

2V0000921

PRODUCTION DE VACCINS
cyl 1989 OK

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICILES (I.S.R.A.)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES
SUR LES PRODUCTIONS
ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

DAKAR-HANN

RAPPORT DE MISSION

SEMINAIRE IAC SUR LA PRODUCTION ET LE CONTRÔLE
DE QUALITE DES VACCINS BACTERIENS

TEMA A GARCIA DU 27 AU 28 MAI 1989

Par A. GARCIA et M. B. N. N. N.

REF. N° 39, PRODUCTION
JUN 1989

INTRODUCTION

Le séminaire FAO sur la production et le contrôle de qualité des vaccins bactériens, s'est tenu à GAROUA (Cameroun) du 22-26 mai 1989 ; il portait sur les vaccins contre :

- le charbon bactérien
- le charbon symptomatique
- la pasteurellose bovine (septicémie hémorragique)
- les brucelloses animales et les politiques de prophylaxie en matière de brucellose animale
- le choléra et la salmonellose aviaire.

Ces différents thèmes ont été traités par :

- Dr. TULASNE et Dr. Mamady KONTE (Consultants FAO).

I - VOYAGE ET ACCUEIL

- Départ de Dakar le vendredi 19 mai 1989 à 10 H 20 mn
- Arrivée à GAROUA par DOUALA le 20 mai 1989
- Hébergement Hôtel NOVOTEL

DEROULEMENT SEMINAIRE

- 22 mai 1989

Enregistrement des participants qui représentaient 9 pays : la Côte d'Ivoire, le Cameroun, la Guinée, le Mali, le Madagascar, le Niger, le Sénégal, le Tchad et le Zaïre.

Ouverture officielle du séminaire par le Gouverneur de la province du Nord en présence du Préfet de GAROUA.

.../...

12 - EXPOSE DU DR. JULASNE SUR LA PRODUCTION ET LE CONTROLE DE QUALITE DE VACCINS
CONTRE LE CHARBON BACTERIDIEN ET LE CHARBON SYMPTOMATIQUE.

A - CHARBON BACTERIDIEN - DEFINITION

C'est un vaccin vivant, constitué d'une suspension de spores d'une souche atténuée non capsulée de *Bacillus anthracis*. Il contient de la saponine comme adjuvant de l'immunité. Il est présenté sous forme liquide ou lyophilisé.

1°) - Choix des souches

Le Laboratoire National Vétérinaire de Boklè utilise la souche STERNE 34F2 fournie par l'INMVT (France).

2°) - Constitution d'une banque de production

A partir de la souche de référence (INMVT), préparer 2 générations successives.

- G 1 : lot de production lyophilisé
- G 2 : lot de semence lyophilisé

3°) - Milieux de culture proposés

- Milieu OMS
- Milieu FARCHA

Au LANA-VET, le milieu FARCHA donne de meilleurs résultats que le milieu OMS selon l'expérience.

4°) - Préparation de l'inoculum

A partir de G 2, faire 16 ou 18 tubes de bouillon tryptase soja ou de sérum physiologique stérile.

Ensemencer 5 boîtes de Roux pour obtenir l'inoculum nécessaire pour un lot industriel de 50 boîtes de Roux.

5°) - Ensemencement - Incubation

Chaque boîte reçoit 3 ml d'inoculum

- Entreposer les boîtes à 37°C pendant 48 H à 72 Heures.

- Incubation à 20°-25°C pendant 3 à 4 jours à l'abri de la lumière.

La sporulation doit atteindre 90 à 100 %.

6°) - Préparation du vaccin final

Le vaccin est constitué par une suspension mère de spores de *Bacillus anthracis* Souche STERNE 34F2, glycélinée, diluée de façon à obtenir au moins : 1.10^7 spores par dose bovine de 1 ml. Il est adjuvé avec la saponine à la concentration finale de 1°/‰ par dose bovine.

Le vaccin est déclaré satisfaisant après les contrôles de pureté, de dénombrement, d'innocuité et d'activité.

7°) - Autre souche vaccinale

Il existe une souche vaccinale C5 DELPY -(Institut NESSAREK-IRAN.)
La souche C5 est une souche :

- . acapsulogène
- . atténuée par culture à 17°C-50°C
- . les marqueurs de virulence sont :
 - le lapin (25 %) mortalité)
 - le Cobaye (100 % mortalité)
 - innocuité totale pour les bovins, ovins caprins.

Au cours des discussions qui ont suivi l'exposé du Dr. TULASNE, il s'est avéré que tous les laboratoires représentés utilisent la souche STERNE.

B - CHARBON SYMPTOMATIQUE

1°) - Définition

C'est un vaccin constitué par une culture totale de *Clostridium chauvei*

inactivée par le formol (anaculture). Il contient de l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant de l'immunité.

Le Laboratoire National Vétérinaire de Boklô (LANAVET) utilise la souche "MADAGASCAR" (origine IFMUT). Elle a été sélectionnée pour sa croissance régulière, ses caractères biochimiques et bactériologiques stables, sa bonne virulence.

2°) - Constitution d'une banque

- G 1 : lot de production
- G 2 : lot de semence

3°) - Milieux de culture proposé

- VL modifié

4°) - Préparation et contrôle du principe actif

Le principe actif est constitué d'une culture en fermenteur industriel de **Clostridium chauvei**.

Inactivation de la culture par le formol (37°C - 12 jours). La culture totale représente le principe actif.

5°) - Culture en fermenteur

- Choisir 1 des 3 erlenmeyers présentant la culture la plus jeune (gazeux, gram + persistant).

- transférer la culture de l'erlenmeyer choisi dans le fermenteur par l'intermédiaire du montage de transfert.

MODALITE DE CULTURE EN FERMENTEUR

- 37°C
- Agitation : 100 tours/mn
- Régulation pH avec sonde 5 N
- Temps de culture : 13 à 18 heures
(arrêt de culture maximum de croissance vers 13 à 14 heures en général).

EXEMPLE DE CULTURE EN FERMENTEUR 100 LITRES

TEMPS DE CULTURE	DENSITE OPTIQUE	pH FERMENTEUR
2 H	0,04	7,56
8 H	0,7	7,13
11 H	0,9	7,12
	1	7,13
13 H 45	0,8	7,13

- Arrêt de la culture après 18 H de fermentation
- Prise d'échantillon pour contrôle bactérioscopique et bactériologique
- Formolisation dans le fermenteur: 6°/100 du formol du commerce (35-37°)
- Agitation 100 tours/mn
- Récolte en flacons de 10 litres ou fûts en inox de 50 litres
- Incubation (12 jours à 37°C)

On obtient ainsi un principe actif contrôlé.

Pour stocker sous un faible volume :

- Centrifuger le principe actif
- Éliminer le surnageant
- Ne conserver que le concentrat bactérien

Après l'exposé du Dr. TULASNE, j'ai constaté qu'au LANAUT, on utilise l'hydroxyde d'alumine alors que le labo de Dakar comme de nombreux autres laboratoires représentés utilisent l'alum de potassium comme adjuvant d'immunité

.../...

C - PASTEURELLOSE BOVINE (Septicémie hémorragique)

1°) - Définition

C'est un vaccin constitué de **Cultures totales** de *Pasteurella multocida* 6 : B ou 6 : E inactivée par le formol.

Ce vaccin contient de l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant. Il est présenté sous forme de liquide.

2°) - Souches vaccinales

Au Laboratoire National Vétérinaire de Boklélé, après étude de souches :

- . *Pasteurella multocida* 6 : B (origine Ethiopie-IEMVT N° B2)
- . *Pasteurella multocida* 6 : E (origine IEMVT N° E27)

ont été sélectionnées pour leurs caractères bactériologiques stables.

3°) - Constitution d'une banque de production

A partir des souches d'origine, faire deux générations :

G 1 : Lot de production lyophilisé

G 2 : Lot de semence lyophilisé

Les souches (G1 et G2) doivent impérativement se présenter

Au milieu solide en phase "F" lisse iridescente

Les bactéries des colonies "F" (fluorescentes) sont capsulées, virulentes et immunogènes.

Les souches peuvent, au cours de repiquages successifs, se dissocier et dériver vers les types "B" (bleu), "I" (intermédiaire) et même "R" (rough) et ainsi perdre leur immunogénité.

Au cas où une telle dégradation est constatée, on peut "récupérer" la phase iridescente soit :

- en réisolant directement la phase "F" à partir d'une gélose présentant, par exemple une dissociation "F", "B".
- par passage in vivo sur souris et bovin.

4°) - Définition du principe actif

Le principe actif est constitué de cultures totales en fermenteur industriel de *Pasteurella multocida* 5 : B ou 6 : E

En fin de fermentation, les cultures sont inactivées par formol (37°C - 12 jours). L'anaculture totale représente le principe actif.

5°) - Protocole général de culture de *Pasteurella multocida* en fermenteur

Exemple :

Première préculture

. Ensemencer 1 flacon G2 (lot de semence lyophilisé) dans 6 bouillons trypticase Soja pendant 24 heures à 37°C.

Contrôle de la première préculture

- . bactérioscopie : - état frais
- gram
- . bactériologie : bouillon et gélose trypticase Soja

Deuxième préculture

- . Sélectionner 3 bouillons trypticase Soja :

Culture pure, jeune, jeune (formes coccobacillaires à coloration bipolaire).

- . les ensemencer dans 3 ballons de 1 litre contenant 800 ml de bouillon trypticase Soja glucosé à 10'' avec montage 3 voies (1 event, 1 canne plongeante pour prise d'échantillon en fin de culture, 1 autre canne plongeante pour transfert 2ème passage).

- . incubation à 37°C pendant 24 heures.

Contrôle de la deuxième préculture

- . bactérioscopie : - état frais
- gram
- . bactériologie : bouillon et gélose trypticase Soja

Culture en préfermenteur

- . Choisir un des 3 ballons présentant la meilleure culture (pure, riche, forme coccobacillaire à coloration bipolaire)
- . transférer la culture du ballon choisi dans le préfermenteur par l'intermédiaire du montage de transfert
- . modalité de culture en préfermenteur
- . 37°C
- . agitation : 150 tours/minute
- . aération : 0,2 VVM (volume d'air/volume de milieu/minute)
- . pas de régulation de pH
- . temps de culture : 7-8 heures
- . Contrôler la culture en préfermenteur par (état frais et gram)

Si les contrôles bactérioscopiques de la culture en préfermenteur sont satisfaisant, transférer le préfermenteur dans le fermenteur

- . modalité de culture en fermenteur
- température : 37°C
- agitation : 150 tours/minute
- régulation pH : 7,2 avec NaOH 5 N
- la régulation du pH commence après 5-6 heures de culture environ
- aération : 0,2 VVM air comprimé
- temps de culture : 16 à 18 heures
- arrêt, si possible, au maximum de croissance

Prise d'échantillon dans le fermenteur pour contrôles

- contrôle bactérioscopique (état frais, gram)
- contrôle bactériologique :
 - . culture pure
 - . absence de contaminants
 - . API 20 NE : identification *Pasteurella multocida*
- contrôle opacimétrique

Formolisation de la culture

- . Additionner directement dans le fermenteur 6% de formol du commerce (35-37 %), puis agitation à 100 tours/minute pendant 30 minutes.

Remplissage de la culture

- En flacons de 17 litres ou en fûts inox de 50 litres
- Les récipients de récolte sont alors placés dans une chambre d'eau à 37°C

Inactivation de la culture

- 12 jours à 37°C : on obtient une maculture

Contrôle de l'amaculture en fin d'inactivation

Contrôle bactériologique

absence de culture sur :

milieux aérobies

- . bouillon tryptase soja 37°C
- . gélose tryptase soja 37°C

milieux anaérobies

- . bouillon caséoglycolate 37°C
- . gélose Columbia au sang en jarre anaérobie 37°C

milieu pour recherche de contaminants fongiques :

- . gélose sabouraud à 25°C
- . milieu sabouraud à 25°C

Contrôle d'innocuité

- 5 souris de 17-22 g sont inoculées par la voie sous-cutanée avec 0,5 ml d'anaculture.

- pas de réaction locale ou générale après 14 jours d'observation.

On obtient ainsi une anaculture (principe actif) de *Pasteurella multocida* contrôlée.

Préparation du vaccin final

- Anaculture totale de *Pasteurella multocida* 6 : B ou 6 : E (diluée en sérum physiologique formolée à 6% pour obtenir une opacité correspondant au tube N°10 de l'échelle de BROWN)

- Hydroxyde d'alumine 10%.

Repartition finale

Répartition automatique en flacons de 250 ml de polypropylène (coul. pénicilline et bouchon perforable).

Un dernier contrôle bactériologique, biochimique, d'innocuité et d'efficacité est effectuée sur le vaccin avant qu'il ne soit déclaré satisfaisant.

23 MAI 1989

Visite générale de L'ANAVET et de la zone des fermenteurs.

Le Laboratoire National Vétérinaire de Boklè-Garcua dispose :

- de 5 fermenteurs de 3 à 400 litres
- de 2 lyophilisateurs industriels

Cet équipement leur permet de produire à grande échelle.

III - PRODUCTION ET CONTRÔLE DE QUALITÉ DES VACCINS CONTRE LA BRUCELLOSE

Par le Dr. Mamady KONTE).

La prophylaxie médicale antibrucellique dispose de deux groupes de vaccins

majeurs "admis" sur le plan international :

- des vaccins vivants : vaccin B 19
vaccin Rev. 1
- des vaccins inactivés : Vaccin H 38
Vaccin 45/20

C - VACCIN B 19

La méthode de production évoquée est celle de l'institut de microbiologie vétérinaire Pendik/Istanbul en Turquie, un des centres FAO/OMS de référence de la Brucellose.

Le vaccin est produit à grande échelle à l'aide de fermenteurs évitant ainsi la manipulation fastidieuse et coûteuse de nombreuses boîtes de Ruix.

Production

La souche *Brucella abortus* B 19 est utilisée dans la production de ce vaccin.

Contrôle de qualité

Deux tests sont essentiellement effectués :

- Test de pureté
- Immunité et virulence

Le vaccin B 19 est un vaccin vivant de virulence atténuée, lyophilisé, contenant au moins 60.10^9 germes vivants smooth par dose vaccinale.

D - VACCIN RLV.1

Ce vaccin est fabriqué selon une méthodologie identique à la première.

E - VACCIN H38

Il est composé d'une suspension de *Brucella melitensis*, souche 53 H 38 inactivée par le formol à 4 p 1000 en excipient huileux lentement résorbable.

Les bactéries ont une constitution normale (colonies smooth). Pouvoir immunogène maximale, grâce à une concentration élevée (450.10^9 germes par dose vaccinale chez les bovins) et à l'emploi d'un adjuvant.

F - VACCIN 45/20

C'est une suspension de *B. abortus* souche 45/20, tuée par le formol, en adjuvant huileux.

Quelques vaccins mineurs produits avec *B. ovis* et *B. suis* sont également signalés.

Prophylaxie sanitaire

Elle repose essentiellement sur le dépistage des contaminés cliniquement atteints ou non, l'élimination immédiate des malades à forme "ouverte" de maladie (avortement), l'élimination progressive des autres infectés vers l'abattoir.

Recommandation du Dr. KONTE

Il demande la vaccination des troupeaux assez peu infectés avec le vaccin B 19 et d'utiliser le H38 dans les troupeaux positifs (50 à 60 %) sans distinction. Pour une éradication de la maladie le Dr. KONTE propose de vacciner chaque année les veaux âgés de 6 à 8 mois, une seule fois avec le vaccin *Brucella abortus* Souche 19 titrant 6 à 8. 10^{10} germes vivants par dose vaccinale.

Il sera ainsi créé un matelas immunitaire, s'élargissant d'année en année, pendant que l'infection entretenue par les adultes disparaît progressivement avec eux, et au bout de 15 ans au plus la brucellose bovine aura été éradiquée.

23 MAI 1989

IV - PRODUCTION ET CONTROLE DE QUALITE DES VACCINS CONTRE LE CHOLERA ET LA SALMONELLOSE AVIAIRE

G - CHOLERA AVIAIRE - DEFINITION

C'est une suspension constituée de culture totale de *Pasteurella multocida*

type 5 : A et 8 : A, inactivée par le formol et contenant de l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant (10 %)

La souche vaccinale du Laboratoire National Vétérinaire de Boblé provient de l'IEMVT.

La méthodologie de fabrication est celle de la Pasteurellose bovine citée plus haut.

H - SALMONELLOSE - DEFINITION

C'est un vaccin constitué de culture totale de *Salmonella gallinarum-pollorum* et *Salmonella typhimurium*, inactivé par le formol, adjuvé par l'hydroxyde d'Alumine (10 %)

Souche vaccinale

Salmonella pullorum-gallinarum - origine (IEMVT)

Salmonella typhimurium (origine Ecole Vét. Toulouse)

Fabrication et contrôle

Identique à celle du choléra aviaire

25-26 MAI 1989

V - VISITE DE LA STATION ZOOTECHNIQUE DE LOUGGUERE

- Présentation des problèmes sanitaires par le Directeur de la Station
- Exposé du Dr. TULASNE sur une enquête épidémiologique effectuée par le LANAVET sur la tuberculose bovine.

REMERCIEMENT

Motion de remercier nos participants aux autorités politiques, administratives du Cameroun, le Directeur du LANAVET, à la F.A.O. et à ses experts qui nous ont reçu dans une semaine d'attente.

CONCLUSION

Le séminaire sur la production et le contrôle de qualité des vaccins bactériens, tenu à Garoua du 25-de-mars-1989, nous a permis d'échanger nos expériences et d'enrichir nos connaissances en la matière.

Nous remercions très satisfait et tenons à remercier la FAO et tous les experts qui nous ont encadré.

Ce grand rendez-vous du "donner et recevoir" nous permet d'harmoniser nos protocoles opératoires, pour une meilleure maîtrise des techniques de production des vaccins bactériens. Cette réunion nous a aussi donné l'occasion d'apprécier l'immense effort fourni par le Gouvernement du Cameroun, pour mettre à la disposition des techniciens, le Laboratoire National Vétérinaire de Boule (LANAVET) dont la conception, l'organisation et la réalisation sont à la hauteur du progrès.

Je ne peux conclure sans remercier vivement le Chef du Service de la Production des vaccins (IN RV) le Directeur du Laboratoire National de l'Elevage et la Direction générale de l'ISRA qui ont offert l'occasion de participer à ce grand rendez-vous du "donner et recevoir" qui s'organise sous l'égide de la FAO, pour l'harmonisation des protocoles de fabrication des vaccins vétérinaires.

- Ci-joint : List de participants

P A Y S	NOM ET PRENOMS	F O N C T I O N	<u>ADRESSE</u> (avec si possible téléphone et telex éventuellement)
ZAIRE	Dr. EGALA NZENZE	Médecin Vétérinaire Chef de Service Production vaccins bactériens	Laboratoire Vétérinaire B.P. 8842 <u>KINSHASA/GOMBE</u> Z a i r e
MALI	Dr. DIALLO BOUBACAR	Chef Section vaccins bactériens	Laboratoire Central Vétérinaire B.P. 2295 Tel. 22-33-44 <u>BAKAO</u> Mali) Telex 23 15
NIGER	Dr. BAARE CATHERINE	Chef de Service de Production vaccins bactériens	Laboratoire Central d'Elevage B.P. 485 (LABOCEL) <u>NIAMEY</u> (Niger)
SENEGAL	Mt. ALICUNE BADARA MBENGUE	Technicien Supérieur	Laboratoire National de Diagnostic et de Recherche Vétérinaires DAKAR-HAÏF B.P. 1000 Tel. 32-12-13
GUINEE	Dr. DIALLO HAMADOU BOYE	Chef Service Production vaccins	Laboratoire de Recherche vaccins GAO Guinée, Tel. 11-11-11

P A Y S	NOM ET PRENOMS	F O N C T I O N	ADRESSE : (avec si possible ad- telex éventuelle ent.)
MADAGASCAR	Dr. RAKOTOBE née FATOU	Chef de Laboratoire de Bactériologie	Département des Recherches Zoono- tiques et Vétérinaires B.P. 4 ALEXANDRIANOMB ANTANANARIVO 101 (Madagascar)
TCHAD	Mr. MOYALHAYE NANDOUMANGAR	Chef de Service de Bactériologie-Prod	Laboratoire de Recherches Vétéri- naires et Zootechniques de ARTHA B.P. 433 N'DJAMENA Tel. : 51-74- 51-24-7
COTE-D'IVOIRE	Mr. BONI YAPO FRANÇOIS	Assistant du Chef de Service de Production de vaccins	Laboratoire de Pathologie Animale B.P. 206 BINGERVILLE Tel. 30-37- 0-37
CAMEROUN	Mme NYERANGO LIU QJ	Quality Controller of Vaccines	Laboratoire National de Contrôle de Bokiné B.P. 503 GAROUA - CAMEROUN Tel : 27-13-05 , 27-15-43
<u>CONSULTANTS</u> :	Dr. TUIASNE	Chef Département Bactériologie	Laboratoire National Vétérinaire de Bokiné B.P. 503 GAROUA - CAMEROUN Tel. : 27-13-05 , 27-15-43
<u>CONSULTANTS</u> :	Dr. MAMADI KONTE	Chef de Service de Bactériologie	IN E R V B.P. 2037 DAKAR-SEN Tel 32-12-75