

TITRAGE APPROXIMATIF DE L'ANTITOXINE TETANIQUE
CHEZ LES CHEVAUX VACCINES CONTRE LE
TETANOS PAR DIFFUSION DANS LE
MILIEU GELIFIE

par

H. MIR CHAMSY M. LATIFY et Mlle A. MOHEBZADEH.*

Dans une note antérieure (7) nous avons démontré en collaboration avec A. Rafyi et J. L. Delsal que la toxine tétanique, quelle que soit la souche toxigène, est un ensemble complexe d'antigènes ou haptènes libérés dans le milieu de culture et que la technique de diffusion sur le gel d'Oudin, nous permet de dénombrer ces antigènes.

Il est évident que l'organisme animal vacciné ou hyperimmunisé avec ces antigènes complexes répond par élaboration des anticorps correspondants. Ces anticorps généralement n'existent pas chez un sujet neuf; mais à la suite de la vaccination et surtout au cours de l'hyperimmunisation ils sont présents dans le sérum sanguin.

Existe-t-il une relation, même approximative, entre le vrai anticorps antitoxique et les autres anticorps associés antibactériens? C'est dans cet ordre d'idée que nous avons envisagé l'étude de cette relation.

L'idée de cette étude nous est venue à la suite d'une question posée en vue de contrôler la teneur en antitoxine tétanique des chevaux de l'Armée iranienne vaccinés depuis plusieurs années avec le vaccin associé anticharbonneux-antitétanique que nous avons proposé ailleurs (1). La manque d'un stock important de souris blanches pour un effectif remarquable des chevaux nous a empêché de suivre la méthode classique de titrage de l'antitoxine. Nous cher-

* Rev. d'Immunol. 1957, 21, 174-180.

chions donc à établir une relation «in vitro» qui puisse nous donner une idée de la valeur antitoxique du sérum d'un nombre important de chevaux.

Matériel et Technique.

Comme nous venons de le dire les chevaux que nous disposions avaient été vaccinés en 1952 et ont reçu plus tard une injection de rappel de vaccin associé «anticharbonneux-antitétanique».

Ce travail a été effectué sur 108 chevaux de l'Armée offerts à l'Institut Razi pour la production de sérum antitétanique. Pour la diffusion sur le gel nous appliquons la technique d'Ockley dont nous avons donné les détails dans la précédente note.

Le titrage de l'antitoxine tétanique se fait avec la toxine étalon desséchée N° 7 dont voici les doses-tests :

$L+ / 1000 = 0 \text{ mg } 0065$, $L+ / 100 = 0 \text{ mg } 065$, $L+ / 10 = 1 \text{ mg } 15$ et $L+ = 10 \text{ mg } 2$

On injecte un volume de 0,4 ml du mélange toxine-antitoxine resté 60 minutes en contact à 25°C, sous la peau des souris blanches de 15-18 grammes.

La floculation se fait par la technique classique de Professeur G. Ramon (8,9) tenant compte des travaux récents de Van Ramshorst et Rijks (10,11). Comme étalon antitoxine outre l'étalon local choisi parmi nos antitoxines tétanique purifiées et concentrées (2) nous avons profité de l'étalon international danois et d'un étalon français que Mr. le Pr. Raynaud de l'Institut Pasteur de Garches nous a gentiment expédié. Pour l'hyperimmunisation des chevaux on prépare la toxine à partir du milieu de Prévot et Boorsma (6) en employant les deux souches R (I. P. Paris) et Welcome 509 de (I.N.H. d'Utrecht-Hollande). L'hyperimmunisation des chevaux se fait suivant le protocole de l'Institut National de l'Hygiène Publique d'Utrecht*.

* L'un de nous (H. M. C.) remercie vivement le Dr Brandwijk, Directeur, Dr Koopman, Dr Tasman, Prf. Gispén et ses collègues de l'I. N. H. d'Utrecht qui l'ont accueilli très amicalement lors de son séjour en Hollande.

*Relation entre l'ensemble des anticorps et l'antitoxine
présents dans un sérum antitétanique
purifié et concentré.*

Si on prend un échantillon de l'antitoxine tétanique purifiée et concentrée par la dénaturation enzymatique du Pope (5) et que l'on cherche le nombre des anticorps présents vis-à-vis d'une toxine tétanique brute par la technique de diffusion sur gel on trouve un nombre considérable de lignes qui peuvent atteindre jusqu'à 17 ; mais au fur et à mesure qu'on dilue l'antitoxine le nombre détecté diminue pour aboutir à zéro.

Le tableau I peut schématiser ce fait.

TABLEAU I

Antitoxine tétanique N° 34/92 Titre de dilution (U. A./ml)	Lignes de diffusion détectées sur les dilutions
4000	15
500	11
100	7
50	7
30	5
25	4
15	3
7.5	2
4	1
2	± 1
	0
0.5	0
0.01	0

Ce que l'on peut déduire du Tableau I c'est qu'un sérum antitétanique renferme des anticorps antibactériens de concentrations différentes et qu'avec la dilution le nombre des anticorps détecté diminue.

*Valeur comparative de l'antitoxine et des
anticorps totaux au cours de
l'hyperimmunisation*

Ce qui précède nous permet de penser que ce phénomène peut également exister chez l'animal. Au cours de l'hyperimmunisation d'un cheval chaque antigène ou haptène présent dans le vaccin ou dans la toxine doit stimuler la production de l'anticorps correspondant. La concentration en anticorps du sérum d'un tel cheval varie de même que son titre en antitoxine. Nous avons suivi ces variations d'abord chez un nombre restreint de chevaux.

Au cours de l'hyperimmunisation et au moment des injections de toxine on prélève du sang pour vérifier *in vivo* le titre en antitoxine et *in vitro* le nombre total des lignes correspondantes aux anticorps élaborés. Le même lot de toxine a été employé pour l'hyperimmunisation des chevaux et la diffusion sur le gel. Cette toxine conservée à $+2^{\circ}$ C avait le titre suivant :

25 Lf/ml Kf=45 minutes, D.M.M.= $0,65 \times 10^{-5}$ / cobayes 350 grs.

Le Tableau II montre les résultats obtenus :

D'après ces résultats on voit que les chevaux vaccinés, avant de recevoir l'injection de rappel ont déjà un titre qui varie de 0,5 U.A./ml à 2 U.A./ml; 3 chevaux sur 8 montrent une ligne de diffusion. A la suite de l'injection de rappel les titres en antitoxines montent et en même temps on voit apparaître une ou deux lignes représentant les anticorps totaux. Si on peut établir, d'après ce tableau, une certaine relation entre la valeur antitoxique et le nombre des lignes observées par diffusion chez les chevaux vaccinés ou ayant reçu l'injection de rappel, cette relation sera insignifiante au cours et à la fin de l'hyperimmunisation; en effet, comme le tableaux II le montre, au fur et à mesure qu'on répète l'injection de toxine, la valeur antitoxique et le nombre total des anticorps augmente, celui-ci atteint chez tous en moyenne de 15 alors que le titre antitoxique final varie de 360 à 1570 U.A./ml.

On peut donc prévoir qu'il est possible qu'on puisse établir une certaine relation entre le titre en antitoxine et les lignes de diffusion seulement quand les chevaux sont vaccinés ou après une injection de rappel.

Nous avons cherché ce rapport sur 100 chevaux antérieurement vaccinés et ayant reçu 2 mois avans la saignée expérimentale

TABLEAU II

Cheval N°	avant injection de rappel		2 semaines après injection de rappel		après injection de 20ml. de toxine		après injection de 50ml. de toxine		à la fin de l'hyper- immunisation	
	lignes	UA/ml	lignes	UA/ml	lignes	UA/ml	lignes	AU/ml	lignes	UA/ml
34/165	0	0,5	2	3,0	6	30	9	75	15	400
34/166	0	0,6	1	1,5	8	25	9	125	16	1000
34/167	1	1,25	2	8,5	4	30	8	150	15	1570
34/168	1	0,75	2	3,0	7	40	7	65	16	550
34/169	0	0,6	1	1,0	5	35	6	45	14	360
34/170	1	2,0	3	16,0	3	15	5	70	15	750
34/171	0	0,6	2	8,5	5	25	8	55	16	520
34/172	0	0,8	2	4,0	4	30	4	65	17	850

TABLEAU III

Nombre des chevaux	Lignes détectées par diffusion	Titre de sérum : U.A/ml															
		0,01	0,75	1	1,5	1,75	2,5	3,75	5	6,25	7	7,5	8,75	10	17,5	25	45
45	0	2	3	29	2	9											
13	1			4		2	2	2	2								
28	2							2		2	3	5	9	2	4	1	
14	3													3	9		2

TABLEAU IV

Plasma	P l a s m a				Antitoxine purifiée			
	U.A/ml		Zones observées par diffusion		U.A/ml		Zones observées par diffusion	
	floculation	in vivo	Toxine brute	Anatoxine purifiée	floculation	in vivo	Toxine brute	Anatoxine purifiée
1/34	50	35	5	3	—	25	3 mineurs	1
2/34	40	32	4	3	—	22	2 mineurs	1

une dose de rappel de vaccin associé charbon-tétanos. Le Tableau III résume les résultats.

D'après ce tableau le sérum de 45% des chevaux est dépourvu de tout anticorps décelable par diffusion, le titre en antitoxine chez ces chevaux varie de 0,01 à 1,75 U.A/ml, le sérum de 13% des chevaux montre une ligne avec un titre antitoxique qui varie de 1 à 5 U.A/ml, 28% des chevaux ont 2 lignes de diffusion dans leur sérum et un titre de 3,75 à 25 U.A/ml et seulement 14% des chevaux possèdent 3 anticorps observés par diffusion sur gel et un titre antitoxique allant de 10 à 45 U.A/ml.

DISCUSSION

Il est évident que l'injection du complexe antigène de toxine tétanique donne naissance chez le cheval à un complexe anticorps. La nature des antigènes qui s'élaborent graduellement au cours de la toxinogénèse et de l'autolyse bactérienne du *Pl. tetani* n'est pas claire.

Quoi qu'il en soit il n'est pas facile de détecter par diffusion le vrai anticorps-antitoxique des autres anticorps-antibactériens. A ce propos nous avons cherché à purifier des sérums antitétaniques prélevés chez des chevaux au commencement de l'hyperimmunisation en vue d'obtenir de l'antitoxine immunochimiquement pure ne possédant qu'une seule zone de diffusion sur gel.

Voici les résultats obtenus (tableau IV).

Ainsi on constate que la purification par la méthode de Pope du plasma tétanique de faible titre peut donner naissance à une antitoxine immunologiquement pure, mais cette antitoxine, dans les essais précédents, a perdu son pouvoir floculant; dans d'autres essais le temps de floculation est extrêmement allongé (24 heures et plus).

Les floculations bactériennes sont suspendues par l'insuffisance des anticorps correspondants. L'absence de la vraie floculation peut être également attribuée au manque de substances favorisant l'apparition des flocons visibles.

Les anticorps antibactériens présents dans le sérum brut antitétanique sont à des concentrations différentes; ils sont minimes et non mesurables chez les sujets vaccinés mais s'élaborent au cours de l'hyperimmunisation.

Nous avons donc pu profiter de l'absence de ces anticorps pour établir une relation, bien qu'approximative, entre le titre antitoxique et les anticorps détectés par diffusion en gelose.

CONCLUSION

A la suite de l'injection au cheval de toxine tétanique, complexe de toxine et d'antigènes bactériens, un complexe antitoxine-anticorps s'élabore dans l'organisme de l'animal.

Il est possible d'établir la valeur approximative de l'antitoxine chez les chevaux vaccinés en vérifiant le nombre total des anticorps détectables par diffusion en gélose.

SUMMARY

Following the injection of Horse with crude Tetanus toxin, mixture of true molecular toxin and bacterial antigens, the corresponding antibodies are elaborated.

Using Agar gel diffusion it is possible to establish, in Horses vaccinated against Tetanus, some approximative relation between the A.U./ml and the number of visible lines.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Delpy (L.P.) & Mir Chamsy (H) - Bull. Ac. Vét. France 1951, 24, 62.
- (2) Delsal (J.L.) & Mir Chamsy (H) - Rev. Immunol. 1953, 17, 111.
- (3) Oudin (J.) - Thèse de doctorat ès science, Paris 1949.
- (4) Oudin (J.) - Methods in Medical Research 1952, 5, 335.
- (5) Pope (C.G.) - Brit. J. Exp. Path. 1938, 19, 245.
- (6) Prévot (A.R.) & Boorsma (G.H.) - Ann. Inst. Past. 1939; 63, 600.
- (7) Rafyi (A.), Mir Chamsy (H.) & Delsal (J.L.) - Rev. Immunol. 1954, 18, 391.
- (8) Ramon (G.) - C. R. Soc. Biol. 1922, 86, 661, 711 et 813.
- (9) Ramon (G.) - Ann. Inst. Past. 1923, 37, 1001.
- (10) Van Ramshorst (J.D.) & Rijks (H.) - Antonie Van Leeuwenhoek, 1954, 20, 17.
- (11) Van Ramshorst (J.D.) & Rijks (H.) - Antonie Van Leeuwenhoek, 1955, 21, 187.