

IMMUNISATION ANTISTAPHYLOCOCCIQUE DE LA BREBIS PAR ANATOXINES ET ADJUVANTS

II. — ADJUVANTS HUILEUX (1)

M. PLOMMET et G. BÉZARD

*Station de Pathologie de la Reproduction,
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,
B. P. 1. Nouzilly, 37380 Monnaie*

RÉSUMÉ

Deux vaccins constitués d'un mélange des anatoxines staphylococciques α et β , et de l'un ou l'autre de deux adjuvants huileux, ont été injectés à des brebis pour comparer la réponse en antitoxines α et β , selon 4 protocoles :

- 1° Une seule injection équivalant à 100 unités d'anatoxine α et 30-50 unités β ;
- 2° Deux injections identiques à 45 jours d'intervalle ;
- 3° et 4° Une ou deux injections comme 1 et 2, sur brebis vaccinées l'année précédente.

Les études antérieures ayant montré qu'un titre de 10 unités d'antitoxine est nécessaire pour une bonne protection, il faut pour protéger les brebis pendant la période de prédisposition aux mammites (soit 3-4 mois après agnelage) deux injections, la 1^{re} année (protocole 2), 1 seule les années ultérieures (protocole 3).

Deux expériences utilisant le vaccin en pratique ont été réalisées dans deux troupeaux de brebis laitières. Les examens bactériologiques des cas de mammite n'ayant pas été faits systématiquement, les résultats sont exprimés globalement en « Mammites », telles qu'elles sont observées par le trayeur, quel que soit le germe en cause.

Dans le 1^{er} troupeau, 178 brebis sur 331 ont été vaccinées selon le protocole 2. Des mammites ont affecté 5,6 p. 100 des vaccinées et 11,7 p. 100 des témoins.

Dans le 2^e troupeau, 286 brebis ont reçu 3 injections d'un vaccin avec un adjuvant alumine ; 291 ont été vaccinées selon les protocoles 1 et 3 ; 330, selon les protocoles 2 et 4. Pendant la période d'allaitement, aucune différence significative entre les lots n'a été observée. Pendant la période de traite, la différence est hautement significative entre le vaccin alumine (5,1 p. 100) et le vaccin huileux (1,8 p. 100).

(1) Travail financé en partie sur contrat par le Laboratoire Roger Bellon, 159, avenue du Roule, 92 - Neuilly sur Seine.

INTRODUCTION

Bien que la vaccination de la brebis par les anatoxines staphylococciques ne réduise pas le nombre des infections provoquées expérimentalement, elle en diminue la gravité d'une manière inversement proportionnelle au titre des antitoxines α et β (LE GALL et PLOMMET, 1965). L'usage d'un tel vaccin conduit de ce fait à une diminution du nombre de cas de mammites observées par le berger, lesquelles ne représentent qu'une partie des infections existantes, et revêt un intérêt évident aux yeux des éleveurs de brebis laitières.

Pour présenter un intérêt réel pour les éleveurs, un vaccin doit être non seulement efficace mais encore économique, en particulier en n'exigeant au maximum que deux interventions par animal.

L'activité peut être reconnue par deux types d'essais :

1° Dans les conditions naturelles : relevé des cas de Mammites sur des groupes d'animaux vaccinés et témoins ;

2° Dans les conditions expérimentales : étude de la réponse sérologique à la vaccination. On peut, en effet, considérer comme efficace un vaccin donnant des titres antitoxine α et antitoxine β de 10 unités par ml au moins (LE GALL et PLOMMET, 1965) pendant toute la période de prédisposition aux mammites staphylococciques, qui s'étend chez la brebis laitière sur les 5 mois suivant la mise bas, avec une phase maximale dans les semaines qui suivent la mise à la traite (PLOMMET et RICORDEAU, 1960).

Les anatoxines α et β , utilisées seules ou avec des adjuvants minéraux, ne remplissent pas les conditions d'activité et de prix de revient indiquées. L'adjuvant huileux de Freund, permet d'obtenir en une, ou mieux deux injections, des titres antitoxiques élevés et persistants (GUYONNET, PLOMMET et VIDAL, 1971), mais n'est guère acceptable en pratique. Aussi avons nous étudié deux autres adjuvants huileux dans des conditions analogues. Les résultats sérologiques obtenus étant convenables, nous avons expérimenté ce vaccin sur le terrain.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — Vaccin

L'anatoxine staphylococcique commerciale (Institut Pasteur, Paris) a un titre de 10 unités d'anatoxine α et, selon les lots, de 3 à 5 unités d'anatoxine β . Cette anatoxine commerciale concentrée 5 fois par filtration sur membrane Diaflo PM 10 (Amicon Co.) est mélangée à un volume égal d'adjuvant à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax.

Quatre ml de cette suspension constituent une dose-vaccin.

Deux adjuvants huileux ont été utilisés :

- l'adjuvant A : adjuvant commercial breveté (Laboratoire Roger Bellon) ;
- l'adjuvant B : adjuvant fabriqué au laboratoire selon la formule : Arlacel A, 5 g ; Tween 20, 3,3 g ; Bayol F QSP 100 ml (Serva, Paris ; COLES *et al.*, 1968) ; stérilisation à 110°C pendant 20 mn. La suspension obtenue avec cet adjuvant reste stable pendant plusieurs mois.

2. — *Expériences au laboratoire*a) *Titrage des sérums.*

Les antitoxines α et β sont titrées d'après les techniques précédemment décrites (GUYONNET, PLOMMET et VIDAL, 1971).

b) *Protocoles de vaccination.*

Les lots sont constitués par un nombre variable de brebis de 2 ans ou de primipares ; la répartition dans chaque lot est effectuée au hasard (tabl. 1).

Les lots 1 et 2 sont constitués par des animaux n'ayant jamais été vaccinés tandis que les lots 3 et 4 comprennent des brebis ayant reçu l'année précédente une ou deux injections du même vaccin (anatoxine commerciale concentrée et adjuvant A).

TABLEAU I

Constitution des lots et protocoles de vaccination. Les brebis vaccinées l'année précédente (lots 3 et 4) ont reçu 1 ou 2 injections (elles sont issues en fait des lots 1 et 2)

Experimental groups and types of vaccination. Ewes of groups 3 and 4 were vaccinated the previous year as in groups 1 or 2

Lots Groups	Animaux Animals		Vaccination	
	Nombre total <i>Total number</i>	Vaccination l'année précédente <i>Vaccinated previous year</i>	Adjuvant <i>Oil</i>	Nombre injections <i>Number of injection</i>
1	15	Non	A	1
2	33	Non	A	2
2 bis	15	Non	B	2
3	7	Oui	A	1
4	7	Oui	A	2

Les lots 2 et 2 bis ne diffèrent que par la nature de l'adjuvant.

L'injection de la dose-vaccin se fait par voie sous-cutanée sur la face latérale du thorax, derrière l'articulation de l'épaule. Les lots 1 et 3 reçoivent une injection 15 jours avant l'agnelage (protocoles 1 et 3). Les lots 2, 2 bis et 4 (protocoles 2 et 4) reçoivent en plus une 2^e injection 45 jours plus tard.

3. — *Expériences dans les conditions naturelles*a) *Animaux.*

Deux troupeaux de brebis laitières ont été utilisés pour ces expériences.

Le troupeau 1 du domaine de la Fage de l'I. N. R. A., comprend des brebis de trois races, *Lacaune*, *Sarde* et *FSL*. Dans cette exploitation, la traite commence dès la mise-bas et aucune brebis n'a été vaccinée au cours des années antérieures.

Le troupeau 2 de la Société des Caves de Roquefort est constitué par des brebis et antenaises de race *Lacaune*. La mise à la traite est précédée d'une période d'allaitement. Depuis plusieurs années, l'ensemble de ce troupeau était soumis à la vaccination contre les mammites staphylococciques selon le protocole suivant : 5,5 ml d'un vaccin, constitué par un volume de gel de phosphate d'alumine adjuvant et de 10 volumes d'anatoxines non concentrées (Institut Pasteur) titrant 10 unités α et 3 unités β , sont injectés, par voie sous-cutanée, 5 et 2 semaines avant l'agnelage et une semaine avant la mise à la traite.

b) *Protocoles de vaccinations.*

Troupeau 1 : les animaux sont répartis au hasard en deux groupes, témoin et vacciné. La vaccination est constituée par 2 injections d'une dose-vaccin-adjuvant B, à 45 jours d'intervalle : la première injection est faite avant la mise-bas, la seconde, selon les animaux, soit pendant la période de traite, soit (surtout chez les primipares dont la période de gestation était retardée) à la fin de la gestation. Aucune brebis n'ayant été vaccinée antérieurement, le groupe vacciné peut être considéré comme traité suivant le protocole 2.

Troupeau 2 : les animaux ont été répartis en trois groupes, témoin, vaccin-adjuvant B, une injection et vaccin adjuvant B, deux injections. Les brebis ayant été vaccinées les années antérieures peuvent être considérées comme étant soumises aux protocoles 3 et 4 (rappel après un an) et les primipares, les protocoles 1 et 2 (tabl. 3). Dans ces deux groupes, la première injection est faite 15 jours avant l'agnelage ; la seconde 45 jours plus tard, soit 8 jours avant la mise à la traite. Le groupe témoin a été soumis au même protocole de vaccination que les années précédentes (vaccin-adjuvant alumine, trois injections).

c) *Enregistrement des cas de mammites.*

Les animaux sont observés à partir de l'agnelage jusqu'à la fin de la lactation. Dans le troupeau 2, la période située entre l'agnelage et la seconde injection correspond approximativement à l'allaitement ; la seconde période, à la traite. Cette distinction n'a pu être effectuée au niveau du troupeau 1 en raison du décalage des gestations.

Dans les deux troupeaux, les cas de mammites cliniques ont été observés au moment de la traite. Des prélèvements pour identifier le germe responsable ont été effectués dans la plupart des cas ; des staphylocoques étaient isolés en général, mais d'autres germes ont également été mis en évidence. Le germe en cause n'a pu être démontré dans certains prélèvements conservés trop longtemps avant l'analyse. Nous n'avons, en conséquence, effectué qu'un dépouillement global sur les cas de mammites cliniques sans tenir compte de la nature du germe, ni de la gravité de l'infection.

RÉSULTATS

I. — *Protocoles de vaccination et Immunité antitoxique : expériences au laboratoire*

L'évolution pendant 5 mois des titres des antitoxines α et β après vaccination est donnée par les moyennes par lot (moyennes géométriques) sur les figures 1, 2 et 3.

Figure 1 : sur des brebis « neuves », non vaccinées antérieurement, une seule injection de vaccin, quel que soit l'adjuvant, ne confère une immunité supérieure à 10 unités d'antitoxine α que pendant 45 jours en moyenne. Une injection de rappel faite à ce moment renforce et prolonge l'immunité pendant plusieurs mois, en particulier avec l'adjuvant B. Les différences observées pour les adjuvants A et B ne sont pas significatives entre les titres maximaux (1^{er} et 2^e mois), mais le sont pour la persistance (4 mois 1/2).

Figure 2 : une seule injection de vaccin sur des brebis vaccinées pour la 2^e année consécutive (lot 3) donne un titre moyen supérieur à 10 unités, persistant beaucoup plus longtemps que sur les brebis « neuves » (lot 1).

Figure 3 : une 2^e injection aux brebis vaccinées l'année précédente (lot 4) renforce l'immunité à peu près au même degré que pour les brebis neuves (lot 2).

Les résultats concernant l'antitoxine β sont plus irréguliers ; ceci est peut-être dû à l'insuffisance du titre de l'anatoxine (et aux variations selon les lots). Nos essais antérieurs avaient en effet montré que, avec un titre convenable d'anatoxine β (par exemple 7 à 10 unités), on obtenait des réponses antitoxiques plus élevées ou équivalentes à celles de l'anatoxine α .

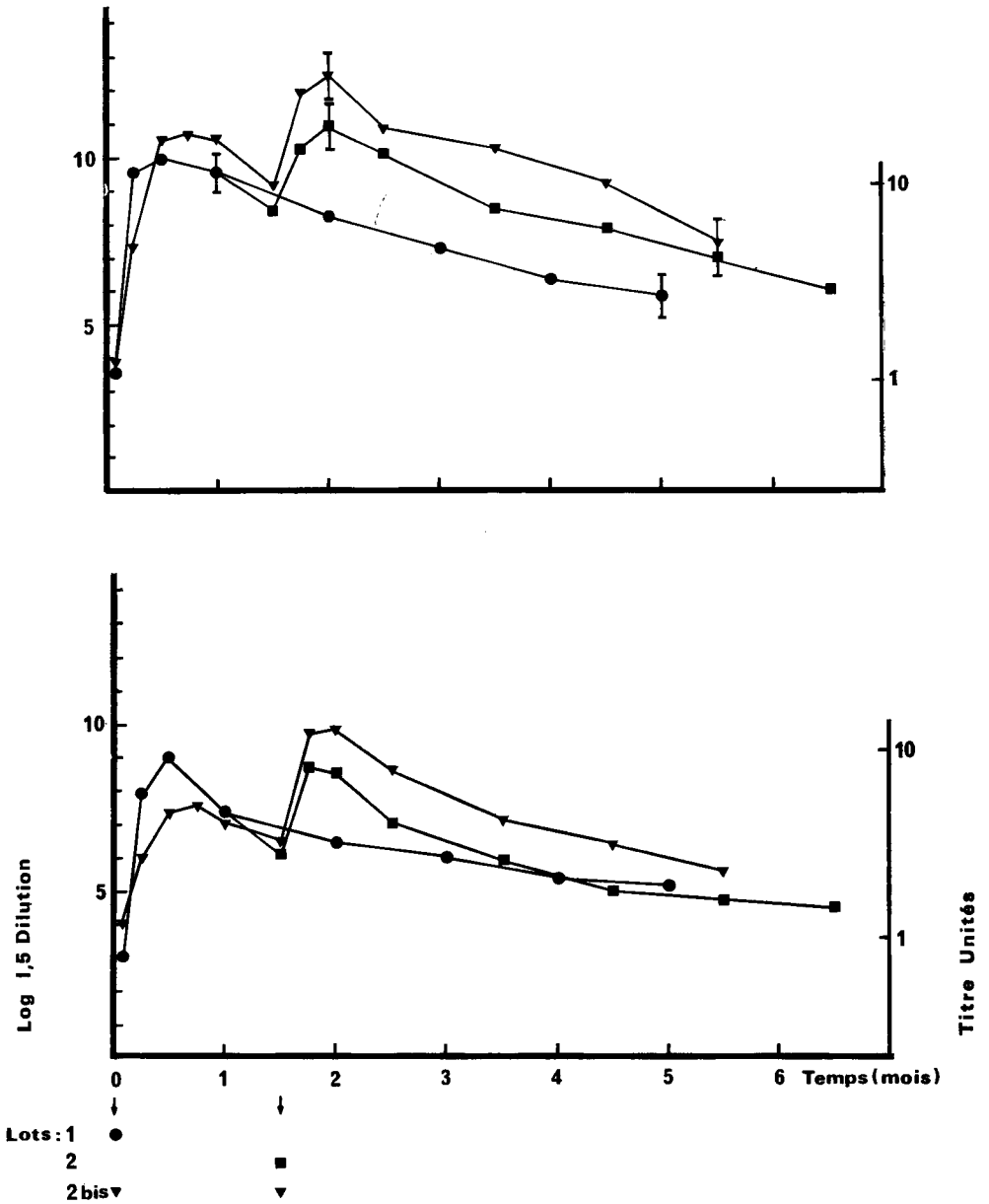


FIG. 1. — Évolution des titres des antitoxines α et β après vaccination sur les brebis des lots 1, 2 et 2 bis. Les dates de vaccination sont indiquées par une flèche. Les titres sont donnés par la moyenne et erreur type des logarithmes de base 1,5 des inverses des dilutions ; l'équivalence en unités est indiquée. Les moyennes des lots 1 et 2 sont groupées dans la période antérieure à la 2^e vaccination du lot 2.

Titers of α and β antitoxins after the vaccination in ewes of groups 1, 2 and 2 bis. The arrow indicates time of vaccination. Titers, means per group, and standard deviation of the mean, are given by log 1,5 of reciprocal of dilutions. Transformation in standard units is indicated. Means in groups 1 and 2 before the second vaccination are combined.

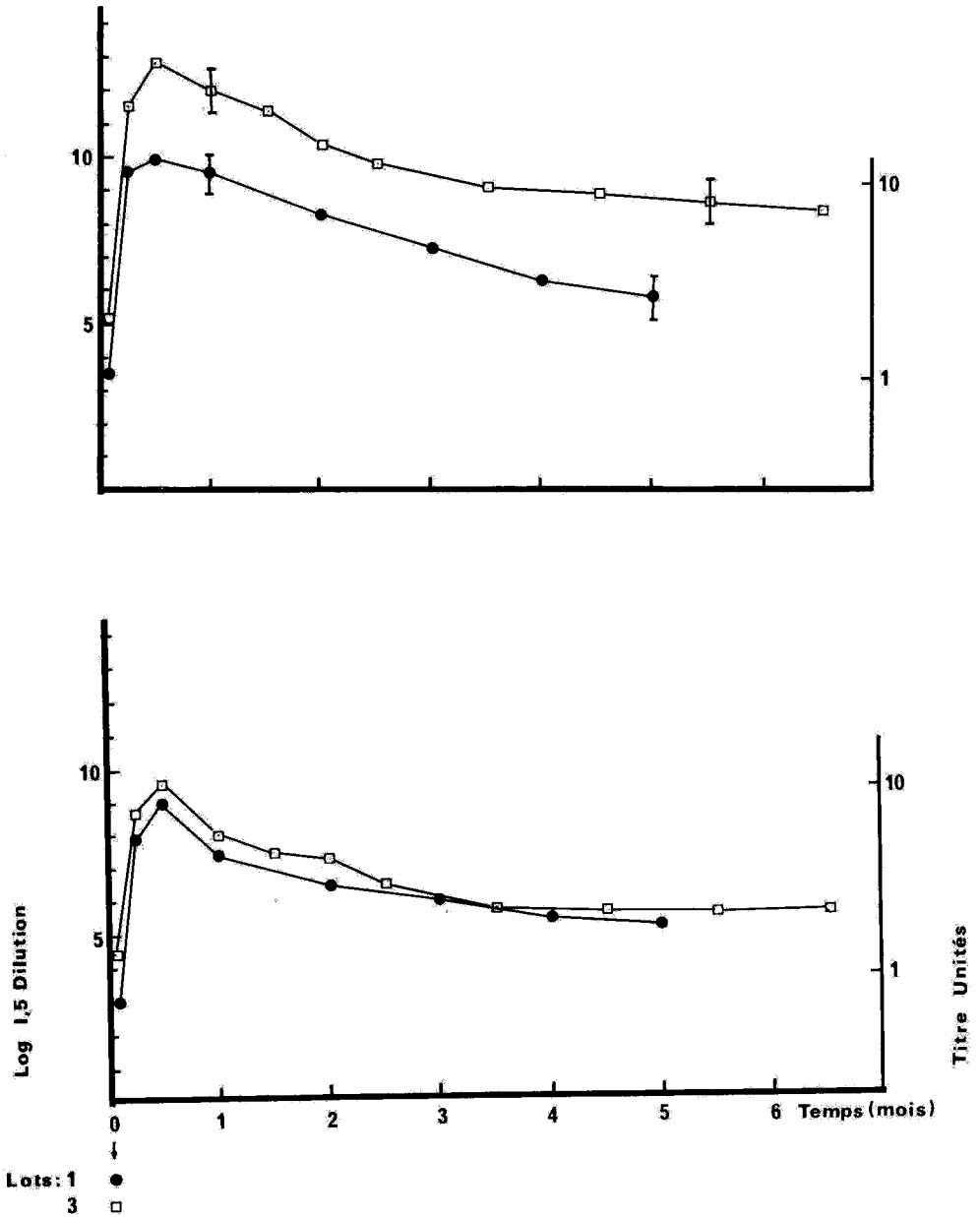


FIG. 2. — Évolution des titres des antitoxines α (courbe supérieure) et β (courbe inférieure) des lots 1 et 3

Titers in groups 1 and 3

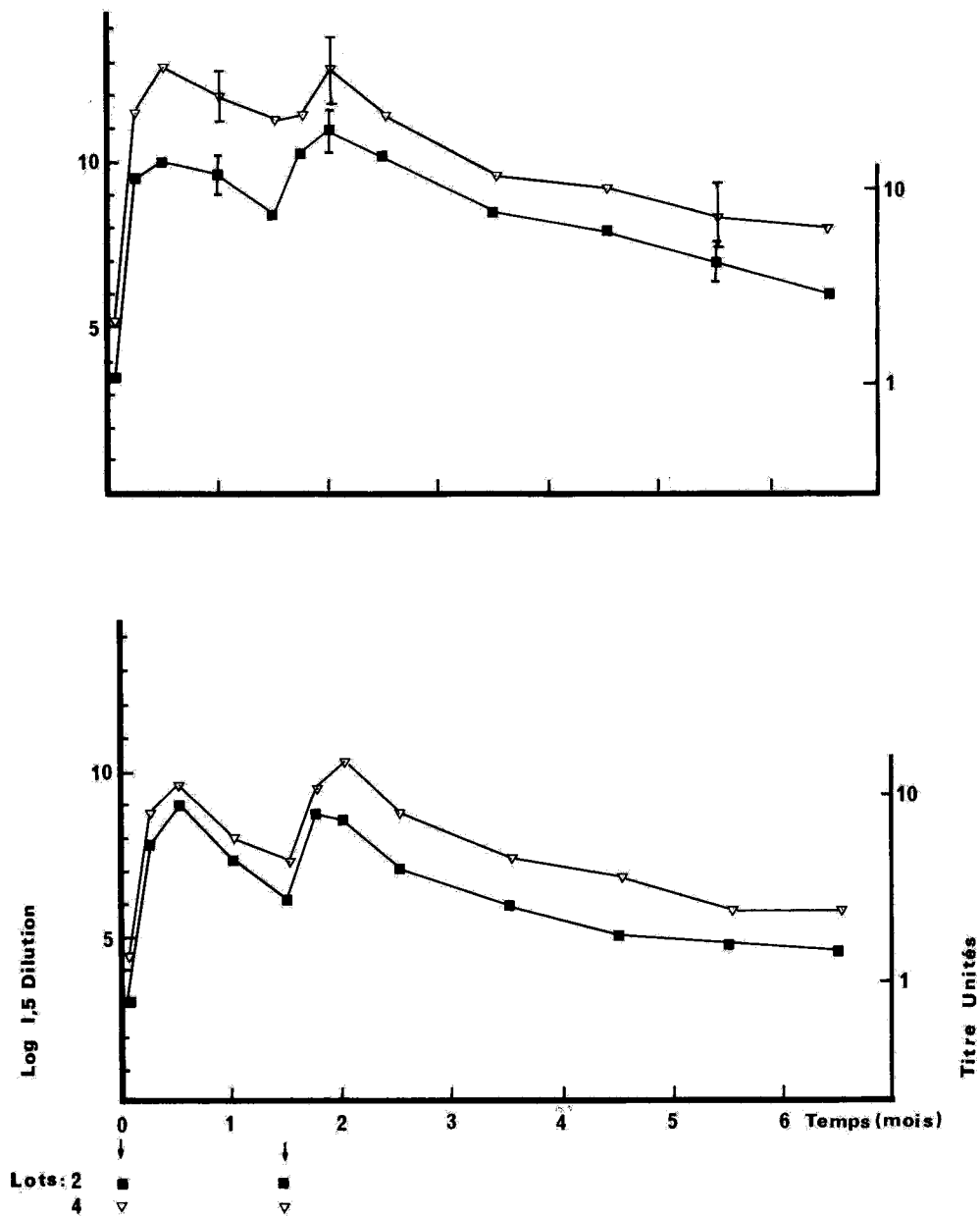


FIG. 3. — Évolution des titres des antitoxines α (courbe supérieure) et β (courbe inférieure) des lots 2 et 4
Titers in groups 2 and 4

TABLEAU 2

Répartition des cas de Mammites dans le troupeau n° 1
 Number of cases of mastitis to total number of ewes in flock n° 1

Race <i>Breed</i>	Témoïn <i>Control</i>	Vacciné <i>Vaccinated</i>
Lacaune	12/97	7/106
Sarde	6/38	3/53
F. S. L	0/18	0/19
Total	18/153 (11,7 %)	10/178 (5,6 %) $X^2 = 3,25$

TABLEAU 3

Répartition des cas de Mammites dans le troupeau n° 2,
 en fonction du type de vaccin, du protocole de vaccination et de la période de lactation
 Les chiffres entre parenthèses indiquent les pourcentages

Number of cases of mastitis in flock n° 2, according the vaccin,
 the number of injections, the period of lactation

	Périodes de lactation <i>Periods of lactation</i>	Vaccination			X^2
		Vaccin aluminé <i>Alumine vaccine</i> 3 inject. A	Vaccin huileux <i>Oil vaccine</i>		
			1 inject. B	2 inject. C	
Brebis <i>Ewes</i>	Allaitement <i>Suckling</i>	2/126 (1,6)	3/301 (1)		A vs B = 1,93 A vs C = 4,40 A vs $B + C$ = 6,03
	Traite <i>Milking</i>	6/126 (4,7)	1/113 (0,9)	1/188 (0,5)	
Antenaises <i>First lactation Ewes</i>	Allaitement <i>Suckling</i>	2/160 (1,2)	10/320 (3,1)		
	Traite <i>Milking</i>	10/160 (6,2)	4/178 (2,2)	5/142 (3,5)	A vs $B + C$ = 2,47
Total	Allaitement <i>Suckling</i>	4/286 (1,4)	13/621 (2,1)		0,2
	Traite <i>Milking</i>	16/286 (5,1)	5/291 (1,7)	6/330 (1,8)	A vs B = 5,12 A vs C = 5,29 A vs $B + C$ = 8,35

2. — *Protection contre les mammites dans les conditions naturelles**Troupeau n° 1.*

Les résultats sont donnés dans le tableau 2. On a observé des mammites (toutes mammites, staphylococciques ou non, confondues) sur 11,7 p. 100 des brebis témoins contre 5,6 p. 100 sur les vaccinées. Cette différence est à la limite de la signification, avec un X^2 corrigé de 3,25 (X^2 0,05 = 3,84 ; 0,10 = 2,71). Mais compte tenu du fait qu'une fraction des mammites n'est pas d'origine staphylococcique, on peut conclure que le vaccin a réduit de plus de moitié le nombre de mammites staphylococciques.

Troupeau n° 2

Les résultats entre les 3 procédés de vaccination sont donnés au tableau 3. Il apparaît que le vaccin avec adjuvant huileux comportant 1 ou 2 injections confère une meilleure protection que le vaccin avec adjuvant alumine pendant la période de traite (X^2 global = 8,35) ; par contre, il n'y a pas de différence durant la période d'allaitement. Compte tenu de nos résultats, cela est dû au groupe des primipares : ces animaux n'ont reçu, à cette période, qu'une seule injection de vaccin huileux (contre 2 pour le vaccin alumine) ce qui — bien que suffisant *en moyenne* pour obtenir un titre d'antitoxine correct — laisse encore un certain nombre d'animaux sans protection suffisante.

DISCUSSION

Quoique les expériences de vaccination dans la nature soient toujours critiquables, (et dans le cas présent, elles le sont particulièrement puisque, en raison de la distance, nous n'avons pu examiné qu'une partie des échantillons de lait de mammite après conservation prolongée au congélateur), il n'en est pas moins vrai qu'elles offrent l'avantage de cerner différents aspects de la réalité. Les expériences en Station ne peuvent porter que sur un effectif limité et contaminé par une souche particulière de staphylocoques. En observant sur deux troupeaux, soit plus de 1 200 brebis, avec un taux d'infection naturel supérieur à 10 p. 100 (et, avant l'introduction de la vaccination, bien plus élevé dans le troupeau 2), nous avons pu montrer que le vaccin constitué d'un mélange des anatoxines α et β et d'un adjuvant huileux confère une protection incontestable contre la mammite staphylococcique de la brebis, comme nos travaux antérieurs (LE GALL et PLOMMET, 1965 ; GUYONNET, PLOMMET et VIDAL, 1971), le suggéraient. Les conclusions pratiques que CONTINI (1968) tire de sa propre expérience, avec un vaccin légèrement différent, fabriqué dans son laboratoire, sont semblables à celles de cette expérience.

On peut raisonnablement penser qu'un vaccin constitué par une quantité suffisante des anatoxines α et β et un adjuvant huileux analogue à ceux utilisés dans ce travail (analogie contrôlable par référence aux courbes de la réponse antitoxique des figures 1, 2 et 3), administré en 2 injections (15 jours avant agnelage, 8 jours avant mise à la traite sur les primipares) et 1 injection (ou 2, la 1^{re} année de l'adoption de la vaccination) sur les brebis avant agnelage, doit réduire très notablement dès la 1^{re} année le nombre de mammites décelées, et doit être encore plus efficace les années

suivantes. Notons qu'un tel vaccin ne provoque pas de réaction gênante au point d'inoculation et que, fait en cours de lactation, il n'a pas d'influence notable sur la production de la plupart des brebis. Il reste que la fabrication des anatoxines à un titre convenable et à un prix compatible avec l'usage qui en est fait n'est pas un problème entièrement résolu, en particulier concernant l'anatoxine β ; nous aurions certainement obtenu de meilleurs résultats si les fournitures dont nous disposions, avaient été plus convenables à cet égard.

Reçu pour publication en octobre 1973.

REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement M. J.-C. FLAMANT, du laboratoire de Génétique des petits ruminants de l'I. N. R. A., responsable du domaine de la Fage, M. J. Bosc, de la Société des Caves de Roquefort, et ses collaborateurs, ainsi que le personnel des domaines expérimentaux, pour les observations et analyses des résultats à la suite des vaccinations.

Nous remercions le Laboratoire Roger Bellon qui nous a autorisés à publier les courbes des réponses antitoxiques après vaccination avec l'adjuvant de ce Laboratoire.

SUMMARY

THE VALUE OF ANATOXINS AND ADJUVANTS IN ANTISTAPHYLOCOCCAL IMMUNISATION OF EWES

II. — OIL ADJUVANTS

Two vaccines made from α and β staphylococcal toxoids in two different water-in-oil adjuvants were injected into ewes to compare the antitoxin responses after either :

1. One injection of 100 units α and 30-50 units β ;
2. A booster injection 45 days after ;
3. and 4. One or two injections respectively as 1 and 2, but one year after a previous vaccination.

Previous studies have indicated that a minimum level of 10 antitoxin units is required to protect ewes during their first 3-4 months of lactation, when they are most susceptible to mastitis. Vaccination according to 2 and 3 gave protection for 4-5 months which is considered adequate. Protocol 1) is inadequate and 4) unnecessary.

Field experiments of the vaccine were carried out in two flocks of milking ewes. Results were recorded as « mastitis » when detected by the milker without bacteriological confirmation as to the causative organism. In the first flock of 331 ewes, 178 were vaccinated according to 2 ; the rate of mastitis was 5,6 p. 100 in this group, as compared with 11,7 p. 100 in the control group.

In the second flock of 907 ewes, 286 were injected three times with an alumina toxoid vaccine ; 291 were vaccinated according to 1 and 3, and 330 according to 2 and 4. No differences were observed during the suckling period. During the milking period, the oil adjuvant vaccine gave better protection (1,8 p. 100) than the alumina vaccine (5, 1 p. 100).

РЕЗЮМЕ

Антистафилококковая иммунизация овец путем анатоксинов и вспомогательных веществ. — II. Маслянистые связывающие вещества.

Овцам были впрыснуты две вакцины, составленные из смеси стафилококковых анатоксин α и β , и одного или другого из двух маслянистых

связывающих веществ, в целях сравнения реакций, под видом появления анатоксин α и β , соблюдая 4 рода протоколов :

1. Одна единственная инъекция в 100 единиц анатоксина α и 30-50 единиц β .
2. Две идентичные инъекции с перерывом в 45-дней.
- 3 и 4. Одна или две инъекции как указано в 1 и 2, овцам, которым была сделана прививка в предыдущем году.

Данные предварительных исследований показали, что титр в 10 единиц анитоксина необходим, в период предрасположения овец к маститу, чтобы с уверенностью предохранить их от заражения (т. е. 3-4 месяца после окота); следует делать две инъекции в первый год (протокол 2), по 1-ой единственной каждый год в последствии (протокол 3).

Два опыта, при которых употребляли вакцину на практике, проводились на двух стадах молочных овец. Бактериологическое исследование случаев маститов не проводилось систематически, по этому мы включаем в общие результаты, под терменом « мастит », все случаи воспаления наблюдаемые доильщиком, какой бы не был агент заражения.

В 1-ом стаде, на 331 овцу 178-ми прививка совершалась по протоколу 2. Признаки мастита обнаружили у 5,6 на 100 среди привитых животных и 11,7 на 100 среди контрольных.

Во 2-ом стаде, 286-и овцам сделали по 3 инъекции вакцины с вспомогательным алюминием; 291-ой прививка совершалась по протоколам 1 и 3; 330-и по протоколам 2 и 4. Во время периода вскармливания не было отмечено никакой значительной разности между группами животных. Во время доильного периода разность между вакциной с алюминием (5,1 на 100) и маслянистой вакциной (1,8 на 100) очень значительна.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COLES C. L. J., HEPPLE J. R., HILTON M. L., WALTON C. A., 1968. Water-in-oil solubilized vaccine adjuvants. *J. Pharmacol.*, 20, suppl., 26 S-31 S.
- CONTINI A., 1968. Saggi di vaccinazione contro la mastite gangrenosa della pecore. *Veter. Ital.*, 19, 62-75.
- GUYONNET F., PLOMMET M., VIDAL G., 1971. Immunisation antistaphylococcique de la brebis par anatoxines et adjuvants. *Ann. Rech. vétér.*, 2, 77-82.
- LE GALL A., PLOMMET M., 1965. Observations sur la croissance des staphylocoques et la réaction leucocytaire au cours des premières heures de la mammitte expérimentale de la brebis. *Ann. Biol. animale Biochim. Biophys.*, 5, 113-130.
- PLOMMET M., RICORDEAU G., 1960. Mammitte staphylococcique de la brebis. Influence des modes de traite, et de sevrage du nombre d'agneaux, du stade de lactation et de la production laitière sur le déclenchement de l'infection. *Ann. Zootech.*, 9, 225-240.