

## Production et contrôle de vaccins inactivés contre la Peste équine (\*)

par

C. STELLMANN, H. MIRCHAMSY, M. GIRAUD,  
H. FAVRE, J. SANTUCCI et H. GILBERT

La Peste équine est depuis longtemps une affection synonyme de désastre pour l'élevage équin (20) et les récentes épizooties du Moyen-Orient (1959) et d'Afrique du Nord (1965) ont alerté les responsables européens sur le danger périodique que court le cheptel équin européen (2, 3, 16, 18, 23).

Dans un pays récemment infecté, la vaccination systématique des équidés d'une région à l'aide de vaccin vivant paraît stopper le cours d'une épizootie mais l'exécution d'une telle vaccination doit être rigoureusement réglementée et contrôlée (2).

Dans un pays indemne, menacé directement par une épizootie, la vaccination à l'aide de vaccin vivant se heurte aux règlements internationaux et à l'éventualité, sans doute improbable, d'un retour de la souche vaccinale à la virulence; de ce fait, seuls les vaccins inactivés apporteraient la solution à ce problème (1, 12, 15) mais les contrôles de laboratoire doivent garantir l'innocuité totale d'un tel vaccin. Pour ce faire, nous avons expérimenté divers tests qui seront exposés dans ce travail.

### I. — MATERIEL ET METHODE

#### 1. *Choix de la souche de virus.*

Pour un vaccin inactivé, le choix de la souche est primordial car de nombreuses souches sont disponibles: les critères auxquels elles doivent répondre sont les suivants:

- Immunogènes pour les équidés;
- Spécifiques de l'épizootie menaçante: il faut donc actualiser les vaccins inactivés;
- D'une obtention facile en grande quantité et d'un rendement suffisant.

Nous avons utilisé des souches de type 9, cultivées sur cellules MS, telles que les souches S 2, 10/60 et une souche marocaine, qui répondent aux critères précédents.

#### 2. *Production du virus.*

Les cellules MS sont cultivées dans des flacons ROUX de 3,5 litres en milieu de

---

(\*) Bull. Off. int. Epiz., 1969, 71 (7-8) 1031-1057.

Earle - hydrolysate de lactalbumine à 5 g/litre - extrait de levure à 50 mg/litre et contenant 2 p. 100 de sérum de veau. Lorsque la couche cellulaire est complète, le virus estensemencé dans le milieu précédent (E.L.Y) contenant 1 p. 100 de sérum de veau. Le virus est récolté lorsque l'effet cytopathogène (ECP) est total sur l'ensemble de la couche cellulaire (13).

Une autre technique de production de virus consiste à mettre en culture les cellules MS trypsinées infectées: l'ECP apparaît après l'obtention d'une couche cellulaire complète (1).

La concentration en sérum de veau du milieu de production virale doit être faible pour éviter des sensibilisations éventuelles des animaux vaccinés.

Le virus produit est filtré sur plaques C 5 avant l'inactivation et le titre du virus après filtration est compris entre 6,5 et 7,5 DECP50/ml.

### 3. *Inactivation du virus.*

Les paramètres de l'inactivation que nous avons testée sont les suivants en fonction de résultats antérieurs (12):

- Concentration finale en formol à 40 p. 100: de 0,3 à 0,6 p. 1.000;
- Température: 25° ou 32° C  $\pm$  0,5° C;
- Durée de l'inactivation: 48 ou 72 heures.

### 4. *Préparation du vaccin.*

Le virus inactivé est additionné de gel d'hydroxyde d'alumine à la concentration finale de 1,35 p. 100 d'extrait sec et, éventuellement, de merthiolate à la concentration finale de 1/10.000. Le pH final du vaccin est compris entre 7,3 et 7,7°: les volumes de vaccin produits sont de 1 à 15 litres et nous conservons le vaccin à + 4° C.

### 5. *Chevaux.*

Les chevaux utilisés sont des chevaux de race commune dont on vérifie l'absence d'anticorps neutralisants par une saignée préalable (titre séroneutralisant inférieur ou égal à 0,3).

### 6. *Cobayes.*

Ce sont des jeunes cobayes albinos dont les poids varient en fonction du test utilisé.

### 7. *Souris.*

Ce sont des souris albinos pesant entre 15 et 25 g.

### 8. *Technique de séroneutralisant sur cellules MS.*

Les sérums à tester sont décomplémentés à 56° C durant 30 minutes, puis dilués

en milieu ELY: l'intervalle logarithmique de dilution est 0,6.

Le mélange sérum-virus est composé comme suit:

--- Dilution sérique .....	1 ml
--- Dilution virale contenant 1.000 à 4.000 DECP .....	1 ml
(ou 100 à 400 DECP .....	1 ml)

La neutralisation s'effectue à 37° C durant 2 heures 30. Après ce contact, le mélange neutralisé est réparti à raison de 0,1 ml par tube de cellules MS et nous inoculons 4 tubes de cellules MS par dilution sérique; chaque tube reçoit donc 50 à 200 DECP50 (ou à 20 DECP50). Les tubes-réaction et les tubes-témoin sont incubés à 37° C sur roller-tube.

La lecture microscopique finale des tubes est faite le 6<sup>e</sup> jour et le titre est exprimé par le logarithme décimal de l'inverse de la dilution sérique neutralisant 50 p. 100 l'ECP.

### 9. Fixation du Complément.

Le titrage des antigènes utilise des sérums diagnostiques, obtenus par hyperimmunisation de cobayes, à 2 unités sériques.

Les antigènes sont constitués par les cerveaux de souris ou de cobayes broyés (\*) au 1/10 en tampon véronal contenant 10 p. 100 de chloroforme, puis centrifugés (\*\*) à 4.000 tours/minute durant 15 minutes; le surnageant constitue l'antigène au 1/10 (21).

La technique de fixation du Complément est du type KOLMER à 2 unités de C' avec un temps de fixation de 30 minutes à 37° C et un temps de révélation de 30 minutes à 37° C (18).

## II. TESTS DE CONTROLE ET RESULTATS

### 1. RECHERCHE DE L'INFECTIVITÉ RÉSIDUELLE DU VIRUS APRÈS INACTIVATION.

Ce contrôle s'effectue sur un échantillon de virus inactivé, prélevé avant l'addition du gel et conservé 4 jours à + 4° C.

#### 1. Contrôle sur cellules MS.

##### a) Premier passage sur cellules MS.

Nous inoculons 6 flacons de cellules MS (\*) avec chacun 5 ml de virus inactivé: après une adsorption de 30 minutes à 37° C, durant lesquelles les flacons sont agités manuellement de temps en temps, nous ajoutons 100 ml par flacon de milieu ELY contenant 2 p. 100 de sérum de veau: le lendemain, le milieu est remplacé et les flacons

---

\* Ultraturax TP 18 Prolabo

\*\* Centrifugeuse réfrigérée MSE.

\* Flacon de ROUX de 1 litre.

sont contrôlés microscopiquement après 6 jours d'incubation à 37° C pour vérifier l'absence d'ECP. Les surnageants des 6 flacons sont alors mélangés et conservés à + 4° C: ils constituent le liquide de subculture.

b) Subculture.

-- Subculture sur cellules MS.

Nous répartissons le liquide de subculture dans 10 tubes (\*\*) de cellules MS à

TABLEAU I

Vaccin S<sub>1</sub> inactivé : Infectivité résiduelle sur cellules MS.

Concentration en formol : 0,3 p. 1000 - Température : 32° C - Durée : 72 heures.

	TITRE DU virus avant inactivation en DECP <sub>50</sub> /ml	1 <sup>er</sup> PASSAGE* flacon de cellules	SUBCULTURE		
			SUR CELLULES MS, tubes**	SUR SOURIS***	
				Subculture	Témoins inoculation****
1 <sup>er</sup> essai S <sub>1</sub> MS <sub>9</sub>	10 <sup>4,25</sup>	Aucun ECP	Aucun ECP	1/50 Fc' = 0	5/50 Fc' = 0
2 <sup>e</sup> essai S <sub>1</sub> MS <sub>11</sub>	10 <sup>7</sup>	Aucun ECP	Aucun ECP	1/50 Fc' = 0	1/50 Fc' = 0
3 <sup>e</sup> essai S <sub>1</sub> MS <sub>12</sub>	10 <sup>4,75</sup>	Aucun ECP	Aucun ECP	5/50 Fc' = 0	3/50 Fc' = 0
$\chi^2 = 1,573$ ddl = 6***** différence non significative p = 0,95					

Légende :

\*\* Tube de 16/160.

(\*) Sur 6 flacons, lecture au 6<sup>e</sup> jour.

(\*\*) Sur 10 tubes, lecture au 6<sup>e</sup> jour.

(\*\*\*) Mortalité sur souris - lecture finale le 14<sup>e</sup> jour - nombre de souris mortes/souris inoculées.

(\*\*\*\*) Ces souris reçoivent 0,025 ml de milieu ELY par voie intracérébrale.

Fc' : test de fixation du c' sur les cerveaux de souris mortes.

(\*\*\*\*\*) Ce test statistique permet de conclure que les différences entre les résultats des inoculations sont le fait du hasard.

raison de 0.1 ml par tube et nous complétons avec 2 ml de milieu ELY contenant 2 p. 100 de sérum de veau.

Après une incubation de 6 jours à 37° C sur roller-tube, chaque tube est contrôlé microscopiquement pour vérifier l'absence d'ECP.

- *Subculture sur souris.*

Le liquide de subculture est inoculé à 50 souris à raison de 0,025 ml par voie intracérébrale; nous inoculons en parallèle 50 souris témoins avec du milieu ELY.

Durant 14 jours, les souris sont observées quotidiennement et nous prélevons et congelons à — 20° les cerveaux des souris mortes ou agonisants. Ces cerveaux seront testés en fixation du Complément.

Les résultats consignés dans le Tableau I sont un exemple de contrôle satisfaisant où aucun virus résiduel ne peut être décelé sur trois lots de virus inactivé selon les mêmes modalités.

2. *Contrôle sur souris.*

a) *Premier passage sur souris.*

Le virus inactivé est inoculé à 50 souris à raison de 0,025 ml par souris par voie intracérébrale; 50 souris témoins reçoivent du milieu ELY contenant 0,3 p. 1.000 de formol et nous conservons 50 souris témoins non inoculées. Durant 14 jours, ces lots de souris sont observés quotidiennement et nous prélevons les cerveaux des souris qui seront traités dans les mêmes conditions que précédemment.

Les résultats du Tableau II démontrent qu'aucun virus résiduel ne peut être mis en évidence par cette technique sur les trois lots de vaccins contrôlés par la technique exposée ci-dessus.

b) *Subculture sur souris.*

Eventuellement, les cerveaux des souris mortes après l'inoculation du virus inactivé sont inoculés à 10 souris selon les modalités déjà mentionnées pour vérifier la spécificité de l'infection.

2. CONTRÔLE BACTÉRIOLOGIQUE DU VIRUS INACTIVITÉ

*in vivo.*

Ces tests doivent mettre en évidence des agents pathogènes extrinsèques.

1. *Contrôles sur cobayes.*

Nous inoculons le virus inactivé à 5 cobayes (minimum) à raison de 1 ml par cobaye par voie intrapéritonéale. Ces cobayes sont observés durant 14 jours et aucun cobaye ne doit présenter les signes d'une affection, sinon nous effectuons une autopsie rigoureuse des sujets malades ou morts, et des prélèvements d'organes sont contrôlés bactériologiquement.

TABLEAU II  
*Vaccin S2 inactivé: Infectivité résiduelle sur souris.*  
 Concentration formol 0,3 p. 1000 - Température 32° C - Durée: 72 heures.

	TITRE DU VIRUS avant l'inacti- vation DECP <sub>50</sub> /ml	SOURIS inoculées avec le virus inactivé	SOURIS TÉMOINS	
			Inoculée* avec le ELY 0,3 p. 1000 formol**	Non inoculées
1 <sup>er</sup> essai S <sub>2</sub> MS <sub>9</sub>	10 <sup>6,25</sup>	4/50 Fc' = 0	0/50	1/50
2 <sup>e</sup> essai S <sub>2</sub> MS <sub>11</sub>	10 <sup>7</sup>	2/50 Fc' = 0	4/50 Fc' = 0	3/50 Fc' = 0
3 <sup>e</sup> essai S <sub>2</sub> MS <sub>12</sub>	10 <sup>6,75</sup>	2/50 Fc' = 0	2/50 Fc' = 0	8/50 Fc' = 0
$\chi^2 = 6.763$ $ddl = 10^{***}$ $p = 0.95$ Différence non significative entre les lots de souris et les essais.				

*Légende :*

- (\*) Inoculation intracérébrale de 0,025 ml, lecture finale au 12<sup>e</sup> jour.
- (\*\*) ELY 0,3 p. 1000 de formol: milieu de culture non virulent formolé.
- (\*\*\*) Test statistique permettant d'affirmer que les différences entre les résultats sont le seul fait du hasard.

### 2. Contrôle sur souris.

Nous inoculons le virus inactivé à 20 souris, à raison le 0,2 ml par souris, par voie intrapéritonéale: les critères de contrôle sont identiques à ceux des cobayes précédents.

### 3. CONTRÔLES BACTÉRIOLOGIQUES DU VACCIN

*in vitro.*

Le vaccin (contenant le gel d'alumine) est ensemencé sur les milieux suivants:

- Bouillon ordinaire;
- Bouillon au thioglycolate;
- Géluse SABOURAUD (ou D15).

Après une incubation à 37° C et 25° C durant 7 jours, nous vérifions l'absence de contamination microbienne. Lors de contamination, nous testons le pouvoir pathogène

du germe isolé en inoculant des cobayes par voie intrapéritonéale.

#### 4. CONTRÔLE D'INNOCUITÉ DU VACCIN SUR CHEVAL.

Le vaccin inoculé à des chevaux par voie sous-cutanée stricte ne doit pas provoquer durant *un* mois d'observation:

— de réaction locale trop importante, les critères de lecture restant à définir, car la sensibilité des équidés est fonction de l'espèce et de la race;

— de réaction générale dont le critère le plus objectif est la prise quotidienne de la température rectale.

Les 2 lots de vaccin que nous avons contrôlés sur chevaux, recevant 15 ml de vaccin, n'ont provoqué aucune hyperthermie et les réactions locales, non négligeables sur certains sujets dans les jours suivant l'inoculation, ont été acceptables dans l'ensemble, mais des informations complémentaires sont nécessaires pour préciser ces résultats sur un nombre plus grand d'animaux:

#### 5. CONTRÔLE D'ACTIVITÉ

##### 1. *Contrôle sur chevaux.*

##### a) *Epreuve virulente d'animaux vaccinés.*

L'épreuve virulente est le contrôle de référence pour tout vaccin; théoriquement, les modalités d'exécution d'un tel test sont simples, mais sa réalisation pose des problèmes pratiques et économiques.

— Le virus d'épreuve est constitué par le sang infectieux, prélevé à la période de virémie sur des équidés inoculés avec un virus virulent.

Le premier passage sur souris de ce virus viscérotrope peut constituer le virus d'épreuve (13, 15).

— Le titrage d'un tel virus d'épreuve doit être effectué sur équidés pour estimer la dose sûrement infectieuse et ce titrage, pour être significatif, réclamerait 20 à 30 équidés. Ensuite, le titrage peut être effectuée sur souris; dans ce cas, le titre peut varier de  $10^4$  à  $10^{7.5}$  LD50 souris (13, 15).

-- Ce contrôle ne pourrait être que qualitatif comme le test utilisé pour le contrôle des vaccins antiaphteux (6). Par lot de vaccin, le nombre d'animaux ne pourrait être supérieur à 7 (5 animaux vaccinés et 2 animaux témoins de l'épreuve virulente). Ce test serait très onéreux pour de petits lots de vaccin.

--- Les écuries de contrôle doivent être rigoureusement étanches pour éviter les «fuites» de virus virulent par l'intermédiaire d'insectes vecteurs ou porteurs, les effluents liquides et solides subissant une décontamination chimique ou physique efficace. De telles conditions sont réunies à l'Institut RAZI et des essais antérieurs ont démontré l'activité de certains vaccins inactivés (12, 15).

##### b) *Titrages des anticorps neutralisant et fixant le Complément.*

Les anticorps neutralisant et fixant le Complément apportent dans une certaine

mesure la preuve indirecte de l'activité d'un vaccin, tel que cela se pratique pour les vaccins à usage humain (9, 14, 17) et le critère d'appréciation de la qualité d'un vaccin est lié au titre d'anticorps apparu un certain délai après l'immunisation.

*α) Anticorps neutralisants.*

Le Tableau III contient les titres d'anticorps neutralisants (SN) obtenus sur quatre chevaux ayant reçu 15 ml d'un vaccin inactivé en primovaccination et une injection de rappel de 15 ml à la 6<sup>e</sup> semaine d'immunisation. Deux lots de vaccins ont été étudiés parallèlement.

TABLEAU III  
*Cinétique des anticorps neutralisants chez des chevaux vaccinés à l'aide de vaccin inactivé.*

VACCIN*	Séro-neutralisation**	N° DES chevaux	SEMAINES***				
			2	3	4	6	8
Lot 6702 10/60 MS <sub>13</sub>	100	103	0	0.4	1.2	0.9	2.0
		109	0.3	0.4	1.2	0.6	1.7
		121	0.2	0.4	0.6	0.5	2.9
		123	0	0	0.9	0.5	3.5
	10	103	0	0.6	1.3	1.5	2.1
		109	0.7	0.9	1.2	1.2	2.1
		121	0.5	0.9	0.9	0.9	3.3
		123	0	0	1.5	0.9	3.7
Lot 6701 S <sub>2</sub> MS <sub>8</sub>	100	104	0	1.4	0.9	1.2	2.6
		108	0	0.8	2.1	2.0	3.8
		119	0.5	1.1	1.5	1.8	2.9
		125	0.9	1.7	2.1	2.4	4.0
	10	104	0.4	1.8	1.5	1.8	3.4
		108	0	1.4	2.3	2.4	4.4
		119	0.5	1.7	2.1	2.1	3.4
		125	1.8	2.3	2.3	3.0	4.6

Légende :

- (\*) Inactivation. — Formol: 0,3 p. 1000; Gel d'alumine: 1 p. 100 extrait sec; Temps: 48 heurs; Température: 25° C; Dose vaccinale: 15 ml.
- (\*\*) Séroneutralisation sur cellules MS contre 10 et 100 DECP50 à l'aide du virus spécifique de chaque lot de vaccin.
- (\*\*\*) Semaines après l'immunisation. Rappel de vaccination à 6 semaines. Titre exprimé par le log de l'inverse de la dilution du sérum neutralisant 50 p. 100.



Les anticorps SN ont été titrés contre 100 et 10 DECP50 pour déterminer l'équivalence entre les deux modalités de séroneutralisation.

Les conclusions statistiques de l'analyse factorielle du Tableau III sont transcrites dans le Tableau IV.

Elles soulignent :

- que la précision sur un titre SN est de  $\pm 0,66$  (\*);
- que les variations des titres SN d'un cheval à un autre cheval sont importantes soit  $\pm 1,66$  (\*):

TABLEAU IV  
Analyse de variance du Tableau III

SOURCE DE VARIATION	DEGRÉ DE LIBERTÉ	VARIANCE	TEST DE F	SIGNIFICA-
<i>Effets principaux</i>				
Semaine S = 5	4	17.1186	$F_{22}^4 = 155$	$> 0.001$ HS*
Chevaux C = 4 (CV)	7	0.7981	$F_{22}^7 = 7.25$	$> 0.1$ HS*
Séroneutralisation N = 2	1	3.0032	$F_{22}^1 = 27.5$	$> 0.1$ HS*
Vaccin V = 2	1	14.8782	$F_{22}^1 = 136$	$> 0.1$ HS*
<i>Interaction de 1<sup>er</sup> ordre</i>				
SC (SCV)	28	0.2378	$F_{22}^{28} = 2.8$	0.05 juste significatif
SN	4	0.0381	$F_{22}^4 < 1$	NS**
SV	4	0.5093	$F_{22}^4 = 4.62$	entre 0.01 0.001 HS*
CN (CNV)	7	0.0226	$F_{22}^7 < 1$	NS*
NV	1	0.1531	$F_{22}^1 = 1.4$	NS**
Variance résiduelle ***	22	0.1099	Ecart type = 0.33	

Légende :

- (\*) Hautement significatif.
- (\*\*) Non significatif.
- (\*\*\*) Les autres interactions de 2<sup>e</sup> ordre ne sont pas significatives et sont incluses dans la variance résiduelle.

(\*) Probabilité 0.95.

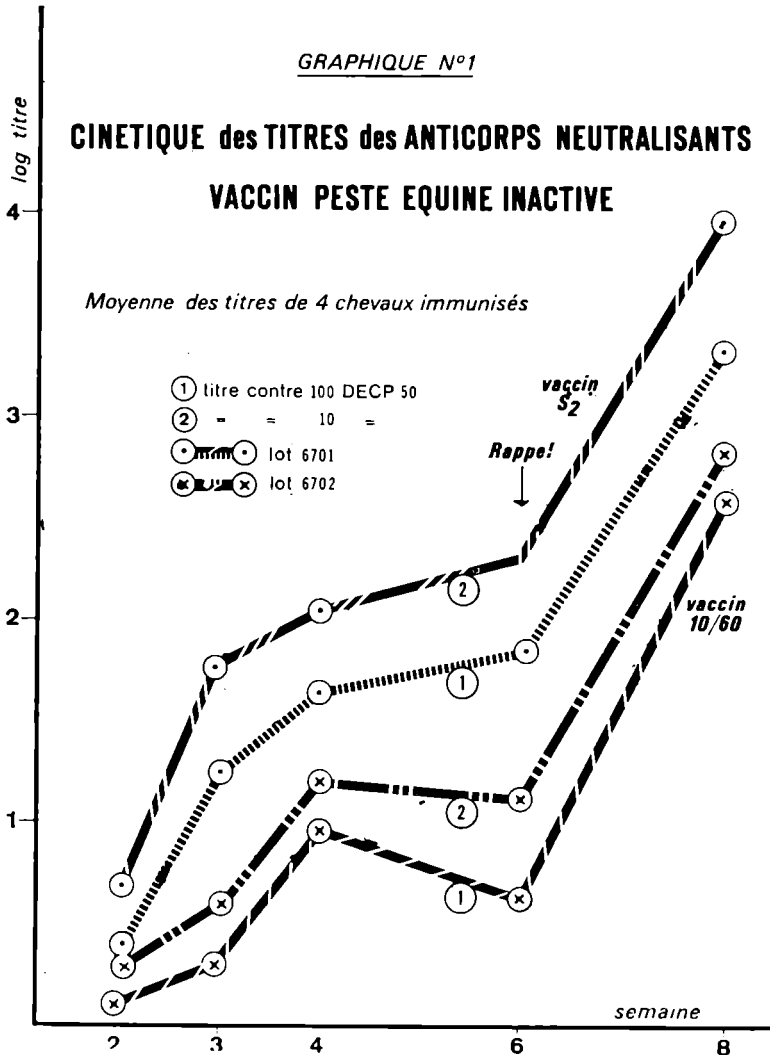
— que les titres SN par rapport à 10 ou 100 DECP50 sont liés entre eux, une analyse par corrélation a estimé la relation suivante:

$$Y = X + 0,42 \text{ avec } r = 0,98 \text{ pour } N = 36$$

Y est le titre SN par rapport à 10 DECP50

X est le titre SN par rapport à 100 DECP50.

(La technique de neutralisation à 10 DECP50 est donc plus sensible car elle détectera des niveaux d'anticorps plus faibles.) (Voir Graphique n° 1).



— que la différence des titres SN entre les deux lots de vaccin est hautement significative: le titre pour le lot S 2/6701 est en moyenne 7 fois plus élevé que pour le lot 10/60/6702;

- que la cinétique des anticorps est différente pour les deux lots de vaccins. Le tableau n° 1 explicite cette conclusion. En effet, le titre moyen pour le 10/60/6702 a subi un net fléchissement entre la 4<sup>e</sup> et la 6<sup>e</sup> semaine alors que pour le lot S2/6701 on a observé une augmentation de ce même titre SN. La période optimale du titrage des anti-venimeux pour le test de contrôle d'activité des vaccins inactivés paraît donc être la quatrième semaine, résultat qui confirme les conclusions de certains Auteurs.

- que le rappel de vaccination provoque une augmentation rapide et très importante du titre SN pour les deux vaccins. Entre la quatrième et la huitième semaine, l'augmentation moyenne du titre SN est de 1,78 (soit 60 fois) pour le vaccin 6701 et de 1,78 (soit 43 fois) pour le vaccin 6702 (Graphique n° 1).

L'ensemble de ces résultats permet de distinguer deux vaccins d'activité différente. On ne connaît pas avec précision le titre SN minimum correspondant à la protection contre l'épreuve virulente; des essais antérieurs ont montré que les chevaux, vaccinés à l'aide de vaccin vivant, dont le titre SN (100 DECP) était supérieur à 0,6,

TABLEAU V  
Cinétique des anticorps fixant C' chez des chevaux vaccinés à l'aide de vaccin inactivé.

VACCIN*	CHEVAUX	SEMAINES**				
		2	3	4	6	8
Lot 6702	103	0.45***	0.50	0.88	0.92	0.30
	109	0	0.55	0.88	1.20	0.80
	121	0.25	0.30	0.80	1.12	1.30
	123	0	0.30	0.30	0.80	1.10
Lot 6701	104	0	0.20	0.30	0.50	0.30
	108	0	0.45	1.20	1.20	1.15
	119	0	0.30	1.00	1.00	0.50
	125	0.30	0.40	0.60	1.12	0.30

5<sup>e</sup> remarque que pour le Tableau III.

6<sup>e</sup> remarque que pour le Tableau III.

Le titre exprimé par le log de l'inverse de la dilution de sérum fixant C' à ++.

protégés contre une épreuve virulente (\*). Pour ce faire, une étude systématique de la relation entre le titre SN et le pourcentage de protection serait nécessaire comme elle a été réalisée pour certains vaccins (22).

Communication personnelle du Docteur MIRCHAMSY (observations non publiées).

$\beta$ ) *Anticorps fixant le Complément (FC).*

Les titres FC des sérums des chevaux précédents sont transcrits dans le Tableau V. Les titres sont exprimés par l'inverse de la dilution de sérum fixant le Complément à + + (lecture opacimétrique visuelle).

Les résultats statistiques de l'analyse de variance du Tableau V sont contenus dans le Tableau VI et amènent aux conclusions suivantes:

- La précision sur un titre FC est de  $\pm 0,52$  (\*\*);
- Les différences du titre entre les chevaux sont de  $\pm 0,72$  (\*\*);
- Les différences entre les deux lots de vaccins ne sont pas significatives;
- La cinétique des titres FC est identique pour les deux vaccins (Voir Graphique n° 2);

TABLEAU VI  
*Analyse de variance du Tableau V*

SOURCE DE VARIATION	DEGRÉ DE LIBERTÉ	VARIANCE	TEST DE F	SIGNIFICATIVITÉ
<i>Effets principaux</i>				
Semaine S = 5	4	0.91421	$F_{23}^{4'} = 13.5$	Hautement significatif NS*
Chevaux C = 4 (CV)	7	0.130	$F_{23}^{7'} = 1.93$	
Vaccins V = 2	1	0.09312	$F_{23}^{1'} = 1.38$	
<i>Interaction de 1<sup>er</sup> ordre</i>				
SC (SCV)	12	0.13976	$F_{23}^{12'} = 1.92$	NS*
SV	4	0.03666	$F_{23}^{4'} < 1$	NS*
Variance résiduelle**	23	0.06770	écart-type = 0.26	

*Légende :*

- (\*) Non significatif.
- (\*\*) Les autres interactions de 2<sup>e</sup> ordre ne sont pas significatives et sont incluses dans la variance résiduelle.

---

(\*\*) Probabilité 0,95.

$\gamma$ ) Comparaison entre les titres SN et FC

pour les deux lots de vaccins.

— la précision sur les titres SN et FC est du même ordre de grandeur entre les deux techniques (respectivement 0,66 pour 0,52);

— la cinétique des anticorps SN et FC est différente selon le vaccin, surtout après le rappel de vaccination: les titres FC subissent une nette diminution 15 jours après le rappel alors que les anticorps SN ont une cinétique ascendante durant la même période;

— les différences de titres SN et FC entre chevaux sont significatives (1,66 pour 0,72);

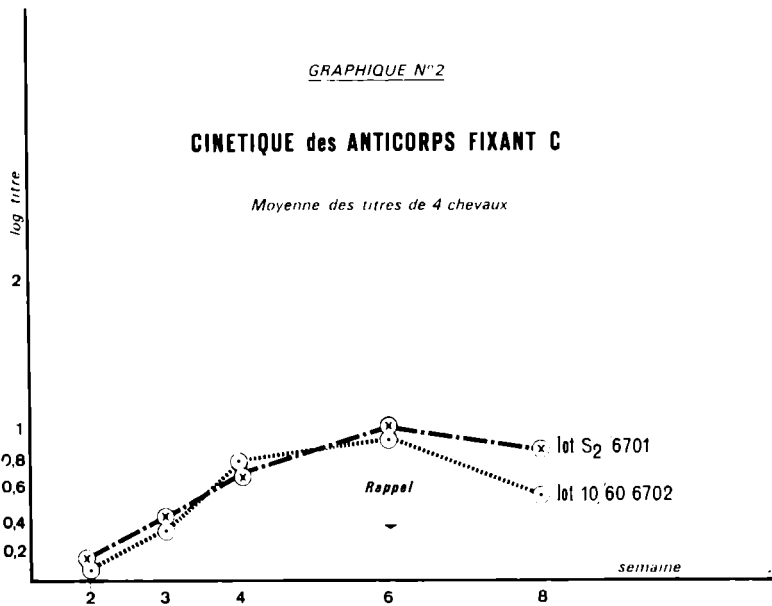
— les anticorps FC n'ont pas pu distinguer les deux lots de vaccin inactivé sur des chevaux car il y a une cinétique significative mais la technique de séroneutralisation sur cellules est plus sensible et paraît mieux séparer l'activité de deux vaccins;

— la nature des anticorps séroneutralisant et fixant le Complément paraît être différente au vu des conclusions précédentes.

2. Contrôle d'activité sur cobayes.

a) Test par épreuve virulente,

estimation de la dose vaccinante cobaye 50 p. 100



(\*) DVC50.

— Préparation du virus d'épreuve.

Le cobaye est une espèce sensible à l'inoculation intracérébrale du virus Peste équine/Souris (4).

Nous avons adapté au cobaye une souche S2/Souris pour stabiliser la durée d'incubation de l'infection chez le cobaye. Pour ce faire, nous avons utilisé de jeunes cobayes pesant entre 100 et 200 grammes.

Le virus d'origine est un broyat (\*) de cerveaux de souris infectées avec le virus S2, broyat au 1/15 dans du PBS, contenant 5 p. 100 de chloroforme, puis centrifugé (\*\*) à 4.000 tours/minute durant 30 minutes.

Le Tableau VII contient le protocole d'adaptation de la souche S2 au cobaye. Les inoculations intracérébrales se font à raison de 0,25 ml.

Au 5<sup>e</sup> passage, pour éviter les chocs protéiques lors de l'inoculation, nous effectuons un lavage de l'antigène avec du forane 113 dont la technique est décrite par ailleurs (5, 21).

TABL

Adaptation au co

PASSAGE	1	2	3	4	5	6
Dilution de l'Ag en PBS	1/15*	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25
% chloroforme	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %
Proportion lavage forane	0	0	0	0	1/3	1/3
Inoculation intracérébrale - Volume d'inoculation en ml	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Nombre de cobayes inoculés	4	6	5	8	4	6
Mortalité par choc	0	3	0	3	0	0
Mortalité spécifique	4	3/3	5/5	5/5	4/4	6/6
Période de mortalité en jours	11 à 19	10 à 11	6 à 13	9 à 22	10 à 11	10 à 14

Légende :

(\*) Virus initial: cerveau de souris infectée avec le virus S2.

Le 16<sup>e</sup> passage cobaye constitue notre virus d'épreuve et tue régulièrement 100 p. 100 des cobayes entre le 7<sup>e</sup> et le 16<sup>e</sup> jour, uniquement lorsqu'il est inoculé par voie intracérébrale. L'ensemble des cerveaux de cobayes du 16<sup>e</sup> passage est broyé (\*), dilué

(\*) Ultraturax TP 18 Paris Labo.

(\*\*) Centrifugeuse réfrigérée MSE.

\* Ultraturax TP 18 Paris Labo.

au 1/10, dans du tampon lactose-peptone-tris contenant 5 p. 100 de chloroforme, puis centrifugé (\*\*) à 4.000 tours/minute durant 30 minutes.

Le surnageant, réparti dans des ampoules de 5 ml, à raison de 2 ml par ampoule, est lyophilisé et les ampoules sont scellées sous vide.

— *Titrage du virus d'épreuve.*

Nous titrons le virus d'épreuve sur cobayes pesant 300 à 450 grammes, à raison de 8 cobayes par dilution, recevant chacun 0,25 ml de dilution virale par voie intracérébrale. Les animaux sont observés durant 21 jours et le tableau clinique de l'infection chez le cobaye se caractérise ainsi: après une incubation de 6 à 10 jours, apparition

VII

*de la Souche S<sub>1</sub>.*

7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25	1/25
5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
10	6	6	6	5	6	6	6	6	30
0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
10/10	6/6	6/6	6/6	5/5	6/6	6/6	6/6	6/6	26/26
5 à 8	10	10 à 13	13	12	9	10	10	6 à 11	7 à 15

d'une anorexie et d'un amaigrissement rapide avec hérissément du pelage, hypersensibilité cutanée et hyperexcitabilité; la paralysie générale est progressive, débutant par une parésie et une paralysie des membres postérieurs aboutissant à la mort après une agonie lente (Tableau VIII).

— *Vaccination des cobayes.*

Le vaccin est dilué en PBS et les dilutions (pur, 1/3, 1/9 et parfois 1/27) sont inoculées chacune à un groupe de 5 cobayes, à la dose de 1 ml par cobaye par voie intramusculaire (patte postérieure droite), la voie sous-cutanée s'étant révélée plus irrégulière quant aux résultats.

\*\* Centrifuge réfrigérée MSE.

-- *Epreuve virulente.*

Le virus d'épreuve lyophilisé, repris par 2 ml d'eau déminéralisée stérile puis dilué au 1/2 en PBS, contient environ 300 DL 50 p. 100 dans 0,25 ml.

Les cobayes vaccinés et 5 à 8 témoins reçoivent chacun une inoculation intracérébrale de 0,25 ml de virus d'épreuve 21 jours après la vaccination.

TABLEAU VIII

*Titrage du virus d'épreuve lyophilisé*  
16<sup>e</sup> passage cobaye (\*)

DILUTION**	MORTALITÉ***	
Pur	10/10	Titre**** 10 <sup>2,5</sup> DL <sub>50</sub> /0,25 ml
10-1	10/10	
10-2	8/10	
10-3	2/10	
10-4	0/10	

*Légende :*

- (\*) Chaque cobaye reçoit 0,25 ml par voie intracérébrale.
- (\*\*) Chaque ampoule lyophilisée de 2 ml est reprise par 2 ml d'eau distillée ce qui constitue le virus pur. Les dilutions sont effectuées en PBS.
- (\*\*\*) La lecture finale est faite 21 jours après l'inoculation virulente, mais aucune mortalité n'a eu lieu après le 12<sup>e</sup> jour.
- (\*\*\*\*) Avant lyophilisation, le titre était 10<sup>2,8</sup> DL<sub>50</sub>/0,25 ml.

Par des essais préalables, nous avons vérifié que les cobayes vaccinés sont partiellement protégés au 14<sup>e</sup> jour d'immunisation, mais nous effectuons l'épreuve virulente de routine le 21<sup>e</sup> jour. Après l'épreuve virulente, la durée d'observation des animaux est de 21 jours; tous les cobayes non vaccinés meurent entre le 10<sup>e</sup> et le 16<sup>e</sup> jour et les cerveaux des animaux morts ou agonisants sont prélevés et testés en fixation du Complément.

Certains animaux, après avoir présenté des signes d'anorexie et d'hypersensibilité cutanée transitoires, guérissent spontanément et se rétablissent sans séquelles; ces animaux sont considérés comme «résistant à l'épreuve virulente».

*- Expression du titre du vaccin.*

A l'aide de la technique de LITCHFIELD ou des probits (19) nous estimons la dilution du vaccin qui protège 50 p. 100 des cobayes vaccinés et exprimons le titre par l'inverse de cette dilution. ce titre est donc exprimé en DVC 50 p. 100 pour 1 ml.



TABLEAU IX

Contrôle de vaccin peste équine inactivé - Type S2 Lot 6701 sur cobayes.

DILUTION* DU VACCIN	N° DES COBAYES	TITRE*** NEUTRALI- SANT A 20 JOURS	RÉSULTAT**** DE L'ÉPREUVE	TEST***** FIXATION C'
Pur 1 ml**	843	1.8	R	non testé
	844	0.9	R	
	845	> 1.5	R	
	846	1.2	R	
	847		M = 1 jour	
1/3 1 ml	848	1.2	R	
	849	0.9	R	
	850	> 1.2	R	
	851	> 1.2	R	
	852	< 0.6	R	
1/9 1 ml	853	< 0.6	R	O
	854	< 0.6	R	
	855	< 0.6	M = 13 jours	
	856	1.5	R	
	857	< 0.6	R	
Témoin non vacciné	813		M = 13 jours	+
	814		M = 16 jours	+
	816		M = 16 jours	O
	817		M = 11 jours	+ non testé
	819		M = 10 jours	
Titre du vaccin $\geq$ 16 DVC <sub>50</sub> /ml.				

Légende :

- (\*) Dilution en PBS, pH = 7.4.
- (\*\*) Par voie intramusculaire.
- (\*\*\*) Titre neutralisant contre 100 DECP50.
- (\*\*\*\*) Epreuve 21 jours après l'immunisation. Fin de lecture: 21 jours après l'épreuve.
- M = Mort à x jours.
- R = Résiste à l'épreuve.
- Epreuve 0.25 ml par voie intracérébrale contenant 300 DL50/0.25 ml.
- (\*\*\*\*\*) Test effectué sur un antigène cérébral.

TABLEAU X

Contrôle de vaccin peste équine inactivé  
Type 10/33 Lot 6702 sur cobayes.

DILUTION* DU VACCIN	N° DES COBAYES	TITRE*** NEUTRALISANT À 20 JOURS	RÉSULTAT**** DE L'ÉPREUVE VIRULENTE	TEST***** FIXATION C'
Pur 1 ml**	833	0.6	R	NT
	834	0.9	R	
	835	0.9	M = 17 jours	
	836	0.9	R	
	837	0.9	R	
1/3 1 ml	828	0.6	M = 14 jours	O
	829	0.6	R	O
	830	1.2	R	
	831	1.5	M = 16 jours	
	832	1.2	R	
1/9 1 ml	812	< 0.6	M = 14 jours	
	823	< 0.6	R	NT O
	824	0.6	R	
	825	< 0.6	M = 12 jours	
	827	< 0.6	M = 16 jours	
Titre du vaccin = 5 DVC <sub>50</sub> /ml.				

Légende identique à celle du Tableau IX.

Actuellement, aucun critère de comparaison ne nous permet de ramener ce pouvoir vaccinant chez le cobaye au pouvoir vaccinant chez les équidés; toutefois, les deux essais que nous mentionnons dans les Tableaux IX et X montrent que les titrages d'activité sur cobayes, selon les modalités proposées, classent les deux vaccins testés dans le même ordre que le contrôle des anticorps neutralisants; des essais systématiques devraient aboutir aux critères comparables à ceux obtenus pour les contrôles de vaccins antiaphteux (10).

b) *Titration des anticorps neutralisants des cobayes vaccinés*

Les anticorps neutralisants apparaissent rapidement chez le cobaye vacciné (vers le 8<sup>e</sup> jour). Les Tableaux IX et X contiennent les titres SN (100 DECP) des sérums des cobayes vaccinés prélevés juste avant l'épreuve virulente. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur la proportionnalité éventuelle des titres SN et la dose de vaccin comme nous avons pu le démontrer pour la vaccination antiaphteuse (22).

### 3. Contrôle sur souris

Un test analogue à celui décrit pour les cobayes pourrait être mis en œuvre pour le contrôle d'activité des vaccins inactivés car la souris vaccinée paraît être protégée contre une épreuve virulente intracérébrale (8), mais nous n'avons aucune donnée dans ce domaine.

### III. — DISCUSSION

Le gel d'alumine étant toxique pour les cellules MS et pour la souris par voie intracérébrale, il est impossible de rechercher une infectiosité résiduelle d'un vaccin inactivé Peste équine adsorbé sur gel à l'aide de ces deux techniques. Nous pouvions envisager de tester le surnageant d'un tel vaccin après élution du virus résiduel par la congélation-décongélation, le broyage à grande vitesse ou la lyophilisation; aucune de ces techniques ne nous a donné de résultat satisfaisant. Seule la recherche de la virémie chez l'espèce sensible apporterait la solution à ce problème, mais comme pour d'autres virus et d'autres espèces (11), la virémie est délicate à mettre en évidence pour des tests de routine, et les recherches de la virémie sur 6 chevaux vaccinés à l'aide de vaccin vivant ont été infructueuses entre le quatrième et le 21<sup>e</sup> jour après vaccination, les prélèvements de sang étant effectués tous les 6 jours.

L'adsorption d'un virus inactivé sur un gel étant considérée par certains Auteurs comme une inactivation ultime des particules virales (7), la recherche du virus résiduel, effectuée avant l'addition de gel, est donc un test très sévère, d'autant plus sévère que deux systèmes sensibles sont utilisés (cellule et souris) ainsi que des subcultures sur les deux systèmes.

Le contrôles d'activité sur cheval par épreuve virulente sont évidemment ceux auxquels il faut faire appel en référence. Le coût financier d'un tel contrôle empêche son emploi systématique mais il pourrait être avantageusement remplacé par les titrages des anticorps SN de chevaux vaccinés ne subissant pas une telle épreuve virulente.

Les contrôles d'activité sur cobayes sont économiquement et pratiquement les plus intéressants, mais on soulève alors ici les critiques faites au sujet des contrôles effectués sur une espèce différente de celle pour laquelle le vaccin est produit, contrôles qui sont courants en médecine humaine (9, 10, 14, 17). Le titrage des anticorps neutralisants de cobayes vaccinés est un test indirect à deux titres: d'une part l'espèce, d'autre part il fait appel à un test de révélation *in vitro*.

Les chevaux de course et de race sont particulièrement sensibles aux différents «stress»: les tests requis pour un vaccin anti-Peste équine doivent être particulièrement sévères et rigoureux. Ceux que nous avons exposés sont ceux utilisés pour la mise au point d'un vaccin inactivé. Les contrôles de lots de fabrication devront suivre un protocole semblable mais ajusté quantitativement selon l'importance en volume des lots pour ne pas surcharger financièrement le prix de revient d'un tel vaccin.

\*\*\*

### IV. — CONCLUSION

Les contrôles d'innocuité et d'activité d'un vaccin inactive contre la Peste équine font appel à des tests classiques appliqués en virologie.

Ainsi la recherche de l'infectivité résiduelle sur culture de cellule MS et sur souris, les contrôles bactériologiques *in vivo* et *in vitro*, le contrôle du pouvoir vaccinant par le titrage des anticorps séroneutralisants de chevaux vaccinés et par le titrage de la dose vaccinnante 50 p. 100 chez le cobaye ont permis de préciser certaines données sur la formule d'un vaccin inactivé.

\*\*\*

#### BIBLIOGRAPHIE

1. BOURDIN (P.) & MONNIER-CAMBON (J.). — Note préliminaire sur l'emploi d'un vaccin inactivé contre la Peste équine. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1967, **40** (4), 187-191.
2. DIAZ MONTILLA (R.) & PANOS MARTI (P.). — Epizootologie de la Peste équine en Espagne. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1967, **68** (1), 705-714.
3. EL FOURGI (M.). — Note sur la Peste équine africaine en Tunisie. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1967, **68** (1), 715-717.
4. ERAMUS (B. J.). — Preliminary observations on the value of the guinea-pig in determining the innocuity and antigenicity of neurotropic attenuated Horse sickness strains. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1963, **30** (1), 11-22.
5. FAYET (M.-T.), ROUMIANTZEFF (M.), DUBOUCLARD (C.) & FONTAINE (J.). — Utilisation d'un fluorocarbone comme méthode d'étude du virus de la Fièvre aphteuse. *Ann. Inst. Pasteur*, 1965, **109**, 652-662.
6. GAYOT (G.), LUCAS (A.) & DHENNIN (L.). — Interprétation statistique de la méthode dite qualitative d'appréciation des vaccins anti-aphteux. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1965, **38** (4), 127-134.
7. GIRARD (H.) & MACKOWIAK (C.). — Le vaccin anti-aphteux de type Schmidt-Vallée-Waldmann est un vaccin vivant inactivé. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1949, **22** (7), 285-289.
8. GOLDSMITH (L.). — Differentiation of African horse sickness virus strains by cross-immunisation tests in mice. *Refuah vet.*, 1969, **23**, 150.
9. LEPINE (P.), ROGER (F.), SAUTTER (V.) & ROGER (A.). — Application de la réaction cinétique de séroneutralisation à l'étude de l'antigénicité des vaccins anti-poliomyélitiques. *Ist int. Meet. of biological Stand. Jerusalem*, 1959, sept., 157-178.
10. MACKOWIAK (C.), FONTAINE (J.), TERRE (J.), STELLMANN (C.), ROUMIANTZEFF (M.) & PETERMANN (H. G.). — Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. Etude de la loi dose-effet et corrélation entre les doses vaccinnantes 50 p. 100 chez les cobayes et les bovidés. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1966, **65**, 131-171.
11. MASTAN (B.) & DUBOUCLARD (C.). Contribution à l'étude de la virémie chez le mouton inoculé avec le virus de la Fièvre aphteuse. — *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1937, **40**, 419-426.
12. MIRCHAMSY (H.) & TASLIMI (H.). — Inactivated African horse sickness virus cell culture vaccine. *Immunology*, 1968, **14**, 81-88.
13. MIRCHAMSY (H.) & TASLIMI (H.). — Immunisation against African horse sickness with tissue culture adapted neurotropic virus. *Brit. vet. J.*, 1964, **62**, 911-921.

14. MURRAY (R.). — The potency of inactivated poliomyelitis vaccine. *Ist int. Meet. of biological Stand., Jerusalem*, 1959, sept., 135-156.
15. OZAWA (Y.) & BAHRAMI (S.). — African horse sickness killed-virus tissue culture vaccine. *Canad. J. comp. Méd. vet. Sci.*, 1966, **30**, 311-314.
16. PILO-MORON (E.), VINCENT (J.) & SUREAU (P.). — Présence du virus Peste équine type 9 en République Algérienne. Identification des souches de virus isolées en 1965-1966. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1967, **20**, 5-20.
17. PRINZIE (A.), DE SOMER (P.), LAMY (M.) & DE MAEYER (E.). — La détermination de la valeur antigène du poliovaccin. *Ist int. Meet. biological Stand. Jerusalem*, 1959, sept., 179-195.
18. RABAH (M.). — La Peste équine au Maroc. *Thèse Doctorat Vétérinaire, Lyon*, 1936.
19. STELLMAN (C.) & TERRE (J.). — Choix d'une méthode de calculs statistiques en vue des contrôles d'activité des produits biologiques sur animaux. *Bull. Soc. Sci. vét. Lyon*, 1955, **67**, 273-282.
20. STELLMANN (C.), MIRCHAMSY (H.), GILBERT (H.) & SANTUCCI (J.). — La Peste équine africaine. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1967, **67** (7-8), 887-947.
21. STELLMANN (C.). — Fixation du C' pour la Peste équine africaine. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1969 (à paraître).
22. STELLMANN (C.), BORNAREL (P.), LANG (R.) & TERRE (J.). — Contrôle quantitatif du vaccin anti-aphteux. Analyse statistique de la relation liant les titres d'anticorps neutralisants au pourcentage de protection bovine. *Rec. Méd. vét.*, 1968, **144**, 325-351.
23. Projt de Règlement Zoo-sanitaire International. XXXIV<sup>e</sup> Session générale de l'O.I.E., mai 1966.
24. VITTOZ (R.). — Rapport du Directeur sur les activités scientifiques et techniques de l'Office International des Epizooties pendant la période mai 1966-mai 1967 (Peste équine, évolution régionale, épizootologie, prophylaxie). *Bull. Off. int. Epiz.* 1967, **68** (2), 891-899.