

ZV000 1183

**R A P P O R T**

---

**MISSION CONSULTATION FAO  
du 1er au 30 JUILLET 1988**

**au Laboratoire de Pathologie animale  
de Bingerville (Côte d'Ivoire)**

**J. SARR**

## **I. INTRODUCTION**

Le Laboratoire de Pathologie animale de Bingerville est un des douze principaux laboratoires africains producteurs de vaccins vétérinaires.

Compte tenu de l'importance de l'aviculture dans le pays (26 000 000 volailles) constituée pour près de 80 % d'élevages de type industriel, le secteur de la production de vaccins aviaires revêt une importance particulière. Les besoins en vaccins contre les principales maladies présentant un caractère épizootique que sont la maladie de Newcastle, la Variole aviaire et la Maladie de Gumboro, justifient largement l'implantation d'une unité performante de production et de contrôle de qualité des vaccins.

C'est dans ce cadre, que le projet FAO TCDC/TCP/RAF/6768 a prévu une assistance à ce Laboratoire, pour renforcer cette production.

Cette mission qui s'est déroulée du 1er au 30 juillet visait les objectifs suivants :

- assister le Laboratoire de Pathologie animale de Bingerville pour améliorer la production de vaccins contre la Maladie de Newcastle et la Variole aviaire ;
- apprécier les conditions locales de travail et y apporter les modifications permettant d'améliorer la production de vaccins et le contrôle de qualité ;
- encadrer les techniciens chargés de la production pour améliorer leur formation ;
- élaborer ou améliorer les protocoles standard de production de vaccins.

L'ensemble de ces points fait l'objet de ce rapport.

.../...

## II. SITUATION GENERALE

### 1. Le personnel

- 1 Docteur vétérinaire,
- 2 Techniciens,
- 2 Garçons de laboratoire (laverie et stérilisation),
- 1 Manoeuvre pour l'entretien des poulaillers.

Ce personnel s'occupe du Laboratoire de Virologie :

- contrôle de qualité des vaccins,
- diagnostic viral,
- production de vaccins Newcastle, Variole aviaire et Peste bovine et de l'ensemble des cultures cellulaires.

Il n'y a pas de séparation entre les différentes unités par manque de personnel. Le manque d'expérience de ce personnel constitue également un handicap (le docteur vétérinaire a moins d'un an d'expérience).

### 2. Equipements

Bons dans l'ensemble.

- Hottes à flux laminaire : 3
- Etuve à CO<sub>2</sub> : 1
- Congélateurs à -70°C : 2
- Autoclaves : 3
- Appareil à eau bidistillée : 1
- Etuves : 1 chambre-étuve  
1 étuve à 37°C
- Fours pasteurs : 2
- Matériel ELISA : 2 lecteurs multiskan + petits équipements divers
- Matériel de filtration pour milieux de culture performant
- Couveuses : 2
- Centrifugeuses : 3
- Balances de précision : 3
- Phmètre : 1

- Lyophilisateurs : 2
- Microscopes : 2
- Chambres à congélation -30°C : 2
- Chambre froide +4°C : 1
- Congélateurs -30°C : 2
- Réfrigérateurs : 3

Les locaux sont bien disposés et sont très fonctionnels.

### 3. Financement

- Fonds publics : le budget alloué est beaucoup trop faible pour soutenir une production.

Le manque de trésorerie est un très grand handicap.

Par exemple : toutes les interventions d'entreprises privées (réparations, installations, nécessitent la production d'un titre de créance avant le début des travaux). Ces titres de créance sont établis par le Trésor public (Ministère des Finances).

### 4. Problèmes liés à la situation générale

- manque d'expérience du personnel,
- manque de cadres et de techniciens,
- manque de trésorerie,
- l'absence d'un Service de Maintenance interne au Laboratoire de Bingerville.

### III. VACCINS AVIAIRES

#### A/ L'élevage aviaire

200 pondeuses sont élevées au Laboratoire pour la fourniture d'oeufs pour les besoins du secteur Production de vaccins contre la maladie de Newcastle, la Variole aviaire et pour les diagnostics.

Il s'agit de poulets de race Leghorn âgés de 7 mois environ, élevés dans des conditions d'hygiène relativement bonnes, mais vaccinés contre la maladie de Newcastle et la Variole aviaire, compte tenu de la proximité du poulailler expérimental du Service de Pathologie aviaire mais aussi d'élevages de type industriel appartenant à des entreprises privées.

#### B/ Vaccin contre la maladie de Newcastle

Le Laboratoire dispose de deux souches :

- Lasota,
- HB1 (Hitchner B1).

Ces souches sont stockées sous forme de liquide chorio-allantoïdien congelé à -20°C et servent de lots de semence.

##### 1. Epreuve d'activité

Ces lots ont été soumis à une épreuve d'activité sur oeufs embryonnés de 9 jours.

Les tests sont menés en double sur des oeufs provenant du poulailler du Laboratoire (LPA) d'une part et sur des oeufs provenant d'une société privée productrice de poussins (la SIPRA) d'autre part.

a) HB1 (Hitchner B1)

- sur oeufs LPA

Dilution	Nombre d'oeufs	Morts	Survivants
$10^{-5}$	6	0	6
$10^{-6}$	6	0	6
$10^{-7}$	6	0	6
$10^{-8}$	6	0	6
$10^{-9}$	6	0	6
Témoin	6	0	6

- sur oeufs SIPRA

Dilution	Nombre d'oeufs	Morts	Survivants
$10^{-5}$	5	0	5
$10^{-6}$	5	1	4
$10^{-7}$	5	0	5
$10^{-8}$	5	0	5
$10^{-9}$	5	0	5
Témoin	5	0	5

La  $DIE_{50}$  (dose infectante 50 % pour des embryons de 9 jours) est inférieure à  $10^{-5}$  / 0,1 ml d'inoculum.

.../...

b) La souche LASOTA

- sur oeufs LPA

Dilution	Nombre d'oeufs	Morts	Survivants
$10^{-5}$	6	0	6
$10^{-6}$	6	0	6
$10^{-7}$	6	0	6
$10^{-8}$	6	0	6
$10^{-9}$	6	0	6
Témoin	6	0	6

- sur oeufs SIPRA

Dilution	Nombre d'oeufs	Morts	Survivants
$10^{-5}$	5	0	5
$10^{-6}$	5	0	5
$10^{-7}$	5	0	5
$10^{-8}$	5	0	5
$10^{-9}$	5	0	5
Témoin	5	0	5

La  $DIE_{50}$  est également inférieure à  $10^{-5}$  / 0,1 ml d'inoculum pour la souche Lasota.

.../...

## 2. Recherche d'antigène sur les lots de semence

Un titrage de hémagglutinine a été effectué sur les lots de HB1 et de Lasota.

	Dilution	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280
HB 1	1	+	+	+	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-
LASOTA	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	-	-
Ag de référence	1	+	+	+	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-

### Matériel et méthode :

- Serum Q 8,5 p.1000
- Globules rouges de poulets 0,5 p.100
- Incuber 1 heure à la température Laboratoire.

### Les titres obtenus sont :

- HB 1 → 1/160<sup>e</sup>
- Lasota → 1/320<sup>e</sup>
- Antigène de référence fourni par le Laboratoire de Pathologie aviaire → 1/320<sup>e</sup>

.../...

3. Recherche d'anticorps anti Newcastle dans le sérum des poules pondeuses du Laboratoire de Pathologie animale :

a) Titration de l'antigène de référence (HA<sub>50</sub>)

Dilution de départ de l'antigène : 1/320<sup>e</sup>

Dilution	1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-

HA<sub>50</sub> (dilution hémagglutinant 50 % des globules rouges à 0,5 %) sont utilisées pour le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) soit  $1/320 \times 5/4 = 1/256^e$

4 HA = 1/256 <sup>e</sup>
---------------------------

**b) Titration des sérums des pondeuses en IHA**

Le sang de 20 pondeuses est prélevé par vacutainer à la veine de l'aile. Après coagulation, le sérum est récolté, inactivé à 56°C pendant 30 minutes.

Serums	HA	IHA
1	0	1/10 <sup>e</sup>
2	0	1/80 <sup>e</sup>
3	0	1/40 <sup>e</sup>
4	0	1/160 <sup>e</sup>
5	0	1/80 <sup>e</sup>
6	0	1/160 <sup>e</sup>
7	0	1/80 <sup>e</sup>
8	0	1/80 <sup>e</sup>
9	0	1/40 <sup>e</sup>
10	0	1/160 <sup>e</sup>
11	0	1/80 <sup>e</sup>
12	0	1/20 <sup>e</sup>
13	0	1/80 <sup>e</sup>
14	0	1/160 <sup>e</sup>
15	0	1/80 <sup>e</sup>
16	0	1/40 <sup>e</sup>
17	0	1/80 <sup>e</sup>
18	0	1/80 <sup>e</sup>
19	0	1/40 <sup>e</sup>
20	0	1/80 <sup>e</sup>

.../...

c) Recherche d'anticorps dans les oeufs embryonnés

La qualité des oeufs (recherche d'anticorps) est effectuée par l'épreuve d'IHA (inhibition de l'hémagglutination) du liquide vitellin d'oeufs embryonnés de 10 jours. Ces tests sont réalisés parallèlement sur oeufs du Laboratoire (LPA) et sur oeufs de la SIPRA.

	N° oeuf	HA	IHA
LPA	5	0	> 1/320 <sup>e</sup>
	6	0	1/160 <sup>e</sup>
	7	0	1/80 <sup>e</sup>
	8	0	1/40 <sup>e</sup>
	9	0	> 1/320 <sup>e</sup>
	10	0	

SIPRA	1	0	> 1/320 <sup>e</sup>
	2	0	> 1/320 <sup>e</sup>
	3	0	> 1/320 <sup>e</sup>
	4	0	> 1/320 <sup>e</sup>

Nota : > = titre supérieur à

d) Conclusion

Le titre en anticorps anti Newcastle est beaucoup trop élevé dans les oeufs produits au niveau du Laboratoire et de la SIPRA pour permettre la production de virus..

Le virus présent dans l'inoculum se trouve vite neutralisé.

Ceci explique les faibles résultats obtenus dans les tests d'activité.

.../...

4. Epreuve de caractérisation des souches

Les souches Lasota et HB1 n'ayant entraîné aucune mortalité lors des tests d'activité, l'index de pathogénicité a été contrôlé par voie intracérébrale sur des poussins d'un jour provenant de la SIPRA.

a) Souche HB1

Date	18	19	20	21	22	23	24	25	26	Total	Coefficient	Somme
Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8			
Normaux	10	10	10	10	10	10	10	10	10	80	0	0
Malades	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Morts	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
										80		0

$$\text{Index} = \frac{\text{Somme}}{\text{Total}} = \frac{0}{80} = 0;00$$

Matériel et méthode :

- Souche diluée à  $10^{-1}$  dans eau Q 8,5 p.100
- Inoculation 0,1 ml / IC
- Témoins 0,1 ml / IC d'eau Q

b) Souche Lasota : (INVC) = Index de neurovirulence par voie intracérébrale.

Date	18	19	20	21	22	23	24	25	26	Total	Coefficient	Somme
Jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8			
Normaux	10	10	10	10	10	10	10	10	10	80	0	0
Malades	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Morts	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
										80		0

$$\text{Index} = \frac{\text{Somme}}{\text{Total}} = \frac{0}{80} = 0,00$$

Aucune mortalité n'est également observée chez les 10 témoins inoculés avec le sérum physiologique.

Conclusion

Les poussins sont issus de mères vaccinées. Cependant, il est probable que les lots de semence soient exempts de virus adventices (adénovirus, laryngotracheite, encéphalomyélite, etc...), compte tenu des résultats obtenus dans les tests d'activité et de l'index de neurovirulence sauf si les mères étaient également immunisées contre ces différents virus. Les réactifs pour conduire ces tests ne sont pas disponibles.

5. Tests de stérilité bactériologique

Les lots de HB1 et de Lasota ont été testés pour leur stérilité bactériologique mycoplasémique et fongique en bouillon tryptose, en bouillon thioglycolate et en milieu de Sabouraud. Trois tubes ont été ensemencés pour chaque lot avec 0,5 ml de semence.

Lots	Bouillon tryptose	Thioglycolate	Sabouraud
HB 1	- - -	- - -	- - -
Lasota	- - -	- - -	- - -

Le tout est incubé à 37°C pendant 4 jours.

Observation : pas de contamination.

6. Conclusion générale concernant les vaccins contre la maladie de Newcastle

Il n'y a pas d'oeufs provenant d'animaux sensibles à la maladie de Newcastle en Côte d'Ivoire.

L'importation d'oeufs semble pour le moment la seule solution pour produire du vaccin en attendant l'acquisition d'une unité SPF.

.../...

C/ **Vaccin contre la Variole aviaire**

Une souche vaccinale de Variole aviaire est disponible au niveau du Laboratoire.

Cette souche a été également contrôlée pour :

- son pouvoir hémagglutinant les globules rouges de poulet,
- sa stérilité bactériologique, fongique et mycoplasmique,
- la présence de virus adventices,
- son activité sur oeufsemyonnés de 12 jours.

1. **Fabrication d'antigène pour l'hémagglutination**

30 oeufs embryonnés de 12 jours provenant de la SIPRA sont infectés par une suspension de virus variolique à la dilution  $10^{-3}$  (souche du Labo). Au bout de 3 jours, les membranes chorio-allantoïdiennes sont récoltées, lavées en sérum physiologique, puis broyées (au mixer virtis).

Le broyat est suspendu dans une solution saline de 8,5 p.1000 de CINA contenant 1 % de sérum de lapin inactivé à 56°C pendant 30 minutes à raison de 2 ml de solution par membrane, puis centrifugé à 2 500 tours/mn pendant 15 minutes. Le surnageant sert comme antigène.

.../...

## 2. Titration de l'antigène par HA

Dilution		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antigène	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Souche de départ	1	+	+	-	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-
	6	+	+	-	-	-	-	-	-

Le titre de l'antigène obtenu est beaucoup trop faible. C'est donc la souche de départ qui sera utilisée à la dilution 1/4<sup>e</sup> pour les autres tests de contrôle.

Les poules pondeuses de la SIPRA sont également vaccinées contre la Variole aviaire ; c'est ce qui explique le mauvais titre obtenu par l'antigène.

## 3. Recherche d'anticorps chez les pondeuses de la LPA

Le test d'inhibition de l'hémagglutination est utilisé pour évaluer l'immunité contre la Variole aviaire des pondeuses du Laboratoire.

Pour cela, les 20 sérums prélevés pour les tests sur la Maladie de Newcastle ont été traités comme suit :

.../...

- inactivation 56°C 30 minutes,
- 0,2 ml de chaque sérum est mélangé à 0,2 ml d'une suspension de globules rouges de poulet à 20 %.

Au mélange, on rajoute 0,6 ml de solution saline 8,5 p.1000 de ClNa contenant 1 % de sérum de lapin.

Le mélange est incubé 1 heure à +4°C puis centrifugé à 1 500 tours/mn pendant 10 minutes.

Le surnageant est utilisé comme sérum dilué au 1/5<sup>e</sup>. L'inhibition de l'hémagglutination consiste à mélanger :

- 50 µl de serum à tester,
- 50 µl d'antigène,
- 50 µl de globules rouges de poulet à 1 %.

Incuber l'ensemble 1 heure à la température du laboratoire.

a) Sérums des poules pondeuses de la LPA

N° sérum	HA	IHA
1	0	> 1/320
2	0	1/80
3	0	1/20
4	0	1/80
5	0	1/160
6	0	-
7	0	1/40 <sup>e</sup>
8	0	1/10 <sup>e</sup>
9	0	0
10	0	0

Les titres en anticorps inhibant l'hémagglutination restent dans l'ensemble relativement élevés.

.../...

b) Recherche d'anticorps dans les oeufs embryonnés

Le liquide du sac vitellin de chaque oeuf embryonné de 10 jours, est prélevé, centrifugé et traité dans les mêmes conditions que les sérums de poulet.

Les résultats des tests sont regroupés dans le tableau suivant :

	HA	IHA
1	0	> 1/640
2	0	> 1/640
Oeufs SIPRA 3	0	> 1/640
4	0	> 1/640
	HA	IHA
5	0	> 1/640 <sup>e</sup>
6	0	> 1/640 <sup>e</sup>
Oeufs LPA 7	0	1/10 <sup>e</sup>
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Nota : > : Titre supérieur à la dilution ci-dessus.

Conclusion :

Les oeufs de la SIPRA et du Laboratoire de Bingerville ne peuvent être utilisés actuellement pour la production de vaccins contre la Variole aviaire compte tenu des titres encore élevés en anticorps anti Variole aviaire.

Des contrôles réguliers devront permettre de connaître à partir de quelle période ces oeufs pourront être utilisés.

En attendant, l'importation d'oeufs dépourvus d'anticorps anti-variologiques semble être la seule solution.

4. Test d'activité de la souche variolique sur oeufs de LPA

Chaque oeuf embryonné de 12 jours reçoit une suspension de virus de 0,1 ml.

L'ensemble est incubé 4 jours à 37°C.

Dilution	Nombre d'oeufs	Morts	Survivants	Totaux cumulés		
				Morts	Survivants	%
10 <sup>-1</sup>	6	0	6			
10 <sup>-2</sup>	6	1	5			
10 <sup>-3</sup>	6	0	6			
10 <sup>-4</sup>	6	0	6			
10 <sup>-5</sup>	6	0	6			
10 <sup>-6</sup>	6	0	6			

Le mauvais titre obtenu s'explique par les taux élevés d'anticorps dans les oeufs.

5. Test de stérilité de la souche

Trois milieux sont utilisés :

- bouillon tryptose,
- bouillon thioglycolate
- milieu de Sabouraud.

	Bouillon tryptose	Bouillon thioglycolate	Milieu du Sabouraud
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-

Après 4 jours d'incubation à 37°C les résultats suivants ont été obtenus.

Observation : absence de contamination.

.../...

6. Tests de séroneutralisation

En l'absence d'oeufs provenant d'élevages sensibles à la Variole aviaire, l'aspect théorique de la séroneutralisation comme test de contrôle a été discuté à partir d'études de cas.

Les calculs statistiques ont été à chaque fois appliqués et les résultats obtenus comparés à ceux obtenus par l'IHA (inhibition de l'hémagglutination).

Ces techniques relativement simples pourront donc être utilisées lorsque des oeufs provenant d'élevages sensibles à la maladie de Newcastle et à la Variole aviaire seront disponibles.

.../...

#### IV. CONCLUSION GENERALE

De nombreux vaccins aviaires ne confèrent pas une immunité complète du fait de leur faible teneur en virus.

Les raisons pouvant expliquer cette situation sont nombreuses :

- utilisation d'oeufs ayant des taux élevés d'anticorps,
- infection d'oeufs embryonnés à très forte multiplicité d'infection,
- contaminations,
- manque de précautions pendant les récoltes (mélange de liquide allantoïdien avec l'albumine ou le contenu du sac vitellin lorsque ce dernier contient des anticorps) dans le cas de la maladie de Newcastle,
- absence de contrôle de la qualité des vaccins produits, etc...

C'est pourquoi, les efforts ont surtout été portés non seulement sur le contrôle de la qualité des lots de semence mais aussi sur la qualité du matériel biologique de travail.

L'un des problèmes majeurs du Laboratoire de Bingerville, demeure l'obtention d'oeufs provenant d'animaux sensibles à la Variole aviaire et à la maladie de Newcastle.

Le manque numérique et d'expérience du personnel interdisent également pour le moment du moins, une restructuration du service de Virologie pour tenir compte de l'ensemble des activités : (production, contrôle, diagnostic, etc...).

Les problèmes liés à la maintenance des équipements peuvent être en partie résolus grâce à la mise en place d'une caisse d'avance qui pourrait être directement gérée par le Laboratoire.

.../...

Enfin, une assistance financière de l'Etat ivoirien devrait permettre de résoudre ce problème.

La FAO pourrait également y apporter une contribution extrêmement importante en fournissant une assistance technique accrue, ne serait-ce que pendant la phase de démarrage par la mise en place d'un projet de type TCP.

Les efforts devront permettre d'ici à deux ans au Laboratoire de Pathologie animale de Bingerville de produire des vaccins de qualité pour satisfaire les besoins de la Côte d'Ivoire.

.../...

## V. RECOMMANDATIONS

- Acquisition d'une unité SPF pour la production d'oeufs.
- Remise en état du groupe électrogène pour palier aux coupures de courant.
- Remise en état des deux lyophilisateurs et fourniture de pièces de rechange (matériel Edwards) par l'envoi d'un spécialiste.
- Acquisition d'un nouveau lyophilisateur d'une grande capacité.
- Fourniture par le Centre régional de Contrôle de Vaccins :
  - . du sérum anti NDV de référence,
  - . une souche pathogène de référence NDV pour les épreuves,
  - . des souches de semence HB1, Lasota et Variole aviaire.
- Détachement d'un expert pour une durée de 2 ans, pour conduire la production, le contrôle de qualité et la surveillance de l'Unité SPF.

Il assurera également pendant son séjour la formation d'une relève autochtone.
- Meilleure séparation des différentes unités au sein du service de Virologie.
- Aménagement de locaux permettant de conduire les tests d'épreuve sur animaux.
- Acquisition de moyens financiers permettant de faire face aux urgences (gestion d'une caisse d'avance par exemple).