

## ETUDE PRELIMINAIRE DE L'ASSOCIATION DE VACCINS ANTIAPHTEUX ET ANTIBRUCCELLIQUE (\*)

*M.B. Mastan, M. Amighi, A. Ardelan,*

*M.R. Firouzi Bandpay, A. Ebadi et y. Farsi*

### RESUME

Les résultats obtenus avec la souche Brucella B19, utilisée comme adjuvant et stimulant dans la préparation des sérums hyperimmuns antiaphteux sur cobayes, ont amené les auteurs à réaliser une série d'expérimentations avec un vaccin associé antiaphteux et antibrucellique (souche B 19 Buck and Cotton).

La recherche des anticorps neutralisants pour la fièvre aphteuse a été menée à l'aide de différentes méthodes. Pour la recherche des anticorps antibrucelliques ont été employées des réactions telles que séroagglutination, fixation du complément, etc. Les résultats obtenus avec la vaccination associée sont identiques à ceux obtenus avec chacune des vaccinations monovalentes.

### ABSTRACT

The results obtained with Brucella B 19 strain, used as adjuvant and-stimulant in the preparation of hyperimmune anti-foot-and-mouth disease serums on guinea pigs, have led the authors to carry out a series of experiments with a combined anti-foot-and-mouth disease and anti-brucellosis vaccine (strain B 19 Buck and Cotton).

The search for neutralizing antibodies for foot-and-mouth disease has been undertaken by different methods. In the search for antibrucellic antibodies

---

(\*) International Symposium on foot and mouth disease, Lyon 1976. Develop. biol. Standard., vol. 35, pp. 437-443 (S. Karger, Basel 1977).

reactions such a seroagglutination, fixation of the complement, etc. have been used. The results obtained with the combined vaccine are identical with those obtained with each of the monovalent vaccines.

Actuellement, la prophylaxie de la brucellose en Iran est réalisée sur des veaux femelles âgés de 3 à 6 mois, à l'aide d'un vaccin souche B19 vivante (3), en une seule injection.

Le but de notre expérimentation est de savoir si l'on peut, lors de cette primo-vaccination antibrucellique, réaliser en même temps une première vaccination antiaphteuse et, si possible, à l'aide d'un vaccin mixte antiaphteux antibrucellique (4,8). Depuis longtemps déjà, l'action adjuvante et stimulante du vaccin antibrucellique souche B 19 vivante ou tuée a été utilisée pour la préparation sur cobayes de sérums hyperimmuns destinés à la réaction de fixation du complément en fièvre aphteuse (6).-Par ailleurs, nombreux sont les auteurs qui ont étudié l'effet adjuvant d'autres microorganismes pour la préparation de tels sérums; il peut s'agir de microorganismes vivants, de microorganismes tués, d'extraits microbiens ou d'endotoxines.

Dans un premier temps, nous avons expérimenté sur des cobayes avec un vaccin antibrucellique souche B 19 (2) et un vaccin antiaphteux trivalent O1, A22, Asial, deux vaccins couramment élaborés dans notre institut.

## MATERIEL ET METHODES

### *Animaux*

*Cobayes.* Animaux tricolores, puis cobayes albinos en bonne santé et d'un poids supérieur à 350 g provenant de notre élevage. Les résultats donnés dans notre publication sont ceux obtenus sur cobayes albinos.

*Bovins.* Veaux femelles de l'Institut d'Elevage Gouvernemental. Malheureusement cette expérience devra être reprise car les animaux dont nous disposions présentaient encore des anticorps antiaphteux d'origine maternelle (les bovins adultes sont vaccinés contre la fièvre aphteuse tous les 6 mois en Iran).

### *Vaccins*

*Vaccin antibrucellique préparé avec une souche vivante.* Ce vaccin est une préparation de Brucella B 19 (de Buck et Cotton) vivant, dans un tampon phosphate à PH 7,5. La dose est de 5 ml pour des veaux de 3 à 6 mois; elle contient 80 milliards de germes microbiens. Pour les cobayes nous avons inoculé 0,5 ml de ce vaccin, soit 8 milliards de germes par voie sous-cutanée en région

abdominale. Chez les bovins, une seule vaccination confère une immunité contre la maladie durant toute la vie économique de sujet.–

*Vaccin préparé avec une souche inactivée.* Il s'agit du même vaccin que le précédent, mais inactivé par la chaleur (1 h à 60°C).

Le vaccin *antiaphteux* est trivalent O1, A22, Asial; il est inactivé par la chaleur et le formol, adsorbé sur gel d'alumine et adjuvé par de la saponine. Il est préparé à partir de virus cultivés sur culture de cellules BHK 21 (1). La dose vaccinale bovine est de 10 ml pour les adultes et 5 ml pour les veaux. Sur les cobayes nous avons inoculé 0,5 ml par voie sous-cutanée en région abdominale.

#### *Protocole de vaccination*

8 lots de 5 cobayes sont entretenus dans 8 cages différentes, toute la durée de l'expérience. Les animaux des lots de 1 à 8 sont inoculés de la manière suivante:

lot No 1 vaccin : B 19 vivant seul,

lot No 2 vaccin : antiaphteux seul,

lot No 3 vaccin : B 19 vivant + vaccin antiaphteux, inoculés en deux points différents,

lot No 4 vaccin : B 19 vivant + vaccin antiaphteux, inoculés en un point après mélange extemporané,

lot No 5 vaccin : B 19 inactivé seul,

lot No 6 vaccin : B 19 inactivé + vaccin antiaphteux, inoculés en deux points différents,

lot No 7 vaccin : B 19 inactivé + vaccin antiaphteux, inoculés en un point après mélange extemporané,

lot No 8 : cobayes témoins n'ayant rien reçu, élevés dans des conditions identiques aux cobayes des autres lots.

### B r u c e l l o s e

*Effet du formol* contenu dans le vaccin contre la fièvre aphteuse sur les brucella vivantes. Le formol étant employé comme agent inactivant du virus lors de la fabrication du vaccin antiaphteux, nous avons cherché par cette expérimentation annexe, à vérifier l'action de cet agent réducteur sur les brucella vivantes du vaccin antibrucellique utilisé lors du mélange. L'étude comporte deux volets:

1) une expérimentation *in vivo*. Inoculation à deux lots de cobayes de deux vaccins : lot No 1, vaccin antiaphteux et antibrucellique en un point par voie

sous-cutanée après mélange extemporané, et lot No 2, les mêmes vaccins mais inoculés en deux points différents. 11 jours après l'inoculation, nous sacrifions les cobayes des deux lots et nous recherchons les brucella B 19 dans les rates des cobayes sacrifiés.

2) expérimentation *in vitro*. Mélange en flacon du vaccin B 19 avec la souche vivante, les dilutions de formol allant de 0,7‰ (dilution utilisée dans la composition de notre vaccin) à 1‰. Après agitation nous effectuons des ensemencements de milieu de culture (Brucella Agar) avec le mélange immédiatement, puis 5, 10, 15 et 30 min après le mélange. Au bout de 48 h de culture, nous observons les résultats comparativement à des cultures de mélange témoin (vaccin B 19 + sérum physiologique).

La recherche des anticorps antibrucelliques dans le sérum des cobayes est effectuée à l'aide des trois méthodes suivantes:

- a) test du Rose Bengale (RBPI), essai préliminaire pour diagnostiquer la présence ou l'absence d'anticorps;
- b) test de séro-agglutination (SAT). Nous utilisons des sérums non inactivés mis en présence d'antigènes S99; lecture des résultats après 24 h à 37°C à l'étuve;
- c) test de fixation du complément (FCT), suivant la méthode de Kolmer. Le sérum est inactivé 30 min à 56°C; la lecture s'effectue après une nuit, maximum 18 h à + 4° C.

Pour le contrôle d'activité du vaccin antibrucellique, nous avons procédé ainsi:

– 9 semaines après l'inoculation des 2 vaccins-suivant le protocole indiqué précédemment, les cobayes sont soumis à une épreuve virulente par inoculation d'une souche sauvage de *Brucella abortus* 544, 5000 germes dans 1 ml de tampon phosphaté, par voie intramusculaire;

– 6 semaines après inoculation de ces germes, nous avons sacrifié les cobayes et compté les colonies obtenues sur milieu de culture ensemencé avec 3 dilutions (1/10, 1/100, 1/1000) de broyat de rate.

## F i è v r e   a p h t e u s e

*Recherche d'anticorps neutralisant.* Vérification de l'efficacité de la vaccination contre la fièvre aphteuse par titrage de virus en présence de sérums de cobayes après 11, 21, 30, 42 et 63 jours. Séronéutralisation avec sérum fixe 1/10 sur cellules BA (lignée cellulaire issue de rein de porc) (7). Seuls les anticorps de la valence O 1 sont recherchés dans notre expérimentation

*Recherche des anticorps inhibant la fixation du complément.* Nous avons aussi effectué cette recherche pour des anticorps antiaphteux.

## RESULTATS ET COMMENTAIRES

### Vaccin antibrucellique

#### *Action du formol*

*In vivo.* Le comptage des colonies de brucella obtenues par culture à partir du broyat de rate des cobayes inoculés ne montre pas de différence entre les deux lots d'animaux.

*In vitro.* Le formol employé à différentes concentrations allant jusqu'à 1‰ (supérieure à la concentration employée dans notre vaccin) et jusqu'à une demi-heure après la mise en contact avec les germes vivants du vaccin souche B 19, n'a pas d'effet néfaste.

#### *Recherche des anticorps antibrucelliques*

Le réponses obtenues par les différentes méthodes employées (Tableau I) ne montrent pas de différences, quels que soient les vaccins employés : seuls, simultanément en deux points ou associés en un seul point.

Les résultats avec le vaccin B 19 vivant sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec le vaccin B 19 inactivé. Le titre sérique maximum est observé entre 30 et 42 jours après l'inoculation.

#### *Epreuve d'efficacité contre la brucellose*

D'après le Tableau II, nous pouvons constater que les vaccins associés No 3 et No 4 protègent plus efficacement contre la souche d'épreuve que les vaccins No 5 et No 7. Notons que les témoins No 2 et No 8 se sont montrés sensibles à la souche d'épreuve.

*Tableau II.* Résultats de l'épreuve d'efficacité antibrucellique. Comptage des colonies à partir des broyats de rate au 1/10 (0,1 ml/boîte)

\* Dilution de broyat de rate

\*\*\* Innombrables

Cage No *	1/10	1/100	1/1000
1	65	25	7
2	+++	250	31
3	36	9	1
4	38	10	1
5	150	21	2
6	140	18	3
7	130	15	2
8	+++	63	20



## Vaccin antiaphteux

### *Titration des sérums*

*Séroneutralisation* : Les essais sur cellules BA offrent des résultats qui sont pratiquement identiques pour tous les lots d'animaux vaccinés contre la fièvre aphteuse en ce qui concerne la valence O1, seule titrés dans notre expérience (Tableau III).

**Tableau III.** Séroneutralisation à sérum fixe sur cellules de lignée BA. Les titres sont ceux du mélange de sérum des 5 cobayes de chaque lot pour la valence O1. L'indice de séroneutralisation porté dans les cases du tableau SNC est le rapport :

$$\frac{T \text{ (titre du virus vis-à-vis du sérum des cobayes témoins)}}{V \text{ (titre du virus vis-à-vis du sérum des cobayes vaccinés)}}$$

\* Date des prises de sang après vaccination

Lots *	11 j.	21 j.	30 j.	42 j.	63 j.	
1	-	-	-	-	-	Avec B19 vivant
2	1,25	2,75	2,5	2,5	2	
3	1	2,75	2,75	2	2	
4	1	2	2	3	1,5	
5	-	-	-	-	-	Avec B19 tué
6	1,75	3,5	2,5	2,25	1,25	
7	1,5	3	2,75	2,25	1,75	
8	-	-	-	-	-	

*Inhibition de la fixation du complément.* Les résultats obtenus ont été irréguliers, ce qui peut en partie être imputable au fait que nous avons à faire à des sérums de cobayes. Nous espérons reprendre cette expérimentation sur bovins de manière à confirmer nos résultats sur l'espèce sensible.

### CONCLUSIONS

Depuis plusieurs années, nous avons utilisé la souche de brucella B 19 vivante ou tuée (inactivée par la chaleur) comme adjuvant et stimulant pour la préparation des sérums hyperimmuns de cobayes, nécessaires à la réaction de fixation du complément. Dans le présent rapport, nous avons utilisé le vaccin associé antiaphteux et antibrucellique (souche B 19 de Buck et Cotton).

La voie sous-cutanée est retenue pour les différentes injections à plusieurs lots de cobayes. Une expérience a été également effectuée sur des veaux de 2 à 4,5 mois, qui ont présenté malheureusement dans leurs sérums des anticorps maternels contre la fièvre aphteuse, avant notre expérience.

Cette étude a permis de rechercher les anticorps neutralisants par différentes méthodes, et de faire quelques essais de tests d'inhibition de la fixation du complément. Les résultats obtenus avec les sérums des cobayes ont été irréguliers. De plus, nous avons eu recours aux réactions sérologiques telles que Rose Bengale, séroagglutination et fixation du complément pour chercher des anticorps suscités par la vaccination contre la brucellose.

Nos résultats, exposés dans les différents tableaux, montrent que l'on obtient les mêmes effets que les vaccins soient associés ou injectés seuls. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des cobayes en bonne santé et de poids supérieur à 350 g. Il n'y avait aucune différence entre les lots des bobayes mâles et femelles. Relevons enfin que les résultats obtenus avec les cobayes albinos (élevage de notre institut) furent meilleurs que ceux observés avec les cobayes tricolores.

Le formol contenu dans notre vaccin antiaphteux même à la concentration de 1‰, n'a pas modifié la souche B 19. L'épreuve d'efficacité antibrucellique montre que les vaccins No 1-3-4 sont plus efficaces que les autres lots de vaccins.

#### *Remerciements*

Nous tenons à remercier le Dr Vét. F. Perrinot, chef de la mission de l'Institut Français de la Fièvre Apathétique en Iran, pour sa collaboration à la rédaction de cette étude.

#### REFERENCES

1. Amighi, M., Hessami, M., Mastan, M.B. & Chafyi, A. (1964). Préparation d'un vaccin antiaphteux concentré trivalent O A SATI avec du virus de culture obtenu sur lignée cellulaire de rein de hamster. BHK21 de MacThelson et Estockol. *Bull. Off. int. Epizoot.* **41**, 935-944.
2. Buck, J.M., Cotton, W.E. & Smith, H.E. (1938). Studies on the attenuated strain of *Brucella abortus*. *Techn. Bull. US Dep. Agric.* No. 658.
3. Entassar, F. & Ardelan, A. (1964). Incidence of brucellosis in Iran. FAO/WNL Meeting on the Control of Brucellosis in the Mediterranean Region, Malta, 8-13 June 1964.
4. Favre, H., Valette, L., Fargeaud, D., Perrenot, F., Précausta, P., Terré, J. & Fontaine, J. (1972). A new combined vaccine against brucellosis, foot-and-mouth disease and rabies. *Proceed. Symposium on Combined Vaccines. Zagreb: Yugoslav Academy of Sciences and Arts.*

5. Fédida, M. Etude quantitative de l'état immunitaire post-vaccinal et des interrelations des interrelations entre ses divers aspects dans une virose animale, la fièvre aphteuse. Thèse de doctorat ès Sciences.
6. Gilbert, H., Roumiantzeff, M., Terré, J. & Amighi, M. (1966). Préparation de sérums hyperimmuns de cobayes nécessaires à l' réaction de fixation du complément en matière de fièvre aphteuse. Rôle adjuvant de la souche Brucella B19. *Revue d'immunologie*, Paris **30**, 31-44.
7. Santucci, J., Amighi, M., Gilbert, H., Mastan, M.B., Hessami, M., Haag, J. & Chafyi, A. (1965). Sensibilité d'une lignée cellulaire de rein de porc au virus aphteux de type SATI d'Asie souche d'Iran et de Turquie. *Bull. Off. int. Epizoot.* **43**, 469-475.
8. Terré, J., Favre, H., Précausta, P., Valette, L. & Fontaine, J. (1975). Les vaccins associés fièvre aphteuse-rage-brucellose. 20ème Congrès Mondial Vétérinaire, Thessalonique, 6-12 juillet 1975.