

ZV0000929

ok

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

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

LABORATOIRE: NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

PREPARATION DU VACCIN ANTIPERIPNEUMONIQUE
LYOPHILISE T1 / 44

Par M.P. DOUTRE
Chef du Service de Bactériologie
LNERV / ISRA

REF. N° 32/MICROBIO.

MAI 1983

Le vaccin antipéripleurmonique préparé au Laboratoire national de l'Elevage et de Recherches vétérinaires (Dakar) résulte de la lyophilisation d'une culture dense en bouillon de la souche vaccina3.c T1/44 de Mycoplasma mycoides.

I - COMPOSITION ET PREPARATION DU MILIEU

La composition du milieu de culture est due aux travaux effectués au Laboratoire de Ndjaména (milieu F 66, rapport présenté par A. PROVOST à la 3ème Réunion des Experts sur la Péripleurmonie bovine FAO/OIE/OAU, tenue à Khartoum en février 1967) et de ceux des chercheurs australiens du CSIRO.

Quelques modifications ont été apportées : elles portent sur la suppression de l'acide palmitique, pratiquement insoluble même dans une solution de soude 0,1 M et sur la préparation et la quantité d'extrait frais de levure ajouté.

Un lot de vaccin est préparé à partir de 1% litres de milieu liquide contenu dans un ballon unique pourvu d'un barreau aimanté (vortex en fin de culture).

- Macération du coeur

On provoque la macération pendant une heure dans 10 litres d'eau distillée à 50°C de 5 kg de hachis de coeur de boeuf dégraissé (achat des coeurs à l'abattoir), puis on porte à ébullition. Filtration à chaud sur papier.

On ajoute pour 10 litres de macération :

. Facto tryptose	100 g
. Glucose	20 g
. Phosphate disodique	25 g

On chauffe à 80°C ; filtration à chaud.

Addition de :

. Glycérol	3 g
. Acide oléique	mg
. Extrait de levure	1 l
. Sérum de cheval décomplémenté	1 l
. Pénicilline	8.000.000 UI

Le pH est amené à 8,1 avec une solution de soude 10 Y. L'acide oléique est mélangé à 50 ml de soude 0,1 M. Le gel formé est dissout par acitation magnétique.

- Préparation de l'extrait de levure utilisé

L'extrait de levure préparé extemporanément présente des qualités supérieures aux produits correspondants que l'on trouve dans le commerce. La technique de préparation retenue est la suivante (IEMVT, Service de Microbiologie) :

- . Mettre en suspension homogène 1 kg de levure fraîche de boulangerie dans un litre d'eau distillée en présence de 8 ml de chloroforme ;
- . laisser au bain-marie 24 heures à 50°C en agitant de temps en temps ; centrifuger et recueillir un premier surnageant que l'on conserve au froid ;
- . reprendre les culots dans un litre d'eau distillée et les soumettre à quatre cycles gel-dégel ;
- . centrifuger de nouveau et recueillir le deuxième surnageant ;
- . mélanger les deux surnageants ;
- . filtrer sur filtre Seitz EKS I (une clarification préalable sur membrane AS peut faciliter la filtration finale) ;
- . conserver à -20°C.

II - STERILISATION DU MILIEU

La stérilisation de 10 litres de milieu est pratiquée par filtration sur filtre Seitz EKS I de 10 litres, après une clarification préalable sur membrane AS.

Le branchement filtre-ballon est effectué grâce à l'emploi, sous la flamme, des tubes de jonction normalisés mâle-femelle SOVIREL (14/23) (voir utilisation de l'appareil de Sterne dans la préparation des vaccins contre les pasteurelloses).

III - INOCULUM

a) Réceptacle :

Un Erlen-Meyer de 2 litres à la base duquel a été soudée une tubulure de 6 cm (travail du verre dans un atelier spécialisé),

Sur la tubulure est enboîté un tube souple en rhodorsil (Ø 8 mm, résistance à la température d'autoclavage) terminé par un tube en verre obturé par une effilure. Une pince clamp à lames parallèles de 6 cm est placée au niveau du tube souple.

Document communiqué par le Service de Microbiologie de l'IEMVT
à la Commission de l'Académie de Médecine le 14/11/1974

.../...

b) Milieu :

C'est le milieu décrit ci-dessus, sous un volume de 1 litre.

c) Stérilisation :

Filtration dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

d) Ensemencement

La souche vaccinale T1/44 de Mycoplasma mycoides est conservée sous forme de banque lyophilisée (1/3 de culture en bouillon, 2/3 de sérum de cheval décomplémenté ou tout autre milieu de lyophilisation : lait écrémé, mist-dessicans, etc...)

A partir d'une ampoule de la banque, une série de 5 tubes sont ensemencés et mis à incuber à 37°C. Après 4 jours de culture, les cultures en tubes servent à ense-
mencer l'Erlen-Meyer contenant le milieu de l'inoculum. Ce dernier est mis à in-
cuber 3 jours à 37°C avant d'être utilisé pour ensemen-
cer le ballon de 12 litres
de milieu.

1 - DEROULEMENT DE LA CULTURE

Pour la préparation du vaccin, on utilise une culture de 72 heures à 37°C. Au cours des dernières 24 heures, les ballons sont portés sur agitateur magnétique (aération par vortex).

1 - LYOPHILISATION ET EMPLOI

- 520 g de lait écrémé sec sont ajoutés stérilement à la culture (environ 13 litres : 12 litres de milieu + 1 litre d'inoculum) :
- la répartition se fait sous un volume de 5 ml par flacon type pénicilline de 20 ml à l'aide d'une seringue automatique Cornwall ;
- lyophilisateur : USIFROID SMIR (Procédé RIEUTORD) : temps de lyophilisation 26 heures.

- 2 Cassage du vide sous azote,
- Bouchage,
- Capsulage,
- Impression des flacons.

Au moment de l'emploi, le contenu de chaque flacon est reconstitué avec 40 ml d'eau distillée froide (40 doses vaccinales).

.../...

VI - CONTROLES

a) Immunité

La valeur de l'immunité conférée par le vaccin antipéripneumonique lyophilisé préparé à l'aide de la souche T1 a été démontrée dans différents laboratoires. A Dakar, au cours des années 1968 et 1969, la méthode dite de contact, mise au point par les chercheurs australiens, a permis d'établir que 3 mis et 7 mis et demi après la vaccination? l'immunité est totale : 14 mis après l'immunisation, elle est encore de 90 p.100. Dans ces conditions, une période de protection minimale de 1 an peut être garantie (DOUTRE, M.P. ; CHAMBRON J. ; Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1970, 23 (2) : 163 - 179).

Il est évident qu'il est absolument impossible d'effectuer une expérience contact pour chaque lot de vaccin produit. La valeur de l'immunité de la souche T1/44 ayant été prouvée une fois pour toutes pour un vaccin titrant au minimum 10^7 microorganismes viables par dose vaccinale (1 ml), pour chaque lot, le contrôle se ramène donc à un titrage du non-km de microorganismes viables par ml. Ce nombre doit être égal (au minimum) ou supérieur à 10^7 (valeur retenue par les Experts Péripleumonie bovine FAO/OIE/OAU).

Titration

Au laboratoire de Dakar, on utilise la méthode de McCRAIDY (CALMETTE, POCQUET & NEGRE : 1948).

- 1 dose vaccinale est mise en culture dans un tube à essais contenant 9 ml de milieu liquide (dilution 10^{-1}), par la méthode des dilutions successives, on prépare ces dernières de 10^{-2} à 10^{-10} (1er portoir).
- Avec chacune des dilutions 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , on ensemence 5 tubes de bouillon de 9 ml avec 1 ml de dilution (2ème portoir). Il reste donc dans chacun des tubes originaux 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 4 ml de milieu (1er portoir).

L'ensemble des tubes est porté à l'étuve à 37°C et le développement des cultures observe et noté tous les jours jusqu'au 10ème jour, alors s'effectue la lecture finale.

Du développement des cultures sur le second portoir on déduit le nombre caractéristique (utilisation de la table), lequel permet de déterminer la quantité de microorganismes viables contenus dans une dose vaccinale.

.../...

b) Innocuité

C'est celle de la souche T1/44.

On sait que des réactions post-vaccinales sont toujours à craindre sur des animaux (taurins surtout) vivant dans des zones où la vaccination n'a pas été pratiquée récemment. Dans ce cas, il est bien sûr conseillé de vacciner expérimentalement un petit nombre d'animaux et d'observer (10 jours à 3 semaines) l'apparition possible d'un oedème à tendance envahissante de type Willemsien, toute extension jugée dangereuse pouvant être jugulée par le recours à un antibiotique antimycoplasmique (Tylosine, Spiramycine, Terramycine, etc...). La non observation du lieu d'inoculation (1/3 supérieur de la côte) est bien souvent une cause favorisant l'apparition d'une réaction post-vaccinale étendue.

Si sur certains troupeaux, la souche T1/44 s'avère par trop dangereuse, alors s'impose la vaccination à l'aide de la souche KH 3 beaucoup moins virulente, mais dont la qualité de l'immunité conférée est nettement inférieure à celle de T1/44.

c) Stérilité

Le contrôle de stérilité est classique, il s'effectue sur milieu liquide aérobie et anaérobie.