

Sur un Vaccin antistaphylococcique combiné : Anatoxines α et β et Vaccin microbien polyvalent

par J. PILLET, M^{me} B. ORTA, S. ISBIR et P. MERCIER

(Communication présentée par M. LEMÉTAYER)

Les staphylocoques pathogènes isolés sur l'animal présentant un certain nombre de caractères spécifiques, il nous a semblé utile de tenter d'immuniser l'animal contre le plus grand nombre possible d'antigènes élaborés par ces souches. C'est pourquoi nous avons réalisé un vaccin contenant, d'une part, les deux anatoxines α et β , la toxine β étant caractéristique des souches d'origine animale, et d'autre part, des corps microbiens contenant à la fois, des staphylocoques appartenant aux trois groupes sérologiques actuellement bien identifiés, et des staphylocoques isolés sur l'animal. Nous avons montré dans une note précédente (1) que l'on pouvait obtenir par différents moyens une toxine β isolée, mais que très généralement, les staphylocoques pathogènes rencontrés au niveau des lésions chez l'animal élaboraient simultanément les deux toxines α et β . Étant donné le but poursuivi, il ne nous a pas paru utile de chercher à obtenir, à un stade quelconque de la préparation du vaccin, une toxine ou une anatoxine β isolée et nous avons étudié directement la transformation en anatoxines du mélange de toxine $\alpha + \beta$.

OBTENTION D'UN MÉLANGE D'ANATOXINE α ET β

Une série d'essais effectués en ajoutant des quantités variables de formol à la toxine mixte $\alpha \beta$ et en maintenant celle-ci pendant des durées progressivement croissantes à l'étuve à 40°, nous a permis de constater qu'il fallait lui ajouter 6 p. 1.000 de formol et la garder pendant au moins dix jours à l'étuve pour obtenir une transformation totale de la toxine β . Le test de la transformation étant la disparition de l'action hémolytique sur les globules de mouton. Bien entendu, après ce traitement, le contrôle hémolytique en α est négatif (cf. note précédente).

Il aurait été logique à ce stade de titrer systématiquement le pouvoir de combinaison du mélange tant en anatoxine α qu'en anatoxine β , mais les titrages que nous avons effectués sur un certain nombre d'anatoxines brutes nous ayant montré qu'on enregistrait après action combinée de la chaleur et du formol à la

dose de 6 p. 100, une baisse importante du pouvoir de combinaison (de l'ordre de 40 p. 100) nous nous sommes alors immédiatement préoccupés de concentrer ces anatoxines afin d'obtenir un titre en anatoxine α et β analogue à celui de l'anatoxine α couramment utilisé (10 unités/cc.).

Nous avons employé dans ce but la même technique que pour l'anatoxine α (2), c'est-à-dire précipitation par l'acide trichloracétique à pH 3,5 puis reprise du précipité par un tampon phosphaté dans un volume 5 à 10 fois inférieur au volume initial.

Quelquefois après concentration il réapparaît une trace d'hémolyse au contrôle hémolytique β (globules de mouton); un chauffage léger (50° pendant 30 minutes) fait disparaître la trace de toxine résiduelle sans toucher à l'anatoxine plus stable. L'anatoxine mixte obtenue de cette façon, injectée au lapin à la dose de 1 cc. en intra-dermique et 4 cc. en sous-cutanée ne doit donner lieu à aucun accident local ou général.

DOSAGE DES ANATOXINES α ET β

Le dosage de l'anatoxine α est pratiqué selon la technique habituelle. Le dosage de l'anatoxine β est identique, compte tenu de la nature des globules et du séjour supplémentaire à la glacière. L'anatoxine étant répartie à doses décroissantes de 1 à 0,05 cc., le sérum est ajouté à la dose de 2 unités au cc. Après séjour d'une demi-heure à l'étuve on ajoute la dose combinée hémolytique. On porte ensuite les tubes à l'étuve (1 heure), puis à la glacière (18 heures) et on effectue la lecture.

Nous avons ainsi obtenu des anatoxines concentrées mixtes titrant 5 à 10 unités en α et 15 à 30 unités en β .

Influence de l'anatoxine α sur le dosage de l'anatoxine β .

Nous avons vu précédemment que la toxine α semble sensibiliser les globules de mouton à l'action de la toxine β , entraînant ainsi des difficultés dans le titrage de cette dernière toxine.

L'anatoxine α présente dans l'anatoxine mixte α β influence-t-elle aussi les résultats du titrage de l'anatoxine β ?

On ne peut répondre à cette question en flocculant l'anatoxine α car celle-ci floccule mal après précipitation par l'acide trichloracétique. On se trouve donc dans l'obligation d'effectuer un premier titrage de l'anatoxine α , titrage qui permettra de la neutraliser exactement par le sérum anti α . On dosera ensuite l'anatoxine β à l'aide de globules de mouton et en présence du sérum anti β selon la technique décrite plus haut.

Cette méthode qui présente l'inconvénient d'obliger à effectuer un titrage par la méthode hémolytique dans un milieu contenant deux sérums différents nous a donné les résultats suivants :

Titrage direct de l'anatoxine mixte $\alpha \beta$: 30 unités.

Titrage après neutralisation de l'anatoxine α : 10 unités.

On retrouve donc ici avec les anatoxines ce que l'on avait mis en évidence avec les toxines, c'est-à-dire une diminution notable du titre β après neutralisation de l'anatoxine α . Or, une anatoxine α isolée d'un titre identique à celle présente dans le mélange, titrée avec le sérum anti β et les globules de mouton, c'est-à-dire dans les conditions identiques à celles du titrage précédent, donne un titre inférieur à une unité. Ce résultat ne permet donc pas d'imputer à l'action directe de l'anatoxine α la différence enregistrée entre les deux titrages, avant et après neutralisation et de nouvelles recherches semblent nécessaires pour expliquer ce phénomène.

Après concentration le titre en anatoxine α est souvent inférieur à 10 unités et l'on ajoutera alors en quantité convenable une anatoxine α purifiée de façon à obtenir un mélange dont le titre final soit de 10 unités α et 10 unités β au cc.

VACCIN MICROBIEN

Le vaccin microbien est constitué à partir de 6 souches qui sont les souches I, II, III de COWAN (3) et 3 souches pathogènes isolées sur l'animal. Nous avons ainsi pensé en utilisant les résultats d'un travail antérieur (4), augmenter au maximum le nombre d'antigènes microbiens présents dans le vaccin. En effet, nous avons montré précédemment que 77 p. 1000 des souches d'origine animale que nous avons essayé de classer sérologiquement étaient inagglutinables dans les conditions habituelles, ce qui implique une différence qualitative ou au moins quantitative dans la structure antigénique des staphylocoques selon leur origine, humaine ou animale. Ces résultats justifient l'introduction dans le vaccin, d'une part, de souches isolées sur l'animal et non agglutinables par les sérums I, II, III et, d'autre part, des souches I, II, III puisque 23 p. 100 de ces staphylocoques peuvent cependant être classés sérologiquement.

Les germes lavés, puis tués par la chaleur sont ajoutés aux anatoxines de telle façon que la concentration finale soit de 6 milliards de germes au cc.

A ce stade, les contrôles de stérilité *in vitro* et *in vivo* courants

seront effectués, de même qu'un nouveau contrôle sur le lapin, réalisé selon la technique indiquée ci-dessus.

Le vaccin combiné ainsi constitué, comprendra la majeure partie des antigènes staphylococciques actuellement connus et devrait permettre, lorsque la posologie en sera bien réglée, l'augmentation des défenses spécifiques de l'organisme animal contre l'infection staphylococcique.

Il reste toutefois évident que seule l'expérimentation *in vivo*, actuellement à son début, pourra permettre de juger de l'efficacité de ce vaccin combiné.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) PILLET (J.), MME ORTA (B.), ISHIR (S.), MERCIER (P.). — *Acad. Vét.*, séance du 6 juillet 1950.
- (2) BOVIN (A.), IZARD (Y.). — *C.R.S., Bicl.*, 1937, **124**, 23.
- (3) COWAN (S.-T.). — *J. Path. a. Bact.*, 1939, **48**, 169.
- (4) PILLET (J.), ISHIR (S.), MERCIER (P.). — *Ann. Inst. Pasteur* 1930, **78**, 638.

Discussion

M. LESNOUVRIÈS. — Il est de fait que nous sommes souvent désarmés contre nombre de manifestations staphylococciques, contre les mammites en particulier où pénicilline, vaccins, anatoxine échouent presque toujours. Il est à souhaiter que le nouveau vaccin proposé aujourd'hui s'avère plus efficace puisqu'il est plus complet en antigènes anatoxiques et qu'il comporte des germes sélectionnés dont certains sont isolés chez l'animal atteint de mammite.
