, comme on pouvait le prévoir, l'examen de la planche III révélant peu de différences entre l'holosérum (S₁) et le sérum anti A (S₂) dans une réaction dont l'aspect quantitatif n'est pas négligeable. Mais il est surtout important de noter une faible ligne de précipitation existant entre le sérum Sc et l'antigène C qui contient sept espèces bactériennes en plus de *Cl. perfringens*.

La planche IV reproduit, en bas, les résultats enregistrés avec les mêmes antigènes que ceux qui figurent au milieu de la planche IV et qui sont décrits au paragraphe précédent, en présence des globulines purifiées, obtenues à partir de deux sérums de lapins anti A (G 05/66 et G 02/66).

On retrouve les résultats esquissés avec Sc (milieu de la planche IV), mais beaucoup plus nets, ce qui est normal, puisqu'il s'agit de globulines obtenues à partir d'un sérum anti A, et que les cupules *b* et *c* contiennent des perfringens de même type. On aperçoit une ligne de précipitation nette avec 70 A, l'antigène vaccinal. L'important est que la précipitation en présence de l'antigène polymicrobien C, déjà observée avec Sc au milieu de la planche IV, est beaucoup plus nette avec G 05/66.

DISCUSSION

Ces résultats appellent un certain nombre de commentaires.

1° Il est nécessaire de définir des proportions optimales entre le sérum et l'antigène, pour obtenir une précipitation visible et éviter que les précipités soient dissous dans un excès de réactifs, ou bien repoussés vers la cupule antigène ou la cupule anticorps. Il est possible de cerner les concentrations recherchées en préparant une série de lames où les dilutions de sérum et d'antigène varient en sens inverse. Il faut éviter de recharger les

cupules, cette pratique pouvant, soit produire de nouvelles lignes de précipitation, soit dissoudre celles qui étaient déjà formées.

2° En présence de la même préparation antigénique, par exemple du culot de centrifugation de culture de *perfringens* A, traité aux ultra-sons, les réponses sérologiques sont assez voisines, qu'il s'agisse d'holosérum antiperfringens (S₁, planche I, position 5 — S₁, planche III — S₁, planche IV), de sérum anti A (S₂, planche III — S₂, planche IV), de sérum de lapin anti A (S₂.31, S₂.41, S₃.41, planche II), ou de globulines purifiées (S₃, planche III — G, planche IV). D'une façon générale, le nombre de lignes de précipitations diminue à mesure que la spécificité devient plus étroite (planche III).

3° En présence d'un même sérum, les résultats diffèrent quelque peu avec les souches de *Cl. perfringens* A étudiées. Les souches 62/1, 24/66, 25/40 et V donnent peu ou ne donnent pas de précipités avec le sérum lapin (planche II). Ces variations se retrouvent avec le sérum S₂ de l'Institut Pasteur (planche III). Elles sont donc indépendantes du sérum utilisé et proviennent probablement de certaines modifications antigéniques en relation avec l'ancienneté de l'isolement des souches et leur conservation en collection. Comme il est difficile de déceler ou d'apprécier *in vitro* ce délabrement antigénique, encore que la présente étude puisse peut-être en apporter le moyen, il est nécessaire, pour une étude complète ou comparative, d'utiliser des souches fraîchement isolées.

4° Nos critères reposent sur le nombre et la netteté des lignes de précipitation, dont chacune correspond à une fraction antigénique libérée. Ce n'est pas sûr, parce que le traitement aux ultra-sons peut avoir fractionné les molécules antigéniques. La plupart des souches fournissent quatre lignes de précipitation, mais on a pu en compter jusqu'à huit. Il est donc nécessaire de poursuivre l'étude des fractions antigéniques pour s'assurer de leur identité, de leur intégrité et déterminer celles qu'il importe de conserver dans un but diagnostique.

Cependant, les résultats que cette étude nous a permis d'atteindre, notamment en ce qui concerne la spécificité de la réaction et la mise en évidence de *Cl. perfringens* dans une préparation polymicrobienne (planche IV), nous semblent assez prometteurs pour présenter cette technique, non comme la conclusion d'une étude particulière, mais plutôt comme une technique d'ensemble, susceptible d'amélioration pour le diagnostic courant des germes anaérobies sporulés.

CONCLUSION

1° Une technique simple, rapide et peu coûteuse d'identification de *Cl. perfringens* type A par immunoprécipitation sur lame, est proposée comme méthode de routine, en particulier pour la mise en évidence du germe dans les prélèvements souillés et polymicrobiens.

2° L'antigène de choix correspond à une suspension de *Cl. perfringens* soumise aux ultra-sons et peut utiliser les cultures polymicrobiennes.

3° Le sérum de choix correspond, entre autres préparations, au sérum monovalent de type A commercialisé par l'Institut Pasteur.

4° Sous réserve d'approfondir les constituants antigéniques de l'ultrasonnat et d'étendre la technique comparative aux autres clostridies majeures pathogènes pour les animaux, cette méthode paraît digne d'intérêt dans le diagnostic de routine des toxoinfections clostridiennes animales et des pollutions des denrées alimentaires.

(Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires. Service de Bactériologie.)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KATITCH (R. V.), GADNSKI (G.), DIMITIJEVITCH et VOUKITCHEVITCH. — *Rev. Immunologie Paris*, t. 30, n° 6, 1966, p. 341 à 346.
2. KATITCH (R. V.) et coll. — *Rev. Imm. Paris*, t. 31, 1967, n° 1-2, p. 89 à 97.
3. MEISSEL (H.). — *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1963, 59 (9-10), 1425-1440.
4. SHAPTON et BOARD. — *Isolation of Anaerobes*. Academic Press London/N. Y. 1971.
5. SIDOROV (M. A.). — *Trudy Vsesoyuz Inst. eksp. Vet. Moscou*, 1962, 29, 49-63.
6. SORDELLI et FERRARI. — *C. R. Soc. Biol. Paris*, 1931, 106-141.
7. TARDIEUX and NISMAN. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 82, 458-463.
8. WEIR (D. M.). — *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Public Oxford and Edinburg, section 1, p. 5.
9. ZWISLER (O.), PRANTER (W.). — *Behringwerk, Mitteilungen*, 1966, p. 79 à 85.