

210000 993

OK

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

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

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

DAKAR - HANN

TECHNIQUE DE PRODUCTION DE VACCIN ANTI-APHTEUX
UTILISEE AU LABORATOIRE DE DEBRE ZEIT - ETHIOPIE

STAGE FAO SUR LA PRODUCTION DE VACCINS
DAKAR, DU 17 OCTOBRE AU 5 NOVEMBRE 1983

Par Y. LEFORBAN

REF. N° 76/VIRO.
OCTOBRE 1983.

Lorsque l'on fait la trypsination des 10 ou 12 FR, chaque bouteille est traitée individuellement et les cellules recueillies à partir d'un flacon sont réparties dans 2 flacons de 1 litre de milieu complet (milieu avec les sels de HKS supplémenté + antibiotiques + 5 % de sérum de veau). Un litre de cellules servira à faire 6 flacons roulants. (1 FR est donc multiplié par 12). On a donc dans chaque flacon $\frac{1\ 000}{6}$ 170 ml de solution cellulaire.

Chaque FR est numéroté de manière à repérer les bouteilles de la même origine en cas de contamination.

B - PRODUCTION VIRALE

1 - Choix des types et des souches

En l'absence d'isolement des types SAT et ASIA, nous produisons le vaccin uniquement contre les 3 types européens O, A et C.

Les souches de production sont des souches éthiopiennes qui ont été isolées dans ce Laboratoire. (Le Laboratoire ne détient d'ailleurs aucune souche vivante provenant de l'étranger).

Le choix des souches vaccinales tient compte de l'étude sérologique des souches éthiopiennes qui a été effectuée. La souche choisie pour un type doit protéger contre le maximum de souches locales de même type. Le choix se portera donc sur les souches qui ont le plus de points communs avec les autres souches sauvages prévalentes.

Le choix est également fonction de leur plus ou moins grande facilité de multiplication sur le substrat cellulaire utilisé (IERS₂).

Au cours de l'année 1979 - 1980, les souches utilisées ont été :

- O 149 (Debré-Zeit) isolée en octobre 1977
- A 110 (Gafarsa) isolée en novembre 1974
- C 54 (Assella Cadu) isolée en juillet 1972.

2 - Nombre de passages

De manière à avoir le moins possible d'altération antigénique des souches, nous limitons le nombre des passages à 5 c'est-à-dire que le passage de production correspond au maximum au 5^e passage du virus.

3 - Préparation de l'inoculum viral

Le stock production virus c'est-à-dire P₃ ou P₄ doit être conservé à - 70°C. Ce stock devra être constitué en début d'année et contrôlé du point de vue :

- stérilité $\begin{cases} \text{Sabouraud} \\ \text{VF} \\ \text{Tryptose sérum} \end{cases}$
- pureté : Typage en fixation du complément
- titre : en fixation du complément et sur cellule.

Ces différents paramètres se maintiendront constants à la température de - 70°C pendant 1 an et il ne sera donc pas nécessaire de les vérifier pour chaque lot. Un bon inoculum doit remplir les conditions suivantes :

- titre en FC $> \frac{1}{8}$
- titre sur cellule IBRS₂ 10⁶ DCP 50/ml
- destruction complète du tapis en 15 à 17 h.

Dans le cas où une conservation de stock virus ne serait pas possible à - 70°C, il nous paraît préférable de préparer un nouvel inoculum pour chaque lot de production. Cet inoculum devra être préparé quelques jours à l'avance et stocké à -30°C de manière à avoir le temps d'effectuer les contrôles (stérilité, pureté, titre).

4 - Production de virus vaccinal proprement dit

Chaque FR ayant un tapis cellulaire complet (ce qui correspond à J18 ou J19 c'est-à-dire 4 à 5 jours après la trypsination) est inoculé avec 60 ml de virus dilué au $\frac{1}{100}$ dans du HKS virus (cf. annexa 1).

Le milieu Hanks virus est préparé dans les mêmes conditions que le Hanks cellules et réparti dans des flacons plasma de 1 litre remplis à 900 ml, la stérilité est contrôlée et les antibiotiques sont rajoutés au moment de l'emploi, en même temps que l'inoculum viral; comme pour la production cellulaire, les antifongiques ne sont pas utilisés en routine.

Chaque flacon de 900 ml reçoit 9 ml d'inoculum viral et servira à inoculer 15 FR (60 ml d'inoculum viral dilué au $\frac{1}{100}$ par flacon).

On procédera au changement du bouchon de chaque FR juste après avoir vidé le vieux milieu de culture.

Aussitôt après leur inoculation, les FR sont replacés sur le roller.

La récolte se fait entre la 14^{ème} et 17^{ème} h. après l'inoculation. L'inoculation devra donc être faite le soir entre 16 h et 18 h et la récolte le lendemain matin entre 8 et 10 heures.

La destruction cellulaire doit être complète et la récolte consiste à verser le contenu de chaque flacon (débris cellulaires + virus) dans un récipient de 10 litres muni d'un barreau magnétique préalablement refroidi à - 20°C.

Cette récolte doit être faite rapidement et le récipient contenant le virus vaccinal doit être placé dans la glace fondante,

Noter le pH de la récolte

Faire une prise d'échantillon 20 à 50 ml pour :

- contrôle du type
- contrôle de stérilité
- titrage + infectieux
- + fixation du complément.

.../...

C - TRANSFORMATION EN VACCIN

a) Etude analytique

J19 Aussitôt après la récolte, chloroformer à 7 p.1000 (7ml de chloroforme par litre de virus brut soit 42 ml pour 6 litres correspondant à 100 flacons roulants).

Mettre en agitation à + 4°C pendant 24 heures.

Pratiquement, on peut laisser le ballon dans le bain de glace fondante jusqu'au soir sous agitation. Le ballon est placé au réfrigérateur également sous agitation, seulement le soir. Ceci permet de maintenir le virus à une température plus basse que lorsqu'il est mis directement au réfrigérateur le matin après la récolte.

J20 Centrifuger à 1 500, 2 000 t/mm pendant 15 minutes.

Pour cette centrifugation, nous utilisons jusqu'à présent la centrifugeuse réfrigérée Jouan K63F équipée de 4 pots de 750 ml.

Les pots doivent être parfaitement équilibrés avec une balance Poberval en double pesée sous peine d'avoir des vibrations très importantes qui endommagent la centrifugeuse,

Les pots sont munis d'un couvercle que nous n'utilisons pas, car nous trouvons plus pratique de recouvrir les pots de papier d'aluminium ou de papier ordinaire ligaturés par une ficelle. Chaque pot est rempli au maximum à 650 ml. La mesure est faite avec un flacon plasma. Un portoir en bols pour les pots serait très utile,

Avant leur utilisation, les pots sont stérilisés ainsi que la partie métallique qui les contient. On dispose une fine couche de coton au fond de cette partie métallique, ce qui favorise la préhension du pot.

Dans l'avenir et en particulier si l'on veut produire plus de vaccin, il faudra envisager une centrifugation en continu.

Après centrifugation, refaire une prise d'échantillon pour contrôles (les mêmes qu'avant chloroforme).

Le virus avant et après centrifugation est conservé dans la glace fondante. Après centrifugation, le virus est mis dans un ballon muni d'un siphon. Ajouter l'hydroxyde d'alumine = 119 ml d'hydroxyde d'alumine à 3 p.100 de matière sèche par litre de virus clarifié et centrifuge (714 ml pour 6 litres).

Agiter pendant 1/2 H à 1 H à + 4°C et laisser décanter jusqu'au lendemain matin.

Le pH de l'hydroxyde d'alumine après sa stérilisation est entre 5 et 6, Nous procédons à son alcalinisation (pH 7,5) avec une solution de bicarbonate à 7,5 % stérile, juste avant son mélange avec le virus,

L'hydroxyde d'alumine que nous utilisons est fournie jusqu'à présent par le Laboratoire ROGER BELLON. (cf. annexe IV - préparation de l'hydroxyde d'alumine).

J21 Concentration du vaccin. Cette opération a essentiellement pour but de diminuer le volume de la dose vaccinale.

Reprendre le ballon contenant virus et l'hydroxyde d'alumine en ayant grand soin de ne pas l'agiter.

Brancher le siphon sur un by pass équipé de 2 bouteilles plasma de 1 litre (le même que celui utilisé pour la filtration de milieu).

Une partie du surnageant est soutirée de manière à réduire le volume total de moitié.

Cette opération est effectuée avec une pompe électrique aspirante.

Type AL 17

Fabricant : KURT NEUBERGER, 42, Rue de Mu!
68303 - SAINT-LOUIS (France)

L'intensité de l'aspiration ne doit pas être trop forte pour ne pas créer de turbulences dans le ballon qui risqueraient de remélanger l'alumine sédimentée.

Pour une production de 100 flacons roulants, le volume est ramené à 2 860 ml ; on soutire donc : $6\ 000 + 714 + 42 = 2\ 860 = 3\ 900$ ml.

Ajouter la saponine au virus concentré : 70 ml d'une solution à 17 p.1000 pour la quantité ci-dessus (annexe XI).

Formoler à 0,3 p.1000 de formaldéhyde pur. Le formol du commerce titre entre 35 et 40 % de formaldéhyde (cf. annexe V - titrage du formol).
II faut donc calculer la quantité de formol du commerce à ajouter.

Exemple : si le formol du commerce titre 35 % de formaldéhyde pur X représente le volume en ml à ajouter (ce volume étant dilué dans 60 ml d'eau distillée).

$$\frac{0,3}{1000} = \frac{35}{100} \times \frac{X}{2869 + 60 + 70} = \frac{35 \times X}{2990 \times 100}$$

$$X = \frac{2990 \times 0,3 \times 100}{1000 \times 35} = 256,2 \text{ ml}$$

II faut donc ajouter 2,56 ml de formol du commerce qu'on dilue au préalable dans 60 ml d'eau distillée.

On obtient ainsi une concentration finale en formaldéhyde pur de 0,3 p.1000.

Mettre en inactivation sous agitation magnétique au bain-marie à 30° pendant 36 heures exactement.

Pratiquement, le vaccin est mis en inactivation dans la matinée (J21) et celle-ci est arrêtée le lendemain soir (J22) par mise au réfrigérateur.

J23 Ajuster le pH à 8,2 - 8,3 avec du tampon glycolle (cf annexe VII).
Répartir en flacons de 1 litre. Etiqueter.

b) Schéma récapitulatif

J19	Virus vaccinal brut	5 000 ml
	↓ clarification + 42 ml de chloroforme	
J20	Virus clarifié	6 042 ml
	↓ 714 d'Al (OH) 3'	
J21	Virus aluminé	6 756 ml
	concentration soutirer 3 900 ml	
J22	Virus concentré	2 860 ml
	↓ ajouter 60 ml de formol et 70 ml de saponine	

.../...

	↓ Vi rus i nacti vé ajuster le pH 10 à 15 ml de glycocolle	2 990 ml
J23	Vaccin fini	3 000 ml soit 1 800 doses monovalentes.

CONTROLES

1 - Stridri li té bactériologique

En plus des contrôles effectués sur la semence et le virus vaccinal, un dernier contrôle est effectué sur la vaccin final.

Nous uti l isons en routine les mi l ieux suivants :

- gélose sérum ou tryptose sérum
- boui l lon ou thioqlycolate
- mi l i eu de Sabouraud.

Tous l es contrôles sont faits à 37° et 22°C (température du Labora-
toire). Tous les mi l ieux doivent rester stéri l es,

2 - Contrôles sérologiques

En cours de fabrication, on procède au typage et au titrage du virus par fixation du complément (technique KOLMER à 100 % d'hémolyse à chaud en tubes ou en mi cropl aque) sur la semence et sur l e vi rus vacci nal avant et après clarification par le chloroforme),

Pratiquement, les deux réactions typage et titrage sont faites en même temps. On procède comme pour le typage di rect d'un vi rus en uti l isant des dilutions différentes P $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, (annexe VI l - Titrage du vi rus en FC).

Il ne doit y avoi r aucune fixation avec les types di f férents et le virus doit fixer au moins jusqu'au $\frac{1}{8}$ è' avec le sérum de même type.

3 - Contrôle du titre infectieux

On procède au titrage sur tubes de cellules IBRS₂ (0,1 ml par tube, 5 tubes par di lution). On commence à la dilution 10⁻⁴ et on va jusqu'à 10⁻⁸.

La lecture se fait après 48 heures et le calcul du titre est effectué par la méthode de KARBEL.

Avec les souches utilisées, le titre minimal doit être entre 10^7 DCP 50 % /ml (cf. annexe VIII - Titrage du virus sur cellule).

4 - Inocuité

Il est préférable de n'effectuer ce contrôle qu'après un stockage de 15 jours au moins du vaccin à $+4^{\circ}\text{C}$ au réfrigérateur.

Il se fait sur souriceaux de 3-4 jours. Les souriceaux ne doivent être manipulés qu'avec des gants stériles (ne pas les toucher avec les mains nues).

Inoculer 2 portées avec le vaccin dilué au 1/2 dans du PBS, par voie IP à raison de 0,1 ml par souriceau.

Observer pendant 10 jours, En cas de mortalité, rechercher le virus dans le cerveau et le muscle.

Prélever muscle et cerveau (1 g) broyer avec un mélange de tampon véronal et de chloroforme (dilution 1/2). Décomplémenter 40 mn à 56° dans un flacon hermétiquement bouché. Ajouter 1 ml de tampon véronal. Centrifuger 23 mn à 3 000 t/mn. Recueillir le surnageant. Procéder comme pour un typage direct d'échantillon.

5 - Efficacité

Ce contrôle n'est effectué qu'après le contrôle d'inocuité sur souriceau, Ce contrôle est effectué sur bovin et il sert également de contrôle d'inocuité sur bovin.

a) Contrôle des anticorps après vaccination

Des bovins en bonne santé (5 à 10) et ayant 6-1-6 contrôlés au préalable comme n'ayant pas d'anticorps contre la F.A. (indice de séroneutralisation $\leq 0,3$) sont vaccinés sous la peau de l'encolure avec une dose normale de vaccin trivalent, 21 jours après la vaccination, les anticorps sont titrés par la technique de séroneutralisation (cf. annexe IX).

Une valence de vaccin est considérée comme acceptable quand elle donne un titre moyen de l'indice de SN $\geq 0,9$.

Selon les normes européennes, un tel vaccin devrait conférer une protection de l'ordre de 80 % des animaux.

Ces normes bien que non directement transposables aux conditions africaines, donnent cependant une idée assez précise de la valeur du vaccin.

b) Epreuve virulente

Cette épreuve doit être faite dans des conditions d'isolement strict des animaux.

PRINCIPE

Les bovins (animaux 1/2 sang taureaux exempts d'anticorps neutralisants ISN $\leq 0,3$) sont vaccinés avec une dose normale de vaccin trivalent et contrôlés 21 jours après avec une dose fixe de virus (10 000 DIB/50 %) par voie intradermo linguale (IDL).

On peut utiliser ces mêmes animaux pour le contrôle des anticorps 3 condition de prélever le sérum avant l'épreuve virulente.

Après un délai d'observation de 6 jours, les animaux sont abattus et les lésions notées.

- Présence ou absence d'aphtes primaires (lingaux)
- Présence ou absence d'aphtes secondaires (buccaux - podaux).

RÉALISATION

- On doit utiliser au minimum 3 animaux par valence (2 vaccinés et 1 contrôle).
- 21 jours après la vaccination, tranquiliser les animaux Rompun (BAYER) 1 ml de solution à 2 p.100 par 100 kg de poids vif.

.../...

■ 1%

Inoculer en IDL 10 000 DIB/50 % par bovin. Inoculer en 2 points de 0,1 ml (5 000 DIB/50 % par point) (voir annexe X ■ Préparation et titrage du virus d'épreuve sur bovin).

Il faut toujours inoculer en même temps au moins un bovin témoin non vacciné et dépourvu d'Ac neutralisant.

LECTURE DES RESULTATS

Elle se fait après 6 jours.

L é s i o n s linguales

- L'importance des lésions primaires de In langue est appréciée en divisant arbitrairement sa surface en 4 parties égales.

Lésions podales

- Laver les pieds au jet tous les jours.
- La lecture se fait au doigt en cherchant à rompre les aphtes éventuels entre les onglons et sur le bourrelet coronaire.

Lésions buccales

- Elles coexistent le plus souvent avec les lésions podales.

INTERPRETATION

Le critère de protection retenu est l'absence de lésions secondaires podales.

Les animaux protégés peuvent présenter des lésions primaires linguales.

ANNEXE I (F.A.)

MILIEUX DE HANKS

		Milieu de base			Hanks virus	
		5 l	10 l	20 l	10 l	5 l
NaCl	Chlorure de sodium.	40	83	160	80	40
Kci	Chlorure de potassium	2	4	8	4	2
MgSO ₄ (7H ₂ O)	Sulfate de magnésium.	1	2	4	2	1
CaCl ₂	Chlorure de calcium Anhydre (+ 2H ₂ O)	0,7 (0,93)	1,4 (1,85)	2,8 (3,70)	1,4 (1,85)	0,7 (0,93)
Na 2H PO ₄ 12H ₂ O	Phosphate disodique	0,75	1,5	3,0	1,5	0,75
KH ₂ PO ₄	Phosphate monopotassique	0,3	0,6	1,2	0,6	0,3
	Glucose anhydre	5	10	20	10	5
	Extrait de levure (DIFCO)	5	10	20	10	5
	Hydrolysate de lactalbumine (DIFCO)	25	50	100	50	25
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium	5	10	20	30	15
	Solution de Rouge de Phénol à 10 % (en ml)	0,75	1,5	3	1,5	0,75
	Eau distillée (en ml)	4 750	9 500	19 000	10 000	5 000

Le milieu est préparé en rajoutant à l'eau distillée les produits dans l'ordre indiqué.

Avant filtration, le pH est ajusté à 7 - 7,2 avec HCl $\frac{N}{T}$ et NaOH $\frac{N}{T}$.

Le milieu de base est filtré en flacons de 1 litre remplis à 950 ml de milieu.

Le Hanks virus est réparti en flacons de 1 litre remplis à 900 ml.

Après contrôle de stérilité : 24 h à 37°
48 h à 20°

Les flacons sont stockés à + 4°C, les antibiotiques sont ajoutés au moment de l'emploi.

PREPARATION D'UNE SOLUTION DE ROUGE DE PHENOL A 10 %

Rouge de phénol	10 g
NaOH $\frac{N}{I}$	30 ml (environ)
Eau distillée QSP	100 ml

Ajouter les produits dans l'ordre. Verser lentement la soude jusqu'à dissolution de la poudre.

Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

ANNEXE II (F.A.)

ANTIBIOTIQUES ET ANTIFONGIQUES

1 - PRINCIPES D'UTILISATION EN VIROLOGIE

- Travailler avec le moins d'antibiotiques et d'antifongiques possible.
- Lors de la congélation et à la décongélation des cellules, faire si possible deux ou trois passages sans antibiotique. S'il n'y a pas de contamination, on est alors sûr de la stérilité des cellules,
- Les antibiotiques et antifongiques sont utilisés uniquement à titre préventif. Ne jamais essayer de récupérer quelque chose de contaminé c'est l'échec certain.

2 - ANTIBIOTIQUES UTILISES EN ROUTINE

Pénicilline G	2 millions d'unités	4 million5 U
Streptomycine sulfate	1 g	2 g
Eau distillée	20 ml	40 ml

- Après dissolution, filtrer sur membrane millipore de 0,22 μ
- Répartir stérilement en flacon de 5 ml à raison de 2 ml par flacon.
- Congeler à -30°C .
- Au moment de l'emploi, décongeler et ajouter 2 ml par litre de milieu dont la stérilité a déjà été contrôlée.
- La concentration du milieu en antibiotique est donc de 200 u/ml pour la pénicilline, et 100 $\mu\text{g/ml}$ pour la streptomycine. Cette concentration est utilisable pour toutes les cellules et virus.

.../...

3 - ANTI BIOTIQUES ET ANTI FONGIQUES UTILISABLES

Antibiotiques	Concentrations recommandées	Concentrations extrêmes
Pénicilline	100 u/ml	10 - 1 000
Streptomycine	50 µg/ml	10 - 100
Néomycine	75 µg/ml	50 - 150
Bacitracine	50 µg/ml (10 µ/ml)	10 - 50 (5 - 20µ)
Colimycine	20 µg/ml	20 - 50
Oxacilline	20 µg/ml	10 - 200
Gentamycine	50 µg/ml	10 - 200
Polymyxine B	50 µg/ml	10 - 1 000
Kanamycine	100 µg/ml	10 - 1 000
Tétracycline	10 µg/ml	5 - 50
Chloram phénicol	5 µg/ml	1 - 20
Erythromycine	50 µg/ml	10 - 100
Oleandomycine	7 µg/ml	
Tylosine	10 µg/ml	1 - 10
Antifongiques		
Amphotéricine B (Fongizone)	3 - 5 µg/ml	1 - 50
Mycostatine (Nystatine)	50 u/ml	1 - 100

Tableau tiré en partie du livre : "Contamination in tissue Culture"
JORGEN FOCH Academic Press.

Pénicilline : ne pas l'utiliser dans le vaccin si des phénomènes de sensibilisation à cet antibiotique sont à craindre sur les animaux à vacciner. Préférer alors la Colimycine et la Néomycine. De tels phénomènes n'ont jamais été observés en Ethiopie.

ChloramPhénicol : ne jamais utiliser avec les cellules BHK 21.

Mycostatine : elle est insoluble dans l'eau, elle est soluble dans l'alcool à 90°.

Mettre la poudre en suspension dans 5 fois son poids d'alcool à 90°.

Laisser en contact 24 heures.

Après ce laps de temps, diluer cette suspension dans un soluté physiologique (PBS) et filtrer. L'adjonction d'alcool n'a pas d'incidence sur la croissance des cellules étant donné son extrême dilution finale,

Pratiquement, la Mycostatine que nous utilisons (flacon de 500 000 µ) est stérile ; lors de l'utilisation, nous la mélangeons avec 10 ml d'eau distillée stérile et obtenons ainsi une solution à 50 000 u/ml en concentration finale de 50 µ/ml.

La Mycostatine n'est pas utilisée en routine. On l'utilise seulement lorsqu'il existe un risque de contamination fongique, en particulier avec le Hanks virus dans la production du virus vaccinal.

ANNEXE IV (F.A.)

NORMES DU GEL D'ALUMINE

1 - NORMES PHYSICO-CHIMIQUES

- a) pH = entre 6,9 et 7,2
- b) Pourcentage de matibre sèche 1,4 à 3 % selon le procédé de fabrication
- c) Adsorption = mg adsorbé par 100 mg d'Al₂O₃
 - Pouge Congo 33
 - Protéine (BSA) 56
- d) Sédimentation pour un gel à 2 % de matière sèche = phase gel en pourcentage.

0 heure	100
10 heures	75 - 80
20 heures	63 - 66
30 heures	55 - 58
40 heures	52 - 55
50 heures	52
60 heures	52

2 - NORMES BIOLOGIQUES

Le gel d'alumine doit adsorbé au moins 2 fois la quantité le virus employée pour le vaccin.

Pour tester cette capacité d'adsorption, on mélange une quantité fixe de virus aphteux à des quantités variables d'hydroxyde d'alumine et on recherche le virus dans le surnageant par fixation du complément ou sur culture de cellules (titrage du surnageant).

3 - INSTITUTS SUSCEPTIBLES DE FOURNIR L'HYDROXYDE D'ALUMINE

- BAIF

BRIAHNAGAR, OFF POONA - NAGAR Road
Post Box n° 1
WAGHOLI POONA 412 207
MAHARASHTRA - INDIA

- Laboratoire ROGER BELLON (S.A.)
159, Avenue du Poule
92 NEUILLY-SUR-SEINE (France)

- SUPER FOS Export Company
(Mr Niels Neergaard)
15 AMALI EGADÉ

ANNEXE VI (F.A.)

PREPARAT ION DU TAMPON GLYCOCOLLE

Soude (NaOH)	50 g
Nac l	104 g
Glycocolle	158 g
Eau distillée qsp	1 000 ml

Filtrer sur EKS II et repartir en petits flacons de 20 ml. Conserver à $3 \pm 4^{\circ}\text{C}$.

Le tampon glycocolle sert à ajuster le pH du vaccin fini à $8,2 - 8,3$ (5 ml par litre environ).

II sert également à alcaliniser le gel d'alumine avant et après sa stérilisation (pH $9 - 9,4$).

ANNEXE X (MARTEL J.L.)

PREPARATION D'UNE SOUCHE D'EPREUVE

- PASSAGE DU VIRUS APHTEUX SUR BOVINS

A - PREPARATION DE L'INOCULUM

On doit disposer d'aphtes (en général il s'agit d'aphtes bovins prélevés dans un foyer de fièvre aphteuse) que l'on conserve au congélateur.

Peser les aphtes pour préparer une dilution au 1/50 en tampon phosphate pH 7,6 : découper les aphtes aux ciseaux, puis broyer au mortier. Centrifuger 10 mn à 3 000 tours/mn en centrifugeuse réfrigérée.

Le surnageant constitue l'inoculum.

B - LES BOVINS

Utiliser si possible des animaux demi-sang taurins. Ces animaux doivent être préalablement triés sérologiquement : ils ne doivent pas présenter d'anticorps antiaphteux (log SNC inférieur à 0,30).

C - INOCULATION

1 - Tranquilliser au Rompun (N.D. BAYER)

Injecter par voie intra-musculaire 1 ml de la solution à 2 % pour 100 kg de poids vif.

A cette dose, le Rompun est sédatif et myorelaxant.

Les animaux se couchent spontanément en 15 - 20 mn et l'extériorisation de la langue est très aisée.

2 - Inoculation intradermolinguale en points rapprochés sur toute la surface de la langue jusqu'à 20 - 25 ml d'inoculum. Seringue à usage unique type tuberculine ou insuline (1 ml) aiguille courte : 25 - 51/100 mm. Biseau vers le haut.

D - PRISE DE TEMPERATURE (facultative) toutes les 6 heures:

(Désinfecter le thermomètre dans l'eau de Javel à 10 %).

.../...

E - RECOLTE DES APHTES

Entre 24 et 26 heures après l'inoculation, par arrachage à la main de la muqueuse linguale (après avoir tranquilisé ou abattu l'animal),

Les aphtes sont placés dans un pot stérile immergé dans la glace fondante jusqu'au moment de leur congélation (conserver si possible à -80°C).

Un prélèvement est effectué pour contrôle par fixation du complément.

N.B. - Les manipulations des animaux doivent être faites stérilement (vêtements de travail, gants de caoutchouc stériles), Les bottes sont passées dans de la soude 3 10 g/litre.

Il est intéressant de noter le moment de la généralisation podale mais on abattra ensuite les animaux le plus tôt possible car ils représentent une source importante de virus très actif.

- 'TITRAGE DU VIRUS APHTEUX' SUR BOVINS -

A) Les bovins

Il faut au moins deux animaux, si possible demi-sang taurins, exempts d'anticorps (log SNC inférieur à 0,30).

B) Dilutions

On fait en général des dilutions en puissance de 10 à partir de la dilution initiale (il s'agit en général de l'extrait d'aphte au 1/10).

On utilise une pipette par dilution : la pipette mélange et mesure une seule dilution.

Les dilutions sont placées dans la glace jusqu'au moment de l'inoculation.

C) L'inoculation

If Tranquilliser au Rompun : 1 ml de la solution à 2 % Par 100 kg de Poids vif (~~voie intramusculaire~~).

2) On peut inoculer 3 dilutions (4 au maximum) par langue à raison de 5 points de 0,1 ml chacun par dilution par voie strictement intradermique.

On commence l'inoculation par la plus haute dilution en allant de la protubérance de la langue vers la pointe.

Exemple de titrage sur deux langues de bovins :

10^{-7}	10^{-6}
10^{-6}	10^{-5}
10^{-5}	10^{-4}
10^{-4}	10^{-3}

D) La lecture est faite 24 à 36 heures après l'inoculation après injection de Rompun ou abattage des animaux.

"Si l'on attend plus longtemps, la précision de la lecture est moins bonne, car il y a confluence des aphtes."

E) Calcul du titre

Par la méthode des totaux cumulatifs, on calcule le pourcentage des résultats positifs obtenus pour chaque dilution.

A partir de ces résultats, on détermine la dose infectieuse 50 % par la méthode graphique sur papier millimétré.