

Diagnostic bactériologique rapide de *Bacteridium anthracis* par immunofluorescence

par C. MICHEL (*), A. POUSSOT (*), C. CHABASSOL (*),
D. FOATA (*) et P. POULET (**)

Collaboration technique : M^{me} M. A. GENIN

Le diagnostic bactériologique de *Bacteridium anthracis* est classiquement conduit à l'aide de critères morphologiques, biochimiques, antigéniques et de pathogénicité.

Considérant surtout les caractères antigéniques, l'un de nous (13) a résumé les connaissances actuelles des rapports entre *Bacteridium anthracis* et *Bacillus cereus* ainsi que leurs applications à leur diagnostic différentiel. Récemment, nous avons rapporté ici même (12) l'intérêt de l'immunodiffusion, selon OUCHTERLONY, pour ce diagnostic.

Dans la présente note, nous nous proposons de souligner l'avantage de la réaction d'immunofluorescence en vue de l'identification bactérioscopique de la maladie charbonneuse.

LEVINA, 1958 (10) d'une part, CARTER et LEISE, 1958 (3) d'autre part, semblent avoir, les premiers, appliqué la technique d'immunofluorescence à l'identification de *Bacteridium anthracis*. CHERRY et FREEMAN, 1959 (5) décrivent avec plus de détails la préparation et l'utilisation des immunoglobulines fluorescentes préparées sur lapin, à partir de souches capsulées de bactérie charbonneuse. Déjà, ces auteurs notent que la spécificité des immunosérums n'est pas absolue et qu'il existe, notamment, une parenté antigénique avec *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus subtilis*, mais ajoutent-ils, « quand elle est judicieusement appliquée au matériel approprié » (a), l'immunoglobuline anticharbonneuse donne des

(*) Vétérinaires-Biologistes des Armées, 75998 Paris-Armées.

(**) Chaire des Maladies Contagieuses, Zoonoses et Législation Sanitaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (Pr P. GORET), 94701 Maisons-Alfort.

Tirés à part : C. MICHEL 16, avenue Lyautey 91710 Vert-le-Petit.

(a) « But when judiciously applied to appropriate material ».

résultats satisfaisants ; l'absorption par *Bacillus cereus* et *Bacillus megaterium* améliore la spécificité sans toutefois supprimer complètement les réactions croisées. Plusieurs auteurs, BIEGELEISEN, 1964 (2), BIEGELEISEN et coll., 1962 (1), FRANEK, 1964 (8), CHAJKOWSKI et MATRAS, 1966 (4), FETEANU, 1967 (7), KUZ'MIN, 1968 (9) TOMOV et coll., 1970 (15), confirment l'intérêt de l'immunofluorescence appliquée au diagnostic rapide de *Bacteridium anthracis* sur des prélèvements les plus divers : fourrages, aliments concentrés du bétail, peaux, poils, viandes séchées, frottis et coupes de tissus... FETEANU, en particulier, précise que, si l'immunofluorescence permet de différencier les formes végétatives, il n'est pas possible, par contre, de faire la distinction entre les spores.

Une analyse systématique d'ordre biochimique faite par LEVINA et KATZ 1966 (11) démontre que les communautés antigéniques entre *Bacteridium anthracis* et *Bacillus cereus* s'expliquent par la présence de mucopeptides et de lipoprotéines communs. De plus, LEVINA et KATZ observent que les différences antigéniques sont maximum pendant la phase de croissance logarithmique et que la souche de *Bacteridium anthracis* renferme plus de composants antigéniques que celle de *Bacillus cereus*.

Dans le cadre plus particulier du diagnostic du charbon en pathologie humaine, WATTRE et BEERENS, 1967 (16) utilisent la réaction d'immunofluorescence indirecte à l'aide de sérums de convalescents de maladie charbonneuse. Bien que ces auteurs observent des réactions croisées avec *Bacillus cereus* et *Bacillus megaterium*, ils concluent que les taux obtenus sont toujours inférieurs avec les antigènes hétérologues et que cette interférence ne peut, en pathologie de l'homme, nuire au diagnostic.

Compte tenu de ces données et de l'expérimentation que nous rapportons ci-dessous, nous pensons que l'immunofluorescence, comme test de diagnostic rapide du charbon bactérien, peut avantageusement compléter les techniques rapportées par SHLYAKHOV et JOUBERT, 1970 (14) : test de l'encapsulation, phagoïdentification et sensibilité à la pénicilline.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) SOUCHES BACTÉRIENNES.

- Bacteridium anthracis* pathogène pour le cobaye et le lapin.
- Bacillus cereus* A 30.
- Bacillus subtilis*.
- Bacillus megaterium*.

2) IMMUNOSÉRUMS ANTIANTHRACIS.

Ils sont obtenus chez le lapin par hyperimmunisation en deux temps : l'immunisation de base est réalisée par voie sous-cutanée avec une souche charbonneuse vaccinale ; l'hyperimmunisation est poursuivie à l'aide de la souche virulente par la voie veineuse.

Un immunosérum anticharbonneux thérapeutique commercial, préparé sur cheval est également utilisé.

3) ÉPUISEMENT DES IMMUNOSÉRUMS ANTIANTHRACIS.

L'épuisement des immunosérums de lapin et de cheval est effectué selon la méthode classique par contact et agitation 30 mn à 37 °C puis 18 h à + 4 °C en présence de souches hétérologues de *Bacillus cereus*, *megaterium* et *subtilis*.

4) CONJUGAISON DES IMMUNOSÉRUMS ANTIANTHRACIS.

Pour la réaction d'immunofluorescence directe, le couplage à l'isothiocyanate de fluoresceine (ITCF) est réalisée selon la technique de COONS modifiée par FAURE (6).

— Précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et élimination du sulfate d'ammonium par dialyse à + 4 °C pendant 48 h.

— Dosage des globulines par spectrophotométrie à 280 nm par rapport à une solution étalon de globulines.

— Conjugaison du fluorochrome (ITCF) aux globulines dans le rapport pondéral de 1/40 soit 25 µg d'ITCF pour 1 mg de protéine.

— Séparation de la protéine conjuguée par passage sur colonne de Séphadex G. 50.

— Concentration du conjugué vis-à-vis d'une solution de Carbowax à 20 p. 100 en eau physiologique tamponnée à pH 7,6. L'immunosérum conjugué est additionné de 50 p. 100 de glycérine tamponnée et conservé à + 4 °C.

5) IMMUNOSÉRUMS ANTIGLOBULINES D'ESPÈCE.

Pour la réaction d'immunofluorescence indirecte, on utilise les immunosérums marqués antiglobulines de cheval préparés sur le lapin et les immunosérums marqués antiglobulines de lapin préparés sur mouton par l'Institut Pasteur de Paris, à la dilution préconisée soit 1/100^e.

6) APPAREILLAGE OPTIQUE.

Les observations sont faites avec un microscope LEITZ-ORTHOPLAN dont les caractéristiques optiques sont les suivantes :

Source de rayonnement ultraviolet par lampe HBO 200 ; filtre anticalorique BG 38 ; filtre d'excitation BG 12 et filtre d'arrêt K 490. Les examens sont pratiqués en fond noir, en éclairage transmis, avec les combinaisons oculaires x 10 et objectif X 40 à sec ou X 100 à immersion.

7) MODALITÉS DES RÉACTIONS D'IMMUNOFLOUORESCENCE.

7.1 *Méthode directe.*

Sur la même lame porte-objet, on trace au diamant, deux circonférences de 1 cm² environ de surface et on confectionne sur chacun des cercles délimités un frottis, l'un avec *Bacteridium anthracis*, l'autre avec *Bacillus cereus* à partir de colonies de 18 à 24 h à 37 °C sur gélose ordinaire. Des frottis témoins sont effectués avec *Bac. megaterium* et *Bac. subtilis* dans les mêmes conditions. Les frottis sont séchés et fixés à l'alcool.

On recouvre les frottis avec 2 à 3 gouttes d'immunosérum anti-charbonneux fluorescent, à la dilution choisie, on laisse 20 mn à la température de 20 °C. On lave à l'eau physiologique tamponnée à pH 7,6 et on élimine le colorant en excès par bains et rinçages successifs. On monte sous lamelles par l'intermédiaire d'une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,6.

7.2 *Méthode indirecte.*

Le premier temps de la coloration est identique à la méthode directe en utilisant un immunosérum spécifique anticharbonneux non marqué. On rince comme précédemment puis, dans un deuxième temps, on place sur le frottis encore humide, une goutte de sérum fluorescent antiglobulines de lapin ou de cheval selon l'origine de l'immunosérum anticharbonneux, à la dilution préconisée par le laboratoire producteur soit une dilution au 1/100^e. On laisse agir 20 mn, puis on rince et on monte sous lamelle comme dans la méthode directe.

7.3 *Témoins.*

Des sérums de lapin et de cheval, normaux, conjugués, sont utilisés comme témoins négatifs dans la méthode directe.

Pour la méthode indirecte, des sérums normaux de lapin ou de cheval sont utilisés dans le premier temps de réaction.

Il faut également noter que l'utilisation simultanée des différents antigènes : *B. cereus*, *B. megaterium* et *B. subtilis* constitue en elle-même un ensemble de témoins supplémentaires.

8) APPRÉCIATION DES RÉSULTATS.

L'intensité de la fluorescence est appréciée en nombre de croix :

- +++ : brillance extrême du contour cellulaire, centre noir.
Contraste parfait,
- ++ : brillance nette mais contraste moins net avec le corps bactérien,
- +
- ± et — : bactérie à peine visible ou non visible.

RÉSULTATS

1) DIAGNOSTIC DE *BACTERIDIUM ANTHRACIS* PAR IMMUNOFLOUORESCENCE DIRECTE.

1.1 Avec des immunoglobulines antianthraxis non épuisées (tableau n° 1, col. 1).

Les essais de couplage des globulines d'origine équine s'étant montrés inconstants, nous ne rapportons ici que les résultats obtenus avec les immunoglobulines antianthraxis préparées chez le lapin :

L'immunoglobuline spécifique marquée donne une immunofluorescence spécifique à +++ avec la souche homologue de *B. anthracis* par rapport à la souche de *B. cereus* notée ± ou +, à condition d'utiliser les dilutions optimales. Les sérums utilisés purs ou dilués au 1/5^e ne sont pas spécifiques. Selon les lots, les dilutions maximales efficaces varient entre le 1/10^e et le 1/25^e ou entre le 1/50^e et le 1/100^e ; on observe donc une limite étroite de spécificité (zone blanche sur le tableau) avec les immunoglobulines non épuisées.

1.2 Avec des immunoglobulines antianthraxis épuisées (tableau n° 1, col. 2).

L'immunosérum épuisé antianthraxis possède une spécificité à +++ entre les dilutions du 1/5^e et du 1/100^e alors qu'aux mêmes dilutions *B. cereus* ne présente pratiquement aucune fluorescence.

TABLEAU N° 1
Immuno fluorescence directe

		<i>Immunoglobulines antianthraxis de lapin</i>													
		1 avant épuisement				2 après épuisement									
Dilution des Ig	Pur	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	Pur	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	Dilution des Ig
		Lot 1				Lot 2									
<i>B. anthracis</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>B. anthracis</i>
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+	±	±	±	±	+++	±	±	±	±	±	±	<i>B. cereus</i>
<i>B. anthracis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±	±	±	±	±	±	±	<i>B. megaterium</i>
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	±	±	±	±	±	±	-	-	-	-	<i>B. subtilis</i>

**Légende des microphotographies
en immunofluorescence indirecte obtenues
avec un immunosérum anticharbonneux de lapin**

Exemple de coloration non spécifique à la dilution 1/10 :

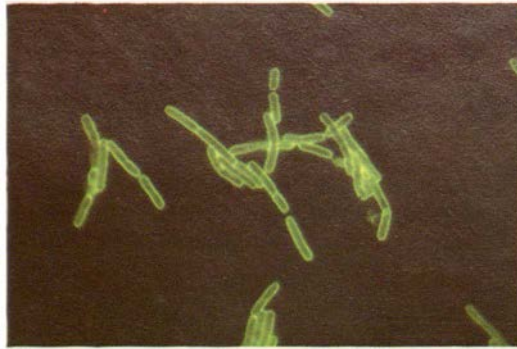
- 1 *Bacteridium anthracis* et Immunosérum anticharbonneux dilué à 1/10.
- 2 *Bacillus cereus* et Immunosérum anticharbonneux dilué à 1/10.

Exemple de coloration spécifique à la dilution 1/50 :

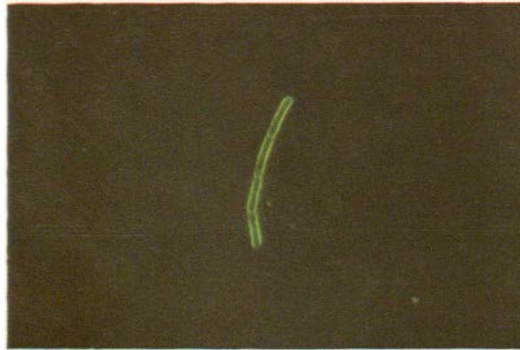
- 3 *Bacteridium anthracis* et Immunosérum anticharbonneux dilué à 1/50.
- 4 *Bacillus cereus* et Immunosérum anticharbonneux dilué à 1/50.
Noter toutefois la fluorescence des spores de *B. cereus*.

Exemple de coloration spécifique à la dilution 1/2000 :

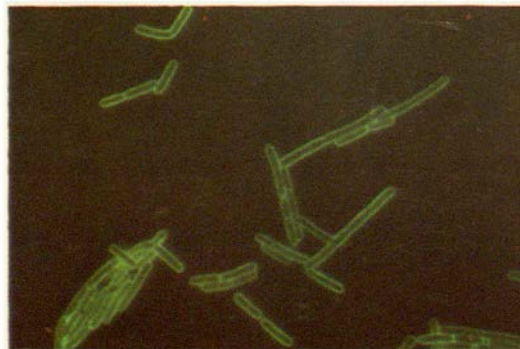
- 5 *Bacteridium anthracis* et Immunosérum anticharbonneux dilué à 1/2000.
- 6 *Bacillus cereus* et Immunosérum anticharbonneux dilué à 1/2000.
Noter l'atténuation de la fluorescence des spores de *B. cereus* par rapport à la photo n° 4.



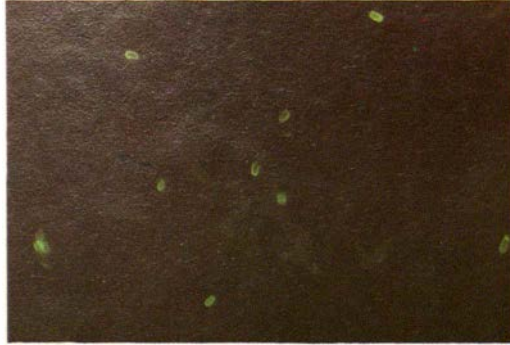
Bacteridium anthracis.
Immunosérum anticharbonneux (ISC)
pur ou dilué de 1/2 à 1/1000.



Bacillus cereus.
Immunosérum anticharbonneux (ISC)
pur ou dilué de 1/2 à 1/1000.



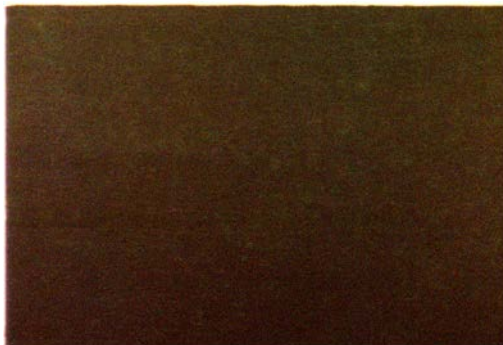
Bacteridium anthracis. Dilution de l'ISC à 1/50.



Bacillus cereus. Dilution de l'ISC à 1/50
(fluorescence localisée seulement aux spores).



Bacteridium anthracis. Dilution de l'ISC à 1/2000.



Bacillus cereus. Dilution de l'ISC à 1/2000.

Les témoins effectués avec *B. megaterium* et *B. subtilis* sont dénués de toute fluorescence (— ou \pm).

L'épuisement des immunoglobulines permet donc d'obtenir une réaction spécifique dans une gamme beaucoup plus étendue de dilutions (zone blanche sur le tableau).

2) DIAGNOSTIC DE *BACTERIDIUM ANTHRACIS* PAR IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE.

2.1 Avec des immunoglobulines non épuisées (tableau n° 2, col. 1).

L'immunoglobuline de lapin est utilisable comme dans la technique directe, à partir d'une dilution efficace assez élevée, variable selon les lots, le plus souvent dans les limites du 1/100^e, 1/250^e, 1/500^e, 1/1.000^e. Certains lots montrent une activité spécifique au 1/4.000^e.

L'immunoglobuline de cheval permet également un diagnostic spécifique aux dilutions des 1/500^e au 1/1.000^e.

2.2 Avec des immunoglobulines antianthraxis épuisées (tableau n° 2, col. 2).

L'épuisement des immunoglobulines de lapin et de cheval autorise des réactions spécifiques dans des limites de dilutions plus larges, dès la dilution du 1/10^e jusqu'à la dilution du 1/500^e ou du 1/1.000^e.

Par comparaison avec la méthode directe, l'immunofluorescence indirecte permet une sensibilité accrue de la technique. Là aussi, l'épuisement des immunoglobulines autorise une gamme beaucoup plus grande de dilutions spécifiques. Avec les souches de *B. megaterium* et *B. subtilis* en notre possession, nous n'avons jamais observé de réactions croisées après épuisement des immunosérums anti-charbonneux.

Par contre la technique d'épuisement utilisée ne permet pas le diagnostic différentiel entre les spores de *B. anthracis* et *B. cereus* lesquelles apparaissent aussi fluorescentes que celles de la bactérie charbonneuse.

CONCLUSION

L'existence de réactions croisées entre *Bacteridium anthracis* et *Bacillus cereus* se révèle en immunofluorescence comme elle se manifeste par immunodiffusion.

Toutefois, les réactions d'immunofluorescence, directe ou indirecte, permettent une identification rapide de la forme végétative de *B. anthracis* à condition d'utiliser des immunosérums dont on a

TABLEAU N° 2
Immuno fluorescence indirecte

		1) Immunoglobulines antianthraxis de lapin								2										
		1				2				1				2						
		avant épuisement								après épuisement										
Dilu- tions des IG		Pur	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1.000}$	Pur	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1.000}$	Dilu- tions des IG		
Lot 3																				
<i>B. an- thraxis</i>		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>B. an- thraxis</i>	
<i>B. cereus</i>		+++	+++	+++	+++	±	±	±	±	+++	+++	±	±	±	±	±	±	+++	<i>B. cereus</i>	
Lot 4																				
<i>B. an- thraxis</i>		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>B. an- thraxis</i>	
<i>B. cereus</i>		+++	+++	+++	+++	±	±	±	±	+++	+++	+	±	±	±	±	±	+++	<i>B. cereus</i>	

		2) Immunoglobulines antianthraxis de cheval								2										
		1				2				1				2						
		avant épuisement								après épuisement										
Dilu- tions des IG		Pur	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1.000}$	Pur	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1.000}$	Dilu- tions des IG		
Lot 5																				
<i>B. an- thraxis</i>		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>B. an- thraxis</i>	
<i>B. cereus</i>		+++	+++	+++	+++	+++	±	±	±	+++	+++	+++	±	±	±	±	±	+++	<i>B. cereus</i>	
Lot 6																				
<i>B. an- thraxis</i>		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	<i>B. an- thraxis</i>	
<i>B. cereus</i>		+++	+++	+++	+++	+++	±	±	±	+++	+++	+++	±	±	±	±	±	+++	<i>B. cereus</i>	

précisé les dilutions maximales efficaces. L'épuisement préalable des immunosérums permet d'étendre la gamme de la spécificité de la réaction vers les dilutions les plus faibles.

Dans ces conditions, l'immunofluorescence permet le diagnostic différentiel de *B. anthracis* dans d'excellentes conditions et mérite de prendre place au laboratoire parmi les méthodes de diagnostic rapide.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BIEGELEISEN (J. Z.), CHERRY (W. B.), SKALY (P.) et MOODY (M. D.). — The demonstration of *B. anthracis* in environmental specimens by conventional and fluorescent antibody techniques. *Am. J. Hyg.*, 1962, **75**, 230-239.
- (2) BIEGELEISEN (J. Z.). — Immunofluorescent staining of *B. anthracis* in dried beef. *J. Bact.*, 1964, **88**, 260-261.
- (3) CARTER (C. H.) et LEISE (J. M.). — Specific staining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin. *J. Bact.*, 1958, **76**, 152-154.
- (4) CHAJKOWSKI (M.) et MATRAS (J.). — Utilisation des anticorps fluorescents dans la recherche de l'infection par le bacille du charbon. *Med. Weter. Polska*, 1966, **22**, 581-584.
- (5) CHERRY (W. B.) et FREEMAN (E. M.). — Staining bacterial smears with fluorescent antibody. V. : The rapid identification of *B. anthracis* in culture and in human and murine tissues. *Zent. Bakteriol. Parasitenkr.*, 1959, **175**, 582-604.
- (6) FAURE (M.) et DUPOUEY (P.). — Cours sur les techniques de l'immunofluorescence appliquées aux problèmes d'intérêt vétérinaire. Institut Pasteur, Paris, 1969.
- (7) FETEANU (A.). — L'identification et la différenciation de *B. anthracis* dans les cultures et les tissus des autres germes du genre *Bacillus* à l'aide des anticorps fluorescents. *Arch. Vétérin. Roumaine*, 1967, **2**, 43-60.
- (8) FRANEK (J.). — Application of fluorescent antibodies for demonstrating *B. anthracis* in the organs of infected animals. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, Prague, 1964, **8**, 111-119.
- (9) KUZ'MIN (N.). — Mise en évidence de bactéries charbonneuses à l'aide d'anticorps fluorescents. *Veterinariya*, SSSR, 1968, **44**, 111-114.
- (10) LEVINA (E. N.). — Fluorescein labeled antibody for the detection of the anthrax bacillus. *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, URSS, 1958, **29**, 6-11.
- (11) LEVINA (E. N.) et KATZ (L. N.). — Etude des antigènes de *B. anthracis* et de *B. cereus* à l'aide des méthodes de recherches utilisant l'immunofluorescence et la cytochimie. *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, URSS, 1966, **44**, 98-103.
- (12) MICHEL (C.), BROUILLAUD (J.) et POULET (P.). — Etude par immunodiffusion des rapports antigéniques entre *B. anthracis* et *B. cereus*. Application à leur diagnostic différentiel. *Bull. Acad. Vet.*, 1972, **45**, 391-399.

-
- (13) POULET (P.). — Etude comparée de *Bacteridium anthracis* et *Bacillus cereus*. Rapports antigéniques et application au diagnostic différentiel. Thèse doctorat vétérinaire, Alfort-Créteil, 1972.
- (14) SHLYAKHOV (E. N.) et JOUBERT (L.). — Diagnostic bactériologique rapide et diagnostic allergologique précoce et rétrospectif du charbon bactérien. *Bull. Acad. Vét.*, 1970, **43**, 99-112.
- (15) ТОМОВ (A.), КОНЧЕВ (D.), ЦВЕТКОВА (E.) et МАРЧЕВ (N.). — Etude pour la préparation de sérums utilisables pour la coloration par immunofluorescence de la capsule de *B. anthracis*. *Epidemiol. Mikrobiol. Infekc. Bolesti*, Bâly, 1970, **7**, 251-254.
- (16) WATTRE (P.) et BEERENS (H.). — Intérêt de la réaction d'immunofluorescence dans le diagnostic sérologique des infections humaines à *B. anthracis*. *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, 1967, **18**, 133-142.
-