

ZV000 1131

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

Techniques ^{OK}
de laboratoire

1983

VACCIN CONTRE LES PASTEURELLOSES ANIMALES

UTILISATION DE L'APPAREIL DE STERNE DANS LA
PREPARATION D'UN VACCIN CONTRE LA SEPTICEMIE
HEMORRAGIQUE

Par M.P.. DOUTRE :

Docteur vétérinaire microbiologiste
Chef du Service de Bactériologie au
LNERV / ISRA

REF. N° 031/MICROBIO
MAI 1983

Comme tous les vaccins, ceux utilisés dans la prophylaxie médicale des pasteurelloses animales doivent présenter un nombre minimum de germes -dans le cas présent tués- par dose vaccinale. Cette condition n'est satisfaite que si les cultures obtenues sont suffisamment riches. Pratiquement, il est admis qu'avant l'adjonction de l'aldéhyde formique, la culture doit présenter une densité optique égale au tube n° 10 de Brown. Dans le passé, ce résultat était obtenu en ajoutant 3 une culture ordinaire en bouillon, le produit de raclage, par billes de verre, de cultures sur milieu solide (gélose au sang en boîtes de Roux). Désormais, l'utilisation des fermenteurs permet d'obtenir, en milieu liquide, des cultures extrêmement denses qui peuvent être ramenées à la densité optique de 10 avant la répartition en ampoules ou en flacons. La richesse en germes des cultures en fermenteurs est 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.

L'appareil de Sterne peut être considéré comme un fermenteur dépourvu de régulation thermique (37°C) placé dans une chambre étuve. Robuste, il est particulièrement adapté aux conditions de travail qui prévalent dans les pays tropicaux. Sa conception résulte de mises au point réalisées par STERNE, en Afrique du Sud, et par BAIN, en Extrême Orient. A l'IEMVT, c'est essentiellement PERREAU qui adapta l'appareil aux possibilités d'équipement et qui l'introduisit au Laboratoire de Farcha (Tchad). Au laboratoire de Dakar, son utilisation date de 1965, elle a permis la production de millions de doses de vaccins antipasteurelliques de types divers, destinés aussi bien à l'Afrique tropicale qu'à l'Asie. Le tableau qui suit rappelle la répartition des différents types de CARTER de Pasteurella multocida en pathologie humaine et surtout vétérinaire.

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 bovins 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. En quantité variable Type D ...	(Ubiquiste, comme pour le groupe A Nombreux types (ou sous-groupes) probables.

Tout vaccin préparé à partir de Pasteurella haemolytica peut également faire appel à l'appareil de Sterne pour l'obtention d'une culture dense.

Dans les lignes qui suivent, l'emploi de l'appareil de Sterne, dans la préparation d'un vaccin contre la septicémie hémorragique, sera décrit en détail, mis tout type de Pasteurella multocida, autre que le type E, pourrait être utilisé dans la préparation de vaccins destinés par exemple, aux petits ruminants (types A et D), aux volailles (type A), etc...

1 - DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Il est essentiellement constitué par une colonne de verre Pyrex (Verrerie générale : 39 me 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 extrémités mûes 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,

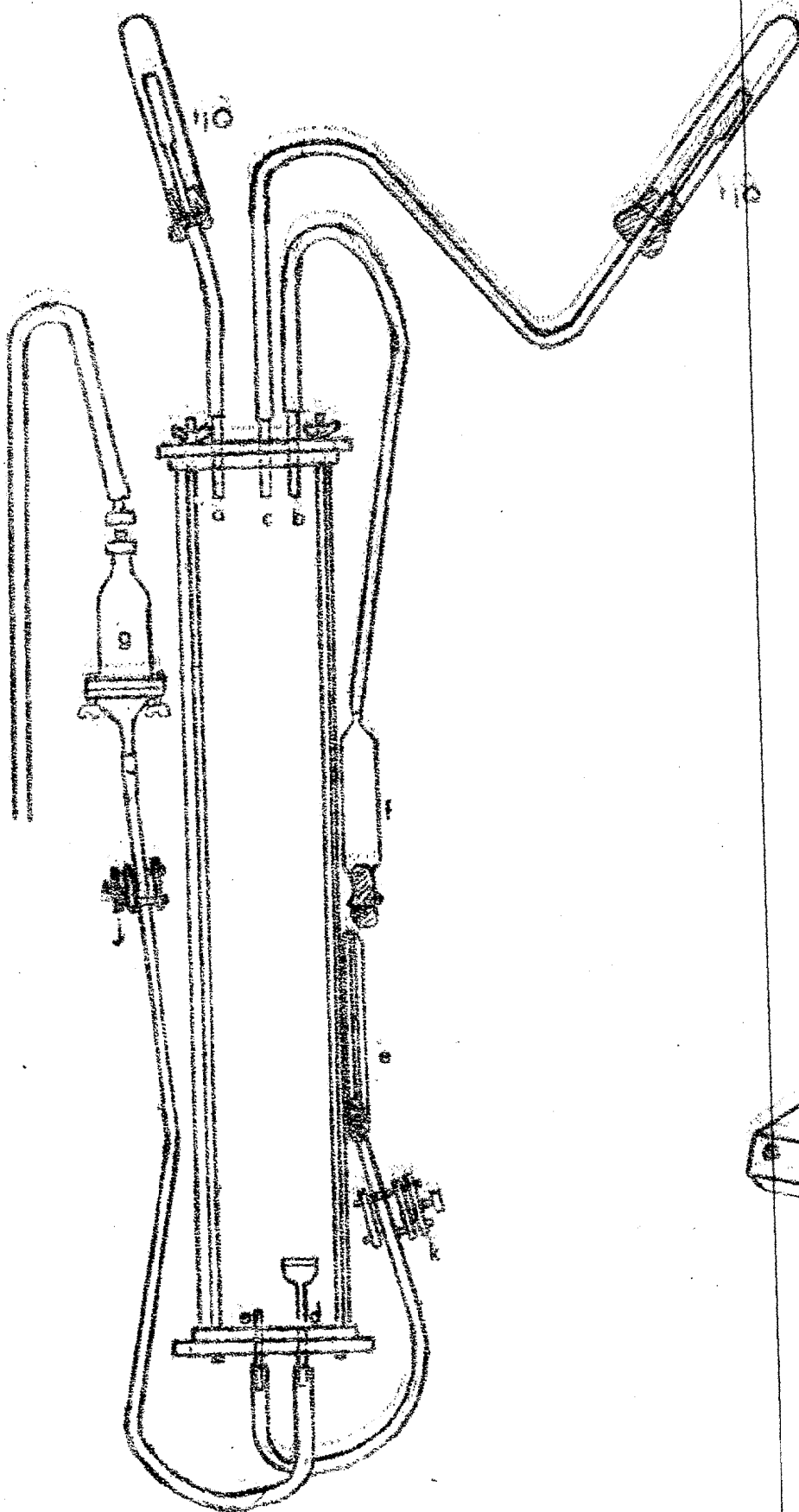


Schéma A

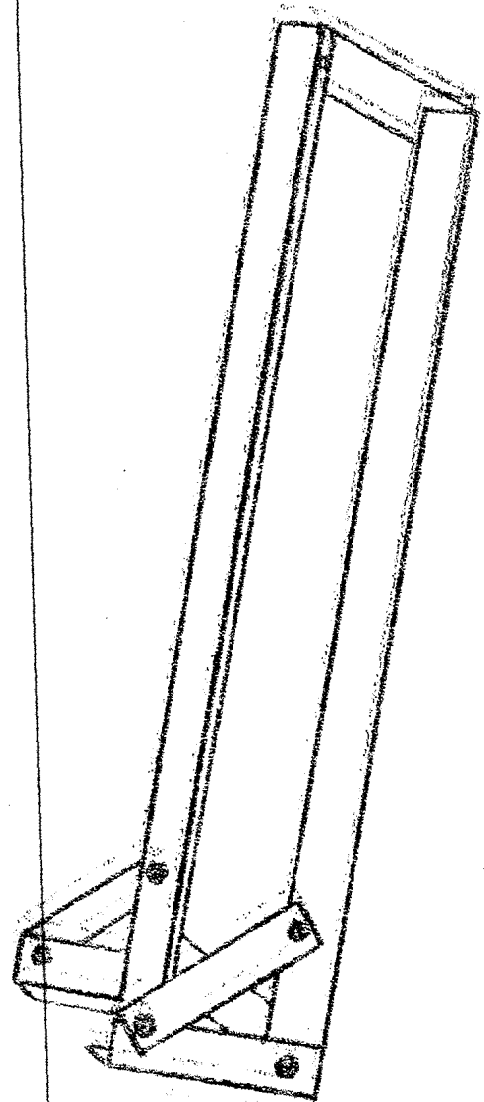


Schéma B

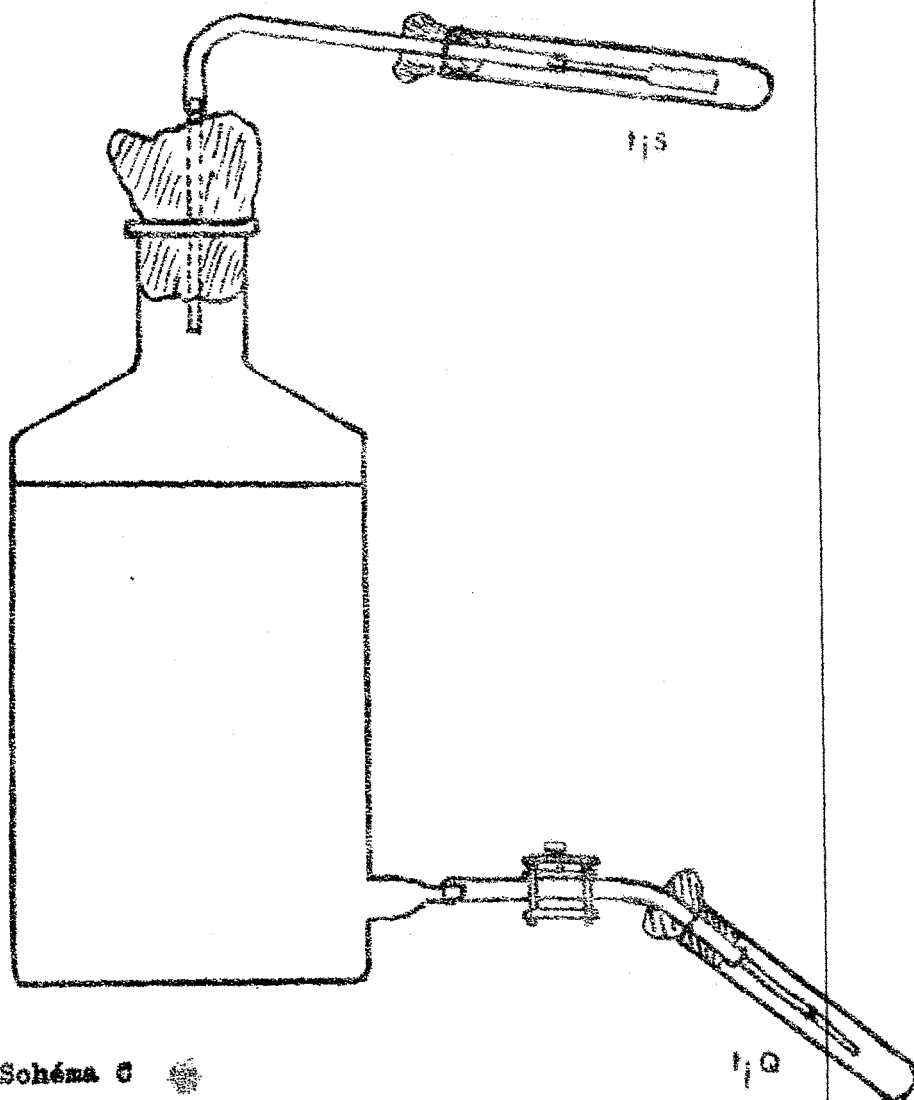


Schéma C

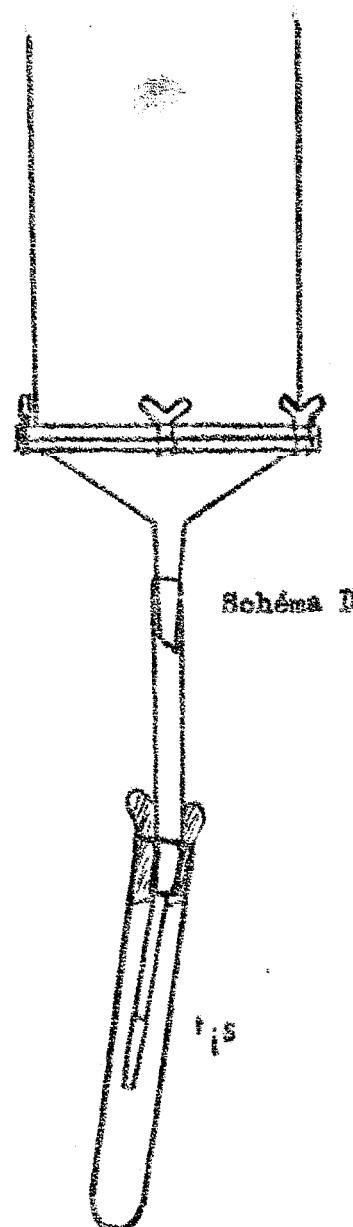


Schéma D

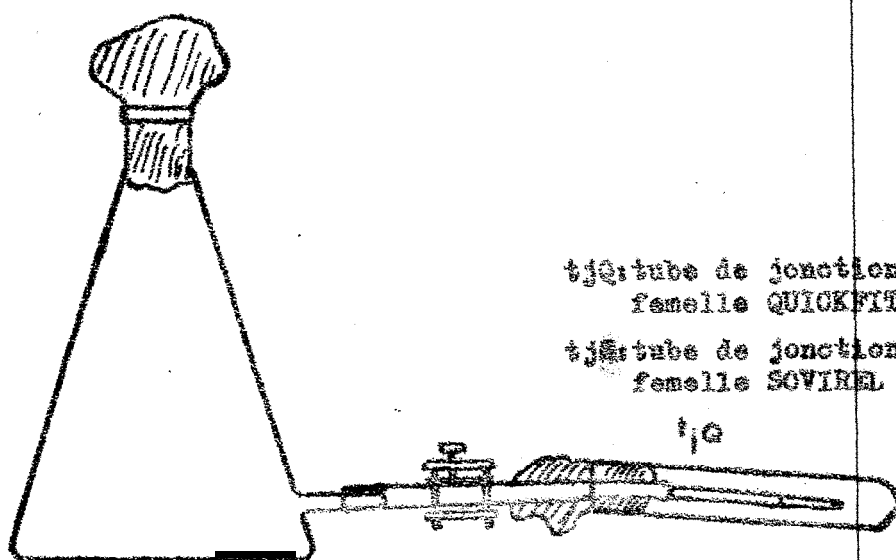


Schéma E

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

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

- 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 comporte 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 ($\emptyset$ intérieur 8 mm, résistance à l'autoclavage) pénétrant dans la colonne grâce à un tube de verre de 8 mm ($\emptyset$ 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 homogénéisé et stérilisé à l'autoclave en tubes à essai de 18 mm à 110°C pendant 15 mn ; volume par 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, $\emptyset$ 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). Il est stérilisé par filtration (membrane EKS I) par passage à travers un filtre Seitz de 100 cm³ (g) (ce filtre est maintenu par une pince à 4 doigts 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 cm³, 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 alors dans le formol.

.../...

Fixation de l'appareil : la colonne est fixée sur un châssis-support (schéma B) en cornières Dixon. Ce châssis 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 le panier est remplacé par du papier d'aluminium dont l'épaisseur est quadruplée par pliage), (a) et (c) chacun par un tube à essai de 22 mn 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 châssis-support (schéma B) à l'aide de fil de fer est disposé horizontalement dans l'autoclave (autoclave horizontal).

III - COMPOSITION ET STERILISATION DU MILIEU

Le milieu utilisé offre la composition suivante :

Pour 10 litres d'eau portée à 60°C (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 papainique de pancréas	1,250 ml
- glucose	20 g
- lactate de soude	35 ml
- phosphate monosodique	30 g

Le pH est ajusté à 7,5 - 7,8 .

La stérilisation 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.

.../...

a) Préparation du digestat papainique de pancréas :

400 g de pancréas de boeuf, 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 papaine. En une heure, la température est élevée à 70°C (bain-marie). La digestion est alors arrêtée en augmentant la température à 86° en quelques minutes. Le produit de la digestion est recueilli après filtration sur papier. Ce digestat acide peut être conservé à -20°C.

L'obtention de digestat papainique de pancréas est à la fois facile et rapide. L'autodigestat originel de Sterne, nécessitant des opérations beaucoup plus longues, a été abandonné.

b) Détails de la stérilisation par filtration du milieu

Le milieu filtré est recueilli dans des flacons de Woolf de 10 litres dont la tubulure inférieure a été étirée (travail du verre dans un atelier spécialisé). Sur cette tubulure est adapté un tube souple en rhodorsil, muni d'une pince clamp, et terminé par un tube de jonction rodé Quickfit mâle (schéma C).

L'embouchure supérieure du flacon porte un tube de jonction à rodage normalisé femelle Sovirel (schéma C) (14/23) qui peut, sous la flamme, se raccorder à l'élément mâle (14/23) correspondant porté par le filtre de 10 litres (schéma C).

Flacons de Woolf vides et filtres Seitz de 10 litres, pourvus d'une membrane EKS 1, sont stérilisés à l'autoclave (45 mn) 120°C).

Au laboratoire de Dakar, la préparation d'un lot de vaccin contre la septicémie hémorragique met en jeu deux appareils de Sterne fonctionnant simultanément et approvisionnés journallement par 100 litres (10 flacons de Woolf) de milieu filtré et préalablement éprouvé pendant 24 heures.

IV - PREPARATION DE L'INOCULUM

a) Choix et entretien des souches

Le choix de la souche de Pasteurella multocida à utiliser est avant tout imposé par l'affection que l'on se propose de combattre et l'espèce animale en cause (voir tableau en introduction : classification sérologique actuelle de P. multocida). C'est ainsi que le type E doit être obligatoirement employé dans la

.../...

préparation du vaccin contre la septicémie hémorragique du Centre et de l'Ouest africain ; les types A et D pour lutter contre la pasteurellose des petits mammifères, etc.

Les souches sont à conserver lyophilisées, en évitant rigoureusement les passages inutiles sur milieux artificiels. Il est préférable de lyophiliser :

- soit du sang virulent, récolté stérilement sur un bouvillon mourant de la maladie expérimentale ;
- soit une culture iridescente sur gélose tryptose-sérum récoltée en eau peptonée et diluée au 1/3 dans du sérum de boeuf.

Les souches de P. multocida, utilisées dans la préparation des vaccins, doivent tuer la souris.

b) L'inoculum : au laboratoire de Dakar, l'inoculum est contenu dans un Erlen-Meyer de 2 litres à la base duquel a été soudée une tubulure d'environ 6 cm (travail du verre dans un atelier spécialisé). Comme pour les flacons de Wolf de 10 litres, cette tubulure se poursuit par un tube souple de rhodorsil, terminé par un tube de jonction rodé Quickfit mâle (voir schéma E). Une pince clamp est placée sur le tube souple. Dans le passé, des flacons de Kitasato ont été utilisés, mais la tubulure, placée près du goulot, offre un désavantage (risque de mouillage du coton).

Chaque Erlen-Meyer contient au moins 1 litre de milieu filtré et introduit selon le procédé décrit précédemment (III.b).

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

V - ENSEMENCEMENT ET MISE EN ROUTE DE LA CULTURE

a) Préparation de l'appareil autoclavé

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 cm³ (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.

b) Introduction de l'inoculum et début de la culture

L'inoculum est versé dans la colonne grâce au branchement des tubes de jonction rodés Quickfit, mâle (Erlen Meyer de l'inoculum) femelle (a) (de l'appareil), effectué sous la flamme. Puis, après déconnection de l'Erlen Meyer, 2 litres de milieu sont alors introduits, toujours grâce au branchement sous la flamme des tubes de jonction rodés Quickfit mâle (flacon de Woolf)-femelle (a) (de l'appareil). Les 2 litres écoulés, la pince clamp située en amont du tube de jonction rodé Quickfit mâle est fermée (schéma C). Le milieu situé au niveau du branchement des tubes de jonction Quickfit est de préférence expulsé dans la colonne par pression sur les tubes souples.

2 litres 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 sous la flamme, par l'allonge à plasma (f) et l'aération est mise en route. 3 heures plus tard, on 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, le rapport "inoculum" - milieu neuf étant toujours grand.

c) Première récolte et récoltes ultérieures

La marche de la culture peut être suivie en effectuant des prélèvements stérilement par le tube de vidange (e). Après chacune de ces opérations, le tube doit être réintroduit dans le formol.

Aubout de 6 heures, la culture a atteint son développement maximum. La récolte est alors effectuée.

Sur le circuit air, la pince clamp à vis (j) est fermée. Le tube de vidange est introduit dans un ballon de 10 litres stérile, la flamme du bac bunsen est main-

tenue au voisinage du goulot, la pince clamp (k) est alors ouverte et la culture "s'écoule". Une coloration de Gram permet de vérifier que la récolte n'est pas contaminée *.

Lorsque l'appareil ne contient plus qu'un litre de culture, la pince (k) est fermée. Ce volume restant permettra l'ensemencement de l'apport nouveau de milieu neuf.

La récolte est formolée immédiatement (4 p.1000).

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.

VI - RESULTATS

Par cette méthode, une culture offrant une opacité supérieure à 20 est couramment obtenue, 10 litres de culture permettent donc de fabriquer 20 litres de vaccin. Le vaccin formolé est adjuvé par l'alun de potassium. A cette fin, une solution d'alun de potassium stérile (autoclavage) est ajoutée de telle sorte que le titre final en alun soit de 10 p.1000.

Le conditionnement est effectué soit en ampoules de 20 ml (Dakar), soit en flacons de 250 ml (Farcha). La dose vaccinale est de 2 ml.

VII - CONTROLES

A effectuer sur la suspension vaccinale finale avant l'adjonction d'alun.

a) Stérilité

ensemencer en bouillon ordinaire, en bouillon viande-foie anaérobie, sur gélose tryptose. Observation pendant 3 à 4 jours.

b) Innocuité

Inoculer 2 cc sous la peau d'un lapin qui sera mis en observation pendant une Semaine.

* Remarques : Les principales causes de contamination de l'appareil de Sterne sont les suivantes : inoculum souillé, milieu neuf souillé, manque d'antimousse, la culture a refoulé par les orifices supérieurs, contamination au niveau du branchement tubes de jonction mâle-femelle. Pour éviter ce dernier cas, il est recommandé d'une part d'essuyer à l'aide d'une gaze l'élément mâle avant tout branchement nouveau et de la passer ensuite immédiatement à la flamme, d'autre part de remplacer immédiatement tout flacon Wolf vide par un autre plein de milieu, mais dont bien sûr la pince clamp est maintenue en position fermée. Ainsi la zone de branchement présente une absence totale de milieu, une pince clamp placée en aval peut d'ailleurs accroître la sécurité.

c) Immunité

- Si l'on souhaite effectuer des tests d'immunité pour pouvoir contrôler le pouvoir réellement protecteur du vaccin, il est indispensable d'utiliser des bovins. A signaler que le cobaye est un animal à proscrire absolument de toute expérimentation en matière de septicémie hémorragique, même pour procéder à de simples passages de souches.
- Les bovins utilisés doivent être triés sérologiquement pour éliminer les animaux immuns naturellement, ce qui évitera de voir survivre un certain nombre de témoins non vaccinés. Les tests les plus précieux pour ce dépistage sont le titrage du pouvoir protecteur pour la souris, la fixation du complément et l'agglutination de cultures sur gélose (BAIN, R.V.S. : Brit. vét. J. : 1955, III : 511-518), enfin il convient d'ajouter l'héماغglutination de globules rouges humains du groupe 0 (CARTER, G.R. : 1955 ; PERREAU, P. : 1961). Tous ces tests nécessitent un personnel qualifié, un matériel suffisant, un laboratoire adapté.

La souche d'épreuve doit être choisie une fois pour toutes et sera seule utilisée, on lui évitera au maximum les passages sur milieux artificiels. Le titrage du pouvoir pathogène doit être également établi d'une manière définitive et pour cela, on peut partir de la base suivante : 1 ml d'une dilution au 1/1000 d'une hémoculture de 15 à 18 heures de la souche d'épreuve peut être considéré comme la dose sûrement mortelle pour un bouvillon sensible de 70 à 100 kg. Il est possible que l'on enregistre des différences tenant aux races bovines considérées, Cette dose sûrement mortelle (DSM) a été estimée assez largement, il est possible (et il est bon de le vérifier) que la DSM réelle varie selon les régions.,

Le liquide utilisé comme diluant présente une grande importance. Le sérum physiologique est mal supporté par les Pasteurella et mieux vaut utiliser de l'eau peptonée stérile.

- Le protocole d'expérience est très simple. Il est identique à celui appliqué pour le charbon symptomatique.

Les résultats des tests d'immunité ne deviennent très nets qu'au moment où l'on dispose d'un lot sérologiquement homogène d'animaux de sensibilité uniforme, ce qui est souvent très difficile à obtenir, Les résultats favorables fournis par

l'utilisation du vaccin dans les troupeaux où sévissait, dans le passé, la septicémie hémorragique constituent sans doute le meilleur critère dont on dispose pour juger de la qualité du vaccin (exemple de la PASTORALE dans l'Adamaoua, Cameroun).

Le vaccin est administré par voie intramusculaire, à l'aide d'une seringue à 20 cm³, dans le muscle de la cuisse. La dose est de 2 cm³ par animal. Le vaccin est conservé à l'abri de la lumière, à une température comprise entre 5°C et 15°C. La durée de conservation est de 6 mois. Le vaccin est administré à tous les animaux du troupeau, à l'exception des animaux atteints de la maladie. Le vaccin est administré à l'automne, avant la saison des pluies. Le vaccin est administré à tous les animaux du troupeau, à l'exception des animaux atteints de la maladie. Le vaccin est administré à l'automne, avant la saison des pluies. Le vaccin est administré à tous les animaux du troupeau, à l'exception des animaux atteints de la maladie. Le vaccin est administré à l'automne, avant la saison des pluies.

Le vaccin est administré à tous les animaux du troupeau, à l'exception des animaux atteints de la maladie. Le vaccin est administré à l'automne, avant la saison des pluies.

Le vaccin est administré à tous les animaux du troupeau, à l'exception des animaux atteints de la maladie. Le vaccin est administré à l'automne, avant la saison des pluies.

Le vaccin est administré à tous les animaux du troupeau, à l'exception des animaux atteints de la maladie. Le vaccin est administré à l'automne, avant la saison des pluies.

.../...

ANNEXE

LISTE DU MATERIEL UTILISE

- Canne de verre de 8 mm 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 Wolf 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 clamp de 6 cm,,
- Filtres Seitz de 100 cm³, membranes EKS 1 correspondantes,
- Diffuseur d'air (SOVIREL),
- Tubes de jonction rodés mâles et femelles QUICKFIT (87/16),
- Tubes de jonction rodés mâles et femelles SOVIREL (14/23),
- Tubes souples rhodorsil résistant aux conditions de stérilisation (Ø intérieur 8mm),
- 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...
- Bactériologiste en état de marche.