

**PREPARATION D'UN VACCIN ANTI-APHTEUX
CONCENTRE INACTIVE TRIVALENT O-A-SAT 1
AVEC DES VIRUS DE CULTURE OBTENUS SUR
LIGNEE CELLULAIRE DE REIN
DE HAMSTER BHK 21 DE MACPHERSON
ET STOCKER**

par

M. AMIGHI ()*. * *

Le virus antigène, utilisé dans la préparation des vaccins anti-aphteux inactivés, provient:

-- soit de la récolte d'aphtes primaires développés sur bovin neuf par inoculation intra-dermolinguale de virus (méthode Waldmann),

-- soit de la culture du virus aphteux sur la génisse préalablement inoculée avec le virus de la vaccine (complexe vaccino-aphteux de Belin),

— soit de la culture d'un virus bovin adapté à l'épithélium bovin maintenu en survie (méthode de Frenkel),

— soit, enfin, de virus multiplié sur des cellules cultivées in vitro selon la méthode de Dulbecco et Vogt (1). Cette dernière méthode a fait, au cours de ces dernières années, l'objet de nombreux travaux (2, 3, 4, 5, 6). Nous avons nous-mêmes préparé un vaccin sur cellules primaires de rein de mouton (7). Nous donnons ici un compte rendu sommaire de la préparation

(*) Institut d'Etat des Sérums et Vaccins Razi, B.P. 656, Téhéran (Iran). Directeur général: Dr. A. Rafyi. (Avec la collaboration technique de M. Hessami, M. Mastan et A. Chafyi).

(* *) *Bull. Off. int. Epiz.* 1964, 61 (9-10). 935-914. *XI^e Conférence de la Commission permanente de la Fièvre aphteuse de l'O. I. E.*

d'un vaccin polyvalent O, A, SAT 1 dans lequel les virus antigènes ont été, selon les directives de Mowat et Chapman (8), obtenus sur la lignée rénale de hamster (BHK 21) de Macpherson et Stocker (9).

I. — MATERIEL ET METHODES.

a) *Souche cellulaire BHK 21.*

Cette lignée qui avait été récemment importée à Alfort du laboratoire de Macpherson et Stocker a été transférée à l'Institut Razi en mai 1963. Comme nous ne l'avons pas entretenue en milieu de Eagle dans les conditions classiques de laboratoire décrites par ces auteurs, nous décrivons ci-dessous les conditions de sa culture et la technique de son utilisation en Iran.

b) *Milieux de culture.*

1. Le milieu de croissance et le milieu d'entretien sont constitués par la solution saline de Hanks contenant 5 grammes/litre d'hydrolysate de lactalbumine, 1 gramme/litre d'extrait de levure auquel on ajoute 3 à 4 p. 100 de sérum de veau inactivé à 56°C pendant 30 minutes. Ce milieu contient en outre les antibiotiques, pénicilline, streptomycine et mycostatine aux concentrations habituelles.

2. Pour conserver les cellules à - 60° C, nous avons employé le milieu de Eagle contenant 20 p. 100 de sérum de veau, 10 p. 100 de Tryptophosphate et 10 p. 100 de glycérine, les cellules ayant été trypsinées selon la technique classique ou avec addition d'inhibiteurs (10). Avec l'une ou l'autre méthode nous avons pu les conserver, pendant des délais d'au moins cinq mois.

3. Les passages sont effectués avec un mélange de typsiine à la dose de 1,5 gramme/litre et de versène à celle de 1,2 gramme/litre dans la solution de P.B.S. (Phosphate buffer solution) sans Ca ni Mg.

La dispersion des cellules d'une boîte de Roux est obtenue en quelques minutes avec 4 millilitres de ce mélange. Le milieu de culture est ajouté aussitôt sans lavage. A chaque passage, la multiplication des surfaces peut atteindre dix fois la surface initiale. Dans ces conditions, la couverture complète est obtenue en 4 jours à 37° C.

4. Pour la culture du virus aphteux, on remplace, le troisième ou le quatrième jour, le milieu de croissance par le milieu de Earle, constitué de

la solution saline de Earle à laquelle ont été ajoutés l'hydrolysate de lactalbumine et l'extrait de levure dans les mêmes proportions que dans le milieu de croissance; mais ce milieu est utilisé sans sérum. Les titres de virus obtenus avec le milieu de Earle au pH de 7,4-7,5 sont, en effet, supérieurs à ceux que l'on obtient avec le milieu de Hanks sans sérum (pH 7). Le moment optimum de la récolte du virus se situe, comme l'avait noté Sellers, lorsque le maximum des cellules est détruit, environ de la seizième à la vingtième heure (11).

c) *Virus utilisés.*

Ce sont des virus bovins, récoltés et identifiés en Iran pour les trois types O, A et SAT 1. Ils ont été utilisés soit après adaptation directe sur cellules BHK 21, soit après adaptation préalable sur cellules rénales primaires de mouton; dans le premier cas, au quatrième ou cinquième passage et, dans le second, au bout de 5 passages dont deux sur cellules rénales de mouton et trois sur cellules (BHK) 21. Ces virus, cultivés sur cellules (BHK) 21, ont été titrés sur cellules rénales primaires de mouton. Leurs titres ont été, pour le type O, de 10^{-8} à $10^{-8,5}$ DICT 50/ml, pour le type A de $10^{-7,8}$ à $10^{-8,5}$ et pour le type SAT 1 de $10^{-7,6}$ à $10^{-8,2}$, calculés selon la méthode de Reed et Munch. Ces virus fixent totalement le complément jusqu'à la dilution du 1/8, parfois jusqu'au 1/16; la plupart du temps on observe à cette dilution une hémolyse partielle.

d) *Technique de préparation du vaccin.*

On prépare séparément un vaccin bivalent O, A et un vaccin monovalent SAT 1 que l'on mélange ensuite. Sur gel d'alumine, préalablement stérilisé à 120° C pendant 30 minutes, refroidi à 25° C et amené à un pH de 8,5 par tamponnement avec du glyco-colle, on adsorbe le virus O après filtration sur un filtre clarifiant C 5. Dix minutes après, on adsorbe le virus A filtré dans les mêmes conditions. Après mélange, pendant 30 minutes, on ajoute du formol de façon à obtenir une concentration finale de 0,4 ml pour 1.000 millilitres de vaccin. 15 minutes après cette addition, on ajoute une certaine quantité de saponine amenée à pH 7,5 par un tampon au glyco-colle. 15 minutes après, on termine par une addition de glycérine de façon à ce que le vaccin en contienne une quantité de 10 p. 100. Le mélange est atténué pendant 48 heures à 25° C. Le pH final du vaccin triva-

lent, après mélange au vaccin monovalent SAT 1, est de 8,3. Le stockage du vaccin se fait à + 4° C.

e) *Méthodes de contrôle.*

Après le contrôle bactériologique, le vaccin est injecté à des bovins neufs qui en reçoivent chacun une dose répartie dans l'épithélium lingual et 3 doses en injection sous-cutanée pour apprécier son innocuité.

L'épreuve d'efficacité est effectuée, 3 semaines après la vaccination, par l'infection aux mêmes bovins en deux points séparés de la muqueuse linguale, et sous un volume de 1/10 ml pour chacun d'eux, de 10.000 DI 50 p. 100 de chacun des virus titrés sur bovins neufs. Des animaux neufs non vaccinés, inoculés dans les mêmes conditions, servent de témoins. La lecture finale est effectuée le septième jour qui suit l'épreuve. Ce contrôle a été complété par la mesure du taux des anticorps. On en vérifie l'absence avant les épreuves et la présence à des taux significatifs dans le sang prélevé le vingt et unième jour après la vaccination, au moment de l'inoculation du virus d'épreuve. Le taux des anticorps est évalué d'après la méthode de séro-neutralisation «sérum variable--virus fixe» décrite par les auteurs de l'Institut Français de la Fièvre Aphteuse (12), chaque tube de culture contenant 10 unités DICT 50 de virus. Nous avons utilisé pour ces épreuves des virus adaptés à une lignée de cellules rénales de porc sur laquelle les effets cytopathogènes sont nettement lisibles, les virus titrant respectivement en moyenne: O: $10^{-6,33}$ ml, A: $10^{-5,5}$ ml, SAT 1: $10^{-6,6}$ ml et dont la sensibilité au virus SAT 1 d'Asie est décrite ailleurs (13). Des épreuves préalables de séro-neutralisation avec les virus O, A et SAT 1 ont été faites sur le cobaye avec la même technique et la même lignée cellulaire.

II — RESULTATS.

Les résultats sont notés dans les Tableaux I, II et III. Précisons que les sérums des animaux ne contiennent pas d'anticorps avant les épreuves.

Résultats des observations faites sur le cobaye.

Dix-huit cobayes, d'un poids moyen de 400 grammes, ont reçu en injection sous-cutanée un millilitre de vaccin. La séro-neutralisation pratiquée

TABLEAU I

Virus O

Dose de vaccin inoculée aux animaux vaccinés	N° des animaux	Lésions linguales primaires	Lésions buccales secondaires	Lésions podales secondaires	TAUX D'ANTICORPS		
					O	A	SAT 1
7,5 ml	1919 197	-	--	-(---)	>1,8	1,7	1,55
				-(---)	>1,8	1,7	1,1
10 ml	1934 1950 199	,		-(---)	1,31	1,43	1,2
				-(---)	>1,8	1,44	1,05
				-(---)	1,56	1,22	1,35
15 ml	1981 1953	,		-(---)	>1,8	1,7	1,2
				-(---)	>1,8	1,8	1,24
Témoins	1959 1994 1804 1805		+	+(+++)			
				+(+++)			
				+(+++)			
				+(+++)			

sur les sérums prélevés avant vaccination avec les virus O, A et SAT 1 n'a pas révélé la présence d'anticorps.

Le vingt et unième jour, un mélange des sérums de 3 cobayes a donné les taux suivants:

O : $10^{-1,8}$ $10^{-1,43}$ $10^{-1,13}$ $10^{-1,4}$ $10^{-1,35}$ 10^{-2} .

A : $10^{-1,8}$ $10^{-1,7}$ $10^{-1,25}$ $10^{-1,3}$ $10^{-1,1}$ 10^{-57} .

SAT 1 : $10^{-1,2}$ $10^{-1,1}$ $10^{-1,3}$ $10^{-1,25}$ $10^{-1,2}$ $10^{-1,1}$.

Éprouvés avec les virus O, A et SAT 1 adaptés aux cobayes, les cobayes vaccinés, à l'inverse des témoins, n'ont pas manifesté de lésions de généralisation.

TABLEAU II
Virus A

Dose de vaccin inoculée aux animaux vaccinés	N° des animaux	Lésions linguales primaires	Lésions buccales secondaires	Lésions podales secondaires	TAUX D'ANTICORPS		
					O	A	SAT 1
7,5 ml	1908	--	--	--(-----)	>1,8	>1,8	1,43
	1924	+	--	(-----)	1,65	1,1	1,12
10 ml	1907	--	--	--(-----)	1,65	1,9	1,22
	1911	+	+	(-----)	1,72	1,6	1,24
	1999	+	--	(-----)	>1,8	>1,8	1,35
15 ml	1904	+	--	--(-----)	1,8	1,6	1,1
	1971	+	--	(-----)	1,7	1,4	1,2
	1974	--	--	(-----)	1,71	1,67	1,2
Témoins	1902	+	+	+(+++)			
	1913	+	+	+(+++)			
	1801	+	+	+(+++)			
	1802	+	+	+(+++)			

DISCUSSION.

Mowat et Chapman ont préconisé l'utilisation de la lignée cellulaire BHK 21 pour la production de virus nécessaire à la préparation de vaccins. Les essais, décrits ici, nous ont donné des résultats qui confirment le bien-fondé de leur attente. La qualité immunigène élevée des virus ainsi propagés nous a permis de faire un vaccin concentré à 3,5 ml par valence, alors que sur cellules primaires de mouton le vaccin n'était actif que sous un volume beaucoup plus grand (15 millilitres par valence).

Les titres élevés que nous avons constatés avec les virus obtenus de cette façon nous paraissent liés non seulement à la quantité, à l'évidence plus grande, des cellules BHK 21 par rapport aux cellules de mouton, mais aussi à la fixité de pH de 7,4 à 7,5 obtenu par l'utilisation du milieu de Earle sans sérum, utilisé sans CO², que s'équilibre à un pH favorable à la multip-

TABIEAU III
Virus SAT 1

Dose de vaccin inoculée aux animaux vaccinés	N° des animaux	Lésions linguales primaires	Lésions buccales secondaires	Lésions podales secondaires	TAUX D'ANTICORPS		
					O	A	SAT 1
7.5 ml	1982	--	---	--(-----)	1,65	>1,8	1,23
	1960	+	---	--(-----)	1,2	1,42	0,9
10 ml	1964	+	-	--(-----)	1,7	1,43	1,12
	1986	+	-	--(-----)	>1,8	>1,8	1,05
	1998	+	-	--(-----)	>1,8	1,6	1,29
15 ml	1944	+		--(-----)	>1,8	1,55	1,2
	1979			--(-----)	1,6	1,23	1,35
Témoins	1991	+	+	+(+ + ---)			
	1980	+	+	+(+ ---)			
	1803	+	+	+(+ + ---)			
	1806	+	+	+(+ + + +)			

lication et à la conservation du virus aphteux.

En ce qui concerne le taux des anticorps, il est à noter qu'il se montre toujours inférieur avec le vaccin SAT 1. Le comportement du bétail vacciné est identique au cours de l'épreuve virulente. Sur le cobaye, le taux des anticorps est également moins élevé avec le vaccin SAT 1.

RESUME

Un vaccin trivalent concentré, adsorbé sur hydroxyde d'alumine et saponiné, inactivé par le formol et la chaleur, a été préparé avec du virus de culture obtenu sur cellules de rein de hamster de la lignée BHK 21 de Macpherson et Stocker.

Les épreuves de ce vaccin sur bovins neufs vaccinés montrèrent une résistance sensiblement identique aux 3 virus, alors que le taux correspondant des anticorps fut nettement moins élevé contre le type SAT 1 que contre les types O et A.

SUMMARY

A trivalent concentrated vaccine, adsorbed on aluminium hydroxide, with saponin and inactivated by formol and heat, was prepared with virus cultured on Macpherson and Stocker BHK 21 line hamster kidney cells.

Tests carried out on cattle with this vaccine showed resistance to an exactly similar degree against each of the three viruses, while the antibody titres for type SAT 1 were clearly lower than those for types O and A.

RESUMEN

Se ha preparado una vacuna trivalente concentrada adsorbida en hidróxido de alúmina y saponificada, inactivada con el formol y calor, con virus de cultivo obtenido en células renales de hamster de la línea BHK 21 de Macpherson y Stocker.

Las pruebas de la vacuna en bovinos nuevos vacunados pusieron de manifiesto una resistencia sensiblemente idéntica a los tres virus, mientras que el índice correspondiente de los anticuerpos fue netamente menos elevado contra el tipo SAT 1 que contra los tipos O y A.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Docteur Santucci du Ministère français de l'Agriculture, en mission dans notre laboratoire, qui a mis à notre disposition les cellules de lignée BHK 21, ainsi que le Docteur Rafyi, Directeur Général de l'Institut Razi, pour les précieux conseils qu'il a bien voulu nous donner pour la rédaction de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. DULBECCO (R.) et VOGT (M.). — *J. exp. Biol.*, 1954, 99, 167.
2. CASTAGNOLI (B.), D'AMORE (A.) et FONTANELLI (E.). — *Atti Soc. Ital. vet.*, 1959, 13, 582-585.
3. CAPORALE (G.), GALASSI (D.) et GRANENZI (F.). — *Atti Soc. Ital. vet.*, 1959, 13, 585-588.

4. BALDELLI (B.) et BADIALI (L.). — *Atti Soc. Ital. vet.*, 1959, 13, 588-594.
5. UBERTINI (B.), NARDELLI (L.) et PANINA (G.). — *Bull. Off. int. Epiz.*, 1961, 55, 1433-1447.
6. ZAVAGLI (V.), MAZZARACCHIO (V.) et FONTANELLI (E.). — *RC. Ist. sup. Sanità*, 1960, 23, 1350-1356.
7. RAFYI (A.), AMIGHI (M.) et RAMYAR (H.). — *Bull. Off. int. Epiz.*, 1962, 57 (78), 1165-1169.
8. MOWAT (G. N.) et CHAPMAN (W. G.). — *Nature Lond.*, 1962, 194, 253-255.
9. MACPHERSON (I. A.) et STOCKER (M. G. P.). — *Virology*, 1962, 16, 147.
10. SANTUCCI (J.), HAAG (J.), CHOAY (J.) et THELY. — *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1962, 254, 955-957.
11. SELLERS (R. F.). — *Arch. ges. Virusforsch*, 1960, 9, 621-636.
12. LANG (R.), CAMAND (R.), FONTAINE (J.), PETERMANN (H. G.) et MACKOWIAK (C.). — *Symposium Virologie O.I.E.-A.I.S.M., Lyon 23-24 mai 1962*, 95-99.
13. Travail en cours de publication.