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

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

B.P. 2057
DAKAR/HANN

ZV0000928

SEMINAIRE F.A.O.

SUR LA PRODUCTION DES VACCINS BACTERIENNES

GAROUA : 22-24 MAI 1989

PRODUCTION ET CONTROLE DE QUALITE DU VACCIN CONTRE LE CHOLERA-AVIAIRE

Par

Dr. Mamady KONTE

L.N.E.R.V. - DAKAR/HANN - SENEGAL

REF. N° 024 /BACTERIO.

MAI 1989

I - GENERALITES.

Comme tous les autres vaccins contre les Pasteurelloses animales, **le "Cholavil"** ou vaccin contre **le Choléra aviaire** est fabriqué au LNERV depuis 1965 à l'aide de l'appareil de Sterne (Structure, montage et fonctionnement donnés en annexes). I1 s'agit en fait d'un fermenteur dépourvu de régulateur thermique (37°C) que l'on place dans une chambre-étuve, et qui permet d'obtenir, en milieu liquide, des cultures extrêmement denses, cette richesse en germe étant due :

- à l'utilisation de digestat de pancréas dans le milieu (apport d'acides nucléiques),
- à une aération constante,
- à l'apport régulier de milieu neuf au moment où la culture est en phase de croissance logarithmique.

La densité de ce produit doit êtreramenéeaux normes requises pour présenter un nombre minimum de germes c'est à dire à une densité optique égale au tube n° 10 de Brown avant adjonction d'aldéhyde formique et répartition en ampoules.

Le vaccin inactivé contre **le Choléra aviaire** préparée en LNERV est un vaccin liquide en ampoule constitué par une culture totaleetconcentrée de **Pasteurella multocida** types A, inactivé par addition de formol à 3 p.1000.

II - PRODUCTION DU VACCIN CONTRE LE CHOLERA AVIAIRE.

A - Milieu de culture et de production.

1°) Composition.

Pour 10 litres d'eau portée à 60°C (meilleure dissolution des ingrédients et filtration plus rapide).

- Extrait de viande Liebig	90 g
- Bacto-Peptone Difco (ou Peptone équivalente)	100 g
- Chlorure de sodium	50 g
- Digestat papaïnique de pancréas	1.250 ml
- Glucose	20 g
- Lactate de soude	35 ml
- Phosphate monosodique	30 g

Le P^H est ajusté à 7,5 - 7.8.

2°) **Préparation du digestat papaïnique de pancréas.**

400 g de pancréas de bœuf, recueilli à l'abattoir, dégraissé et haché, sont mélangés à 1.500 ml d'eau distillée portée à 50°C, en présence de 5 g de papaïne. En une heure, la température est élevée à 70 °C (bain-marie). La digestion est alors arrêtée en augmentant la température à 86 °C en quelques minutes. Le produit de la digestion est recueilli après filtration sur papier. Ce digestat acide peut être conservé à -20°C.

L'autodigestat originel de Sterne, nécessitant des opérations beaucoup plus longues, a été abandonné.

3°) **Filtration**

Elle s'effectue par filtration sur **filtre SEITZ** de 10 litres pourvu d'une membrane **EKS-1.** Afin de faciliter cette opération, il y a intérêt à procéder à une clarification préalable sur un autre filtre **SEITZ** de 10 litres pourvu d'une membrane **AS.**

Le milieu filtré et réparti dans des facons de Woolf de 10 litres sera éprouvé pendant 24 h.

B - **Préparation de l'inoculum.**

1°) **Choix et entretien des souches.**

Le choix du sérotype de **Pasteurella multocida** à utiliser est imposé par l'affection à combattre et l'espèce animale.. Ainsi, pour vacciner la volaille contre le Choléra aviaire, le sérotype A (selon la classification de Carter, voir annexe) sera utilisé ; le sérotype D, ubiquiste aussi mais moins important, peut lui être combiné ou non.

Les souches sont conservées lyophilisées, en évitant rigoureusement les passages inutiles sur milieux artificiels. On lyophilisera ainsi une culture iridescente sur gélose tryptose sérum récoltée en eau peptoncé et diluée au 1/3 dans du sérum de bœuf, ou du sang virulent.

La souche de **P. multocida** utilisée dans la préparation du vaccin, doit tuer la souris.

2°) L'inoculum : La souche lyophilisée est remise en suspension pour ensemencer une boîte de Pétri en vue d'un réisolement en même temps qu'un contrôle de pureté. Les colonies typiques serviront à l'ensemencement de 6 tubes de gelose-sérum en pente, distinées à ensemencer l'inoculum..

Au LNERV, l'inoculum est contenu dans un **Erlen-Meyer** de 2 litres à la base duquel a été soudée une tubulure d'environ 6 cm (en remplacement des flacons de **Kitasato** plus contraignants, utilisés auparavant).

Chaque **Erlen-Meyer** contient au moins 1 litre de milieu filtré.

L'inoculum est utilisé 6 à 8 heures après son ensemencement avec environ 60 ml de culture en tubes (6 tubes).

C - Ensemencement et mise en route de la culture.

1°) Introduction de l'inoculum et début de la culture.

L'appareil sorti de l'autoclave est placé dans la chambre-étuve et préparé. L'inoculum est versé dans la colonne. Puis 2 litres de milieu sont alors introduits, deux titres de milieu et 1 litre d'inoculum sont alors présents dans l'appareil.

Après 3 heures de culture non aérée, 2 à 3 ml d'antimousse sont alors introduits ou la flamme et l'aération est mise en route.

3 heures plus tard, ou laisse les 8 litres de milieu restant dans le flacon de Woolf s'écouler dans l'appareil. Cette mise en route, par étapes de la culture assure une densité optique maximum.

2°) Première récolte et récoltes ultérieures.

Au bout de 6 heures, la culture a atteint son développement maximum. La récolte est alors effectuée sous la flamme, le produit étant reçu dans un ballon de 10 litres stérile.. La récolte s'arrête lorsque l'appareil ne contient plus qu'un litre de culture. Le volume restant permettra l'ensemencement de l'apport nouveau de milieu neuf. Un test de pureté pour coloration de Gram permet de vérifier que la récolte n'est pas contaminée.

La récolte est formolée immédiatement à 3 p.1000, en prenant la précaution de ne pas dépasser ce taux au risque de tuer les sujets vaccinés.

Du milieu neuf est de nouveau introduit dans l'appareil. 10 ml d'antimousse stérile sont amenés par l'allonge, et la série des opérations précédemment décrites est répétée dans le même ordre chronologique.

D - Résultats de production et conditions d'utilisation.

10 litres de culture permettent de fabriquer 20 litres de vaccins.

Le conditionnement est effectué en ampoules de 10 ml correspondant à 10 doses pour le jeune poulet de 6 semaines (soit 1 ml), 5 doses pour poulet adulte et canard (2 ml), 2 doses pour l'oie et le dindon adulte (5 ml).

Pour obtenir une bonne immunité, il est conseillé de renouveler la vaccination 10 jours après la première injection, par voie intramusculaire au bréchet.

Ne pas vacciner avant 6 semaines et faire un rappel tous les 6 mois en cas de menaces.

III - CONTROLE DE QUALITE DU VACCIN CONTRE LE CHOLERA AVIAIRE.

Les contrôles sont à effectuer sur la suspension vaccinale formolées.

A - Stérilité.

Ensemencer en bouillon ordinaire, en bouillon viande-foie anaérobie, sur gélose tryptose.

Observation pendant3 à4 jours. Aucuneculturenedoitêtreobservée.

N.B. : Les principales causes de contamination de l'appareil de Sterne sont : inoculum souillé, milieu neuf souillé, manque d'antimousse, culture refoulée par les orifices supérieurs, contamination au niveau du branchement tubes de jonction rodés mâle-femelle.

B - Innocuité.

Inoculer 2 ml sous la peau d'un lapin qui sera mis en observation pendant une semaine. Aucun trouble ne doit être observé.

C - Immunité.

Des sujets de 6 semaines ayant reçu 2 injections du vaccin à 10 jours d'intervalle, sont mis en présence de sujets atteints de choléra aviaire expérimental 7 semaines après la 2ème injection.

ANNEXE 1.

L'APPAREIL DE STERNE.

1 - DESCRIPTION DE L'APPAREIL.

I1 est essentiellement constitué par une colonne de verre Pyrex (Verrerie générale : 39 rue des Cloys, Paris) (longueur : 89 cm : diamètre intérieur : 15 cm ; épaisseur du verre : 8 mm), obturée aux deux extrémités par 2 couronnes métalliques par l'intermédiaire d'un joint caoutchouté épais (1 cm). L'ensemble est maintenu par 5 tiges filetées aux estrémités munies d'écrous papillons (schéma A).

Dans l'espace libre de la couronne, le joint supérieur est percé de 3 orifices :

- l'un (a) par où est introduit l'inoculum et le milieu, primitif puis renouvelé,
- un second (b) qui sert à la fois à l'admission d'antimousse et à l'évacuation de l'air,
- un troisième (c) permet également la sortie de l'air et le remplacement de (a) en cas de rupture de ce dernier.

Le joint inférieur comprte également deux ouvertures :

- l'une servant à l'arrivée d'air stérile (d),
- l'autre (e) à la récolte de la culture.

a) - L'introduction de l'inoculum et du milieu s'effectue par l'intermédiaire d'un tube en rhodorsil (Ø intérieur 8 mm, résistance à l'autoclavage) pénétrant dans la colonne grâce à un tybe de 8 mm (Ø extérieur), l'extrémité distale du tube souple porte un tube de jonction rodé **Quickfit** femelle (87/16) qui permet tous les branchements (inoculum et milieu),

b) - celle de l'antimousse (préalablement homogénéité et stérilisé à l'autoclave en tubes à essai de 18 mm à 110°C pendant 15 mm ; volume par

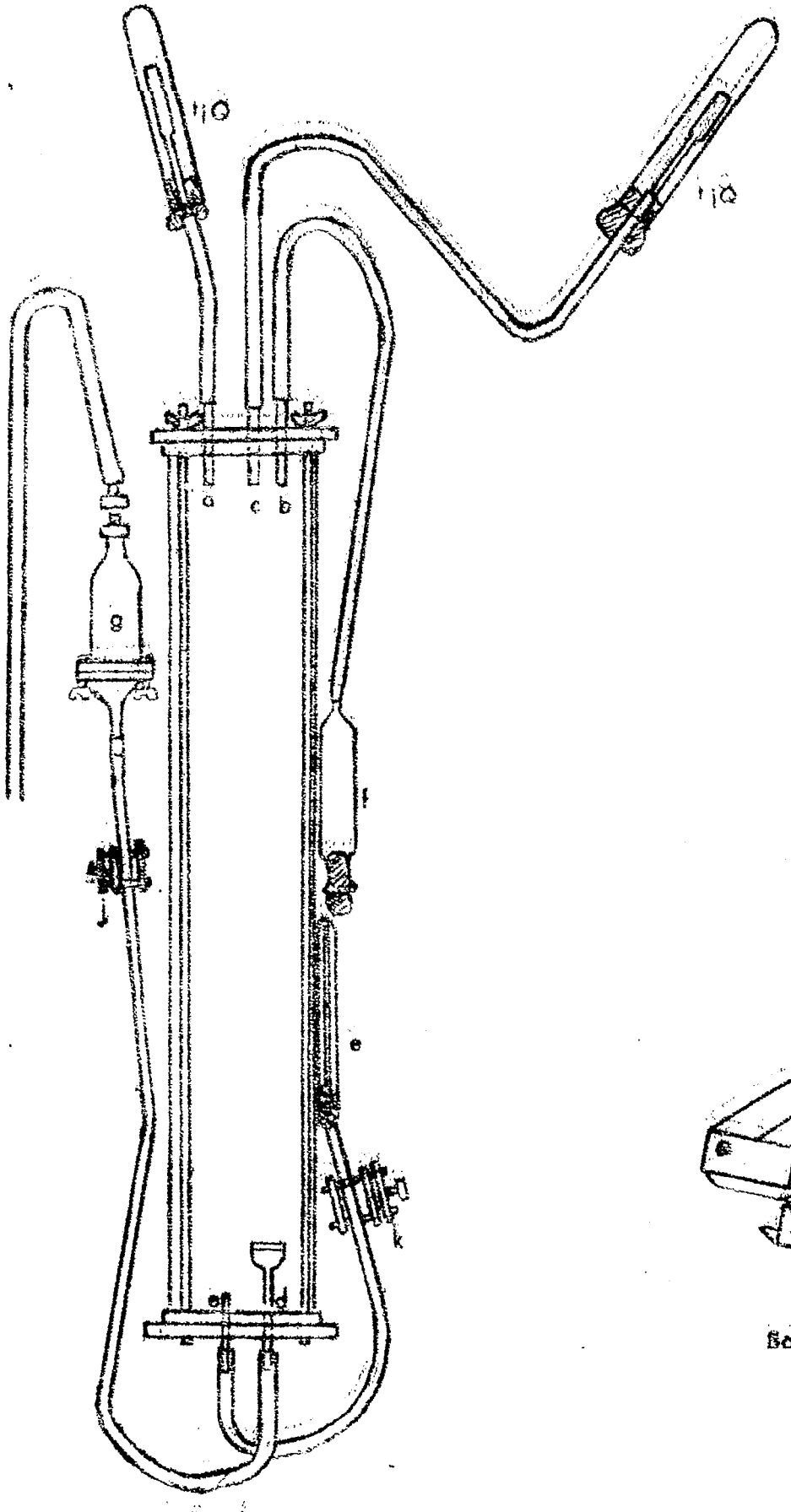

Schéma A

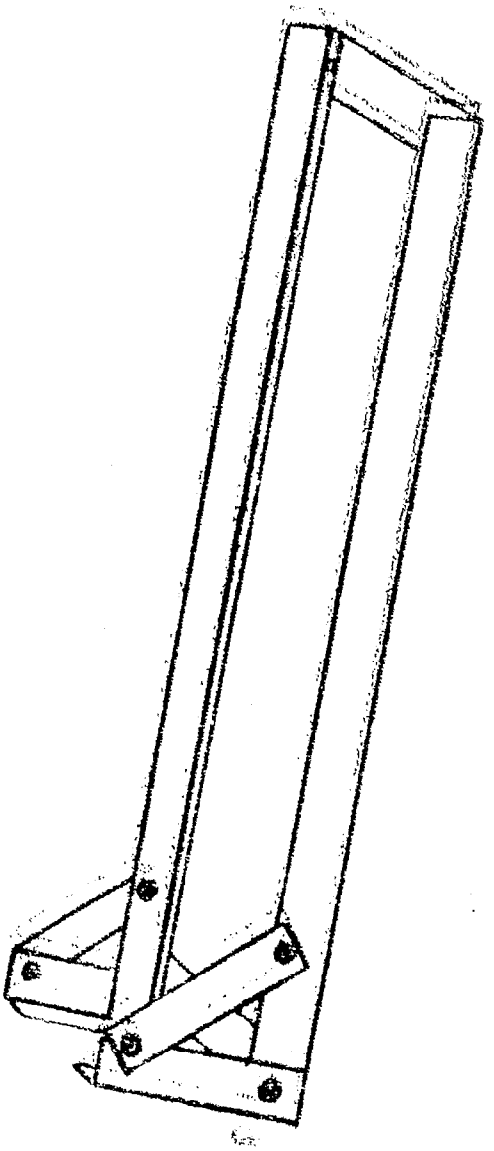

Schéma B

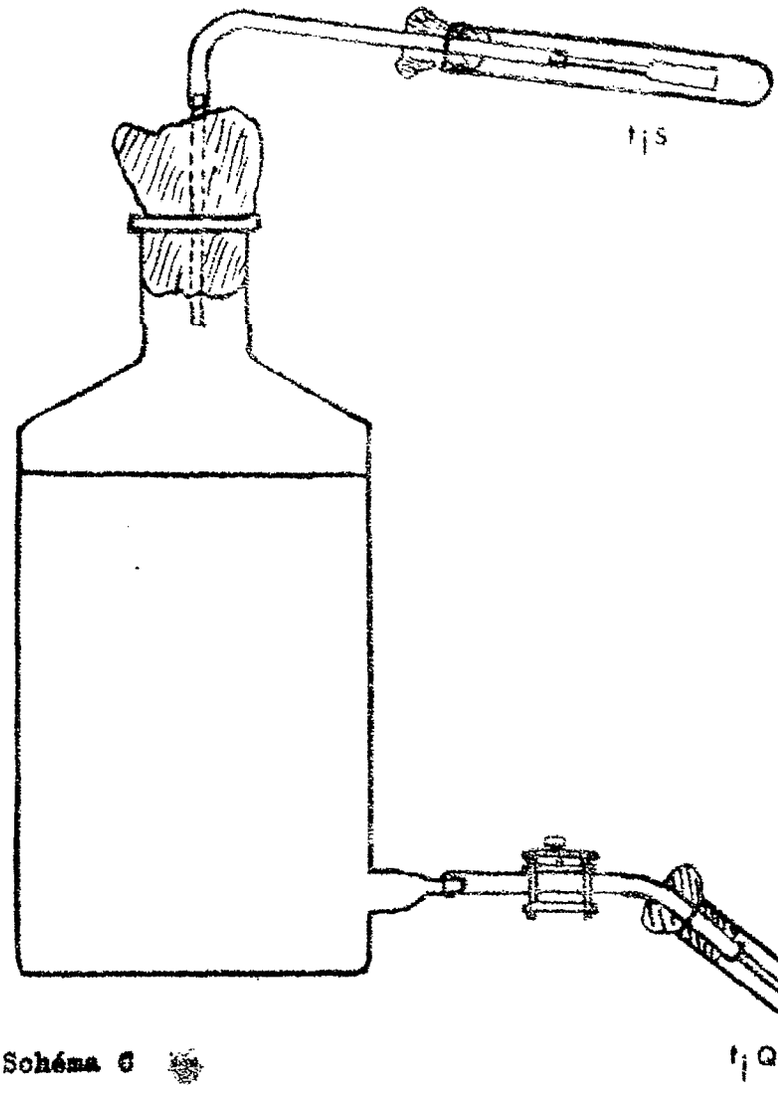

Schéma C

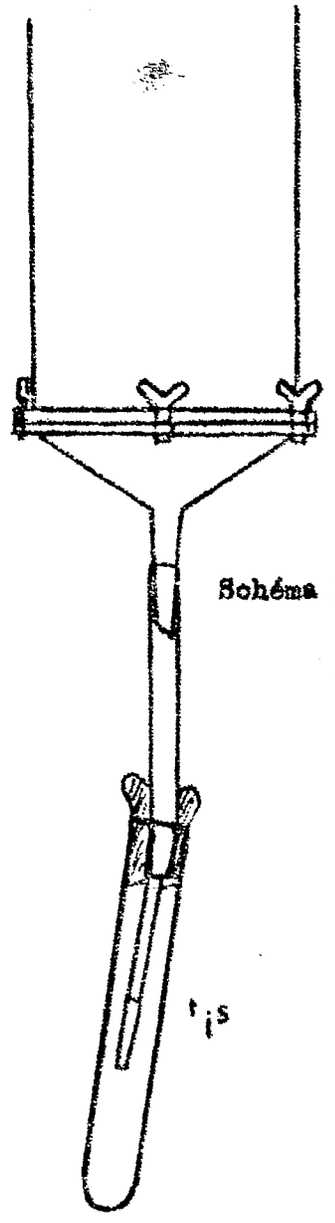

Schéma D

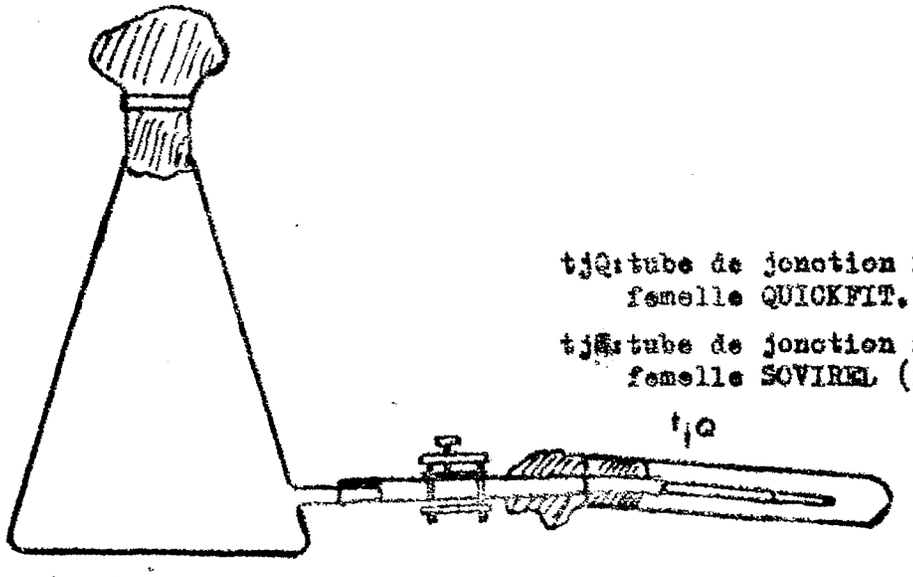

Schéma E

tjQ: tube de jonction rodé normalisé mâle ou femelle QUICKFIT.

tjS: tube de jonction rodé normalisé mâle ou femelle SOVIREL (filtration)

tube à essai : 10 cc) est effectuée par une allonge à plasma (f) et un tube en rhodorsil identique au précédent, pénétrant dans la colonne de verre par l'intermédiaire d'un morceau de canne de verre (longueur environ 12 cc, Ø extérieur : 8 mm),

c) - identique à (a), assure la sortie de l'air et le remplacement de (a) en cas de rupture, la culture pouvant ainsi être prolongée.

Diffuseur d'air (d) et tube de récolte (e) sont montés suivant le schéma A.

Aération : l'air est fourni par un compresseur (petit compresseur Prolabo ou mieux compresseur fournissant l'air comprimé dans l'ensemble du laboratoire). I1 est stérilisé par filtration (membrane EKS 1) par passage à travers un **filtre Seitz à 100** cm^3 (g) (ce filtre est maintenu par une pince à 4 doits solidaire d'une noix fixée sur une des 5 tiges qui assure la cohésion colonne de verre, joints et couronnes) et pénètre dans le milieu sous forme de fines bulles qui se dégagent du diffuseur d'air (h) (schéma A). Une pince clamp (j), placée entre le diffuseur d'air et le filtre de 100 cm^3, permet à volonté de suspendre l'aération (évitant le refoulement de la culture au moment de la récolte et l'humidification de la membrane **EKS I**), de même, une autre pince clamp (k) est placée sur le tube de vidange pendant le cours de la culture, l'extrémité en verre plonge dans le formol.

Fixation de l'appareil : la colonne est fixée sur un chassis-support (schéma B) en cornières **Dixon.** Ce chassis amovible permet la disposition verticale de l'appareil dans la chambre-étuve et assure une bonne protection de l'ensemble au cours des opérations de transport et de stérilisation à l'autoclave.

II - STERILISATION DE L'APPAREIL.

Contenant environ 15 ml d'eau distillée, la colonne et ses accessoires sont stérilisés à l'autoclave (45 mn à 120°C) dans l'état où ils sont représentés sur le schéma A, (f) est obturé par un bouchon coton-gaze recouvert de papier et ficelé (après stérilisation de papier est remplacé par du papier d'aluminium dont l'épaisseur est quadruplée par pliare), (a) et (c) chacun par un tube à essai de 22 mm et un coton. La pince (j) est maintenue en position ouverte.

Les tubes de jonction rodés femelles (a) et (c), l'allonge à plasma (f), le tube de vidange (e) sont rabattus et immobilisés à l'aide de ficelles sur la colonne. L'ensemble préalablement fixé sur le chassis-support (schéma B) à l'aide de fil de fer est disposé horizontalement dans l'autoclave (autoclave horizontal).

III - PREPARATION DE L'APPAREIL AUTOCLAVE PAR DEMARRAGE DE LA CULTURE.

L'appareil, sorti de l'autoclave, est placé en position verticale dans la chambre-étuve et fixé. Une série d'opérations est alors effectuée :

- reserrage des écrous papillons,
- fixation de l'arrivée d'air comprimé sur le filtre de 100 cm^3 (g),
- (a) est dégagé, (c), et (f) fixés supérieurement en position verticale,
- (e) est introduit dans un tube de formol fixé inférieurement en position verticale.
- (j) et (k) sont fermés.

La chambre-étuve doit être pourvue d'un bec bunsen alimenté en gaz.

A N N E X E 2 .

LISTE DU MATERIEL UTILISE.

- Canne de verre de 8mm de Ø,
- Tubes à essais de Ø 18,
- Tubes à essais de Ø 22,
- Erlen-Meyer de 2 litres (pourvu d'un tube soudé à la base, atelier spécialisé dans travail du verre),
- Flacons de Woolf de 10 litres (dont l'ouverture inférieure est étirée, atelier spécialisé dans travail du verre),
- Flacons de 10 litres,
- **Filtres SEITZ** de 10 litres, membranes **EKS I** et **AS** correspondantes,
- Pinces clap de 6 cm,
- Filtres **SEITZ** de 100 cm^3, membranes **EKS I** correspondantes,
- Diffuseur d'air (SOVIREL),
- Tubes de jonction rodés mâles et femelles **QUICFIT** (87/16),
- Tubes de jonction rodés mâles et femelles **SOVIREL** (14/23),
- Tubes souples rhodorsil résistant aux conditions de stérilisation (Ø intérieur 8 mm),
- Filtre papier,
- Antimousse (Silicone, rhodorsil) (PROLABO),
- Pinces à 4 doigts, noix de fixation,
- Cornières DIXON,
- Fil de fer, ficelle, coton cardé, gaze, papier Kraft, etc...

ANNEXE 3.

CLASSIFICATION SEROLOGIQUE ACTUELLE DE PASTEURELLA MULTOCIDA
(types "capsulaires")

Pas d'acide hyaluronique dans la capsule.....	**Type B**	**Essentiellement** Septicémie hémorragique des bovins et des buffles d'Asie, du Proche-Orient et de l'Afrique orientale, des bisons d'Amérique.
	Type E	**Exclusivement** Septicémie hémorragique des bivins d'Afrique occidentale et centrale.
Acide hyaluronique capsulaire.....	1. **En quantité toujours importante Type A**	**Très ubiquiste.** Nombreux types (ou sous-groupes) probables - Pasteurellose de l'Homme - Pasteurellose bovine - Pasteurellose des petits Ruminants - Pasteurellose porcine - Pasteurellose du lapin - Pasteurellose des oiseaux.
	2. **Enquantitévariable Type D**	**Ubiquiste,** comme pour le groupe A Nombreux types (ou sous-groupes) probables.