

INSTITUT **SENEGALAIS** DE
RECHERCHES AGRICOLES
(**1. S. R. A.**)

ZV0000 931

ok

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE **RECHERCHES** VETERINAIRES

B.P. 2057
DAKAR/HANN

SEMINAIRE P.A.O.
SUR LA **PRODUCTION** DES VACCINS BACTERIENNES
GAROUA : 22-26 MAI 1989

PRODUCTION ET CONTROLE DE QUALITE
DES VACCINS CONTRE LES BRUCELLOSES

Par

Dr . **Mamad y KONTE**

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

REF. N° 023 /BACTERIO.

MAI 1989

7 - GENERALITES

La prophylaxie médicale antibrucellique dispose de deux groupes de vaccins majeurs "admis" sur le plan international (des vaccins mineurs existent) :

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

L'objectif visé lors de leur mise au point est l'obtention de vaccins à la fois très immunogènes et faiblement agglutinogènes. Dans ce qui suit, il sera envisagé les méthodes de productions des vaccins B 19 et Rev.1 telles qu'elles sont appliquées dans certains laboratoires, le Sénégal n'ayant pas encore commencé cette production. Les méthodes de contrôle de qualité ainsi que les caractéristiques de ces 2 vaccins seront évoquées sur la base de documents bibliographiques. Les vaccins H 38 et 45/20 seront brièvement présentés.

Rappelons, du point de vue immunologie brucellienne, que ce sont essentiellement les phénomènes immunitaires d'ordre cellulaire qui interviennent dans la défense de l'organisme contre l'infection brucellique. Après phagocytose des Brucella, les macrophages transmettent l'information aux lymphocytes T, responsables eux-mêmes de l'immunité à médiation cellulaire. Les anticorps agglutinants apparaissent comme les témoins passifs des contacts de l'organisme avec les Brucella.

L'objectif de l'immunité active consiste donc à "préparer" macrophages et lymphocytes pour leur permettre de s'opposer valablement à la multiplication des Brucella s'avirages.

II - PRODUCTION ET CONTRÔLE DE QUALITE DES VACCINS ANTIBRUCELLIQUES

A - VACCINS B 19

La méthode de production de vaccins évoquée est celle de l'Institut

de Microbiologie Vétérinaire de Pendik/Istanbul en TURQUIE, un des centres FAO/OMS de référence de la Brucellose.

1°) - Production

Le vaccin est produit à grande échelle à l'aide de fermenteur évitant ainsi la manipulation fastidieuse et coûteuse de nombreuses boîtes de Roux et les risques de contamination ; les étapes de cette production sont les suivantes :

- la souche de **Brucella abortus** B 19 utilisée en général dans la production de ce vaccin, a été isolée en 1923 et maintenue exclusivement depuis sur gélose à l'infusion de pomme de terre. Elle manifeste une pathogénicité faible et constante (absence de lésions macroscopiques au bout de 35 jours chez le cobaye inoculé avec 2.10^9 microorganismes par voie sous-cutanée) et une immunogénicité relativement élevée.

La souche est conservée sous forme lyophilisée.

Pour la production d'un lot de vaccin, un lyophilisat remis en suspension estensemencé sur milieu solide en boîte de Pétri (trypticase soy agar) en vue d'un isolement.

- Après 4 jours de culture à 37°C, effectuer un contrôle microscopique afin de déterminer l'indice de dissociation des colonies (taux de colonies R apparues dans la culture) :

. soit par la méthode directe, à l'aide d'un microscope à lumière transmise obliquement à 45° : les colonies S = smooth sont en général petites, rondes, bleues ou bleu-vert ; les colonies R = rough ont un aspect sec et granulaire et sont blanc-faivâtre ; les colonies rugueuses sont transparentes, grêlâtres, micolides ; les colonies à formes intermédiaires peuvent apparaître) -

. soit après coloration au trypan bleu en solution aqueuse (les colonies sont observées au bord de la goutte en lumière incidente à 45° : les colonies S prennent toutes le colorant) -

Pour être utilisable dans la production de vaccin, l'indice de dissociation (R/S) ne doit pas dépasser 5 p 100.

- Repiquer une dizaine de colonies S sur gélose en pente dans des tubes de diamètre 22 mm, le milieu étant toujours du trypticose soy agar .

- Contrôler rapidement la pureté sous microscope au bout de 72 h puis récolter la culture par lavage à l'aide de bielles de verre stériles et d'une solution de bacto-casitone, de glutamate et de dextrose. La récolte est réunie dans un erlenmeyer.

- Ensemencer 1 litre de milieu (bouillon trypticose soy) versé dans le fermenteur avec le contenu de l'erlenmeyer ; après un bon démarrage de la culture, du milieu neuf est apporté pour la production d'un lot de vaccin.

- La récolte s'effectue en ballon. Elle est testée quant à sa pureté. Le dénombrement des microorganismes utilise les tubes de Hopkins. La répartition est effectuée en flacon pour l'équivalent de 2 ou 4 doses vaccinales titrant chacune $60 \text{ à } 80,19^9$ germes vivants sous le volume de 5 ml. Le vaccin lyophilisé se conserve 2 ans à $+4^\circ\text{C}$.

2°) - Contrôle de qualité

Deux tests sont essentiellement effectués .

- test de pureté : par ensemencement de bouillon et de gélose tryptose au sérum , et coloration de Gram.

- Immunité et virulence : le cobaye est l'animal de choix; inoculer avec 1 ml de vaccin par voie intramusculaire.

3°) - Caractéristiques générales du vaccin E 12

- vaccin vivant de souches atténuées de type E 12, titrant au moins 10^9 germes viables par ml. Ses propriétés immunisantes dépendent directement du type de culture et de vitalité des germes par dose vaccinale.

- la souche vaccinale ne se propage pas d'un animal à un autre
- la vaccination précoce élimine les inconvénients dus à la persistance de titres post-vaccinaux qui gênent parfois l'interprétation des épreuves sérologiques : la négativation est obtenue en un an au maximum.

- la vaccination des animaux adultes n'est pas recommandée, car :
 - . elle provoque des réactions d'agglutination persistantes (plus encore chez le mâle que chez la femelle) et même parfois l'avortement des femelles gravides. Serait à l'origine d'orchite et de diminution de fécondité chez le taureau.

 - . infection possible du tractus génital des taureaux et de la mamelle des femelles. Cependant, la vaccination d'animaux naturellement infectés ne modifie pas le cours de la maladie.

- Durée de protection : les animaux vaccinés à l'âge de 6 à 8 mois par injection sous-cutanée d'une dose unique ($6 \text{ à } 8 \cdot 10^{10}$ germes vivants) de vaccin B 19 résistent habituellement à l'injection par des souches virulentes de **Brucella abortus** pendant 7 ans et probablement davantage. La revaccination est pratiquement sans intérêt. Cette longue durée de protection est bien due à l'action du vaccin et à la réponse de l'hôte et non au vieillissement de l'animal.

- La dose de vaccin souche 19 doit contenir au moins $50 \cdot 10^9$ germes viables à la date limite d'utilisation ; il ne doit pas être utilisé si ce chiffre est tombé au-dessous de $25 \cdot 10^9$ par dose.

- Le meilleur point d'injection sous-cutané est le tiers supérieur de la face latérale de l'épaule ou la zone située immédiatement derrière l'épaule.

B - VACCIN RIV. 1

Cette souche vaccinale est produite à l'Institut de Microbiologie Vétérinaire de Poulley selon une méthodologie décrite dans le présent document.

1°) - Production et contrôle de qualité

Il est utilisé un mutant reverse de *Brucella melitensis* poussant en présence de streptomycine. La souche manifeste aussi une pathogénicité faible et une immunogénicité élevée. Les étapes de la production de ce vaccin sont les suivantes :

- revivification de la souche vaccinale lyophilisée par reconstitution à l'aide de sérum physiologique et mise à l'étuve à 37°C pendant 1 h 30.

- ensemencement d'une goutte sur trypticase soy agar coulé en boîte de pétri. Incuber 4 j. à 37°C.

- contrôle de morphologies coloniales : mise en évidence du phénomène de dissociation par 2 tests :

. test à l'acriflavine en solution (10 mg dans 10 ml d'eau distillée) : agglutination rapide sur lame par mélange d'une colonie à une goutte de solution ; si agglutination ----> colonie R (Rough),
si homogène -----> colonie S (Smooth)

. test au crystal violet : on inonde la culture en boîte de pétri avec la solution de crystal violet, 20 à 25 ml, et on laisse agir 15 secondes ; on enlève l'excès de solution et on observe au microscope après 50 secondes précisément. Seules les colonies S prennent le colorant ; observer en lumière rasante (à 45°).

Pour être utilisable pour la production de vaccin, les cultures doivent contenir au plus 1 p 100 de colonies R pour *B. melitensis* et au plus 5 p 100 pour *B. abortus*.

- ensemencer une colonie S sur trypticase soy agar en tube additionné de sérum de cheval et de dextrose. Faire stériliser et incuber 3 jours à 37°C.

- récolte de cultures par lavage à l'aide d'une solution de Bacto-casitone, de gélatine et de dextrose ; faire un dénombrement sur culture en milieu solide.

- préparer l'inoculum par récolte des cultures, à l'aide de billes de verre stériles, mises en suspension dans la même solution que précédemment,
- contrôles ; ensemencement du fermenteur
- récolte en ballon ; détermination de la concentration, répartition en flacon pour 100 doses chacun, la dose vaccinale titrant 1 à 3.10^9 germes vivants. Le vaccin lyophilisé se conserve 2 ans à $+4^{\circ}\text{C}$. Un lot de production compte 450 000 doses.
- contrôles de qualité
 - . pureté : milieux liquide et solide, Gram.
 - . immunité et virulence sur cobaye.

2°) - Caractéristiques du vaccin Rev. 1

- Vaccin vivant, lyophilisé ; utilise un mutant reverse d'une souche streptomycino-dépendante de **B. melitensis**. Surtout efficace chez les chèvres.
- Vaccine les mâles et les femelles ovins et caprins âgés de 3 à 8 mois avec 1 à 3.10^9 germes vivants par dose vaccinale. Les brebis sont vaccinées 1 mois avant la lutte. Les béliers ne sont jamais vaccinés.
- la prémunition conférée dure 5 ans. Le vaccin doit être réservé aux pays où la présence de l'infection à **B. melitensis** est établie.
- Protège efficacement les bovins contre **B. abortus** souche 544.

C - VACCIN H. 38

Il est composé d'une suspension de **Brucella melitensis** souche 53 H. 38 (inactivé par le formol à 4 p 1000, en suspension huileuse lentement résorbable. Les bactéries ont une constitution cellulaire normale (donne des colonies S).

Son pouvoir immunisant est maximal, grâce à une concentration élevée (450.10^9 germes par dose) et à l'emploi d'un adjuvant de l'immunité.

Les anticorps produits (agglutinines et sensibilisatrices) à la suite d'une injection unique seraient moins importantes que dans le cas du B.19 ; de plus, ces anticorps s'élimineraient plus rapidement (en 6 mois). Néanmoins, le H. 38 serait considéré comme très agglutinogène. Deux injections successives entraîneraient des fluctuations sérologiques décelables pendant plus de 2 ans.

Ce vaccin inactivé est très stable (5 ans de stockage au réfrigérateur sans altération) ; en pratique, se conserve 2 années au réfrigérateur, à la température ambiante des pays tempérés pendant le temps nécessaire aux interventions de la pratique rurale.

Dans les conditions des pays tropicaux, il est indispensable de conserver le vaccin sous glace pendant les séances de vaccination. Inoculation par voie strictement sous-cutanée à la dose de 3 ml par bovin, en partie basse du fanon. La présence d'un excipient huileux oblige d'employer des aiguilles de diamètre suffisant. Le vaccin est injectable à tout moment aux bovins indemnes comme aux bovins infectés. Il est capable de renforcer l'immunité qui s'élabore à partir de l'infection. Une répétition des injections pendant 3 ans stérilise les animaux. Utilisable chez les Petits Ruminants.

D - VACCIN 45/20

C'est une suspension de **B. abortus** souches 45/20 tués par le formol en adjuvant huileux.

Il est administré par voie sous-cutanée ou intramusculaire, en deux injections séparées par un intervalle variable, de 3 à 12 semaines. Rappel annuel.

Le pouvoir immunogène varie selon les lots de vaccins, les laboratoires producteurs, le type d'adjuvant choisi - ce pouvoir est actuellement mis en doute.

Il est habituellement considéré comme non agglutinogène. Utilisé dans la prévention des jeunes et chez les adultes dans les étables indemnes menacées ou rappelés après le B. 19 chez les génistes.