

Production de vaccin a base de "Brucella Melitensis", souche Rev. 1 en Iran (*)

F. Entessar

L'Institut Razi est une Institution d'Etat qui se charge de préparer en grande quantité du vaccin Rev. 1 pour les moutons et les chèvres en Iran. D'après les diverses recherches effectuées dans certains pays, notamment en Iran, grâce à l'aide d'experts de Comité mixte FAO/OMS de la brucellose, on a pu conclure que le vaccin Rev. 1 produisait une immunité assez considérable contre la brucellose chez les petits ruminants

Au cours des 5 dernières années, 330,000 moutons et chèvres furent vaccinés avec la souche Rev. 1 en Iran. Le taux d'avortement brucellique fut ramené à 5,6% dans les troupeaux infectés, alors qu'avant la vaccination le pourcentage atteignait 20-25%.

La souche Rev. 1 est une souche lisse et atténuée; elle dérive d'une souche virulente de *Br. melitensis* No. 6056 (Elberg et Faunce, 1957). Cette souche est délivrée par l'un des centres suivants :

- Centre FAO/OMS de la brucellose, Département d'hygiène publique vétérinaire de l'OMS, Palais des Nations, Genève.
- Laboratoire vétérinaire de Weybridge en Angleterre.
- Département de bactériologie de l'Université de California, Berkeley, California, U.S.A.

Constitution de stock de la souche Rev. 1 sec

Pour constituer des stocks de la souche Rev. 1 sec, on ouvre une ampoule originale et on met stérilement le contenu en suspension avec 0,2 ml d'eau distillée pendant quelques minutes à température du laboratoire. Onensemence la suspension obtenue sur les tubes de gélose recommandée pour l'entretien de la souche Rev. 1 (Albimi-agar). Après 3 jours de culture à 37°C, on râcle les tubes cultivés avec du lait écrémé. Puis on distribue une petite quantité de la suspension microbienne assez dense au fond des tubes d'un appareil d'Edwards, modèle 5 PS, et on lyophilise dans le vide sous congélation. La souche lyophilisée gardée à l'abri de la lumière et à 4°C se conserve longtemps.

TECHNIQUE DE PREPARATION DU VACCIN REV. 1 LYOPHILISE

Milieu de culture

Les milieux spéciaux pour la préparation du vaccin ou pour entretenir la souche Rev. 1 sont la gélose pour *Brucella* (Albimi-agar), la gélose-tryptocase-

(*) International Symposium on Brucellosis, Tunis 1968; Symp. Series immunobiol. Standard, Vol. 12, pp. 81-86.

soy, le tryptose-agar et la gélose-sérum dextrosée.

Récemment nous avons observé qu'un milieu à base de gélose dextrosée et additionné de glycérine donne aussi de bons résultats à condition qu'on utilise pour l'ensemencement du bouillon tryptocase-soy. Cette gélose est distribuée dans les boîtes de Roux de telle sorte que l'épaisseur de la gélose soit de 6 mm après refroidissement. Pour évaporer l'eau de condensation et l'humidité de la surface de gélose, on laisse les boîtes au moins 3-4 jours à la température de l'étuve avant l'ensemencement.

Présemence

Ouvrir une ampoule de Rev. 1 desséché sur place et remettre le contenu en suspension avec 0,2 ml d'eau distillée stérile. La suspension est repiquée sur les boîtes de gélose pour observer la morphologie des colonies par examen à la lumière oblique, épreuve à l'acriflavine et coloration par le cristal-violet. Après 5 jours d'étuve, sélectionner les colonies liesses (S) pour les cultures sur de gros tubes (25 x 200 mm) de gélose d'Albimi. Le développement se fait à l'étuve à 37°C pendant 5 jours.

Ensemencement

Introduire 10 ml de bouillon tryptocase-soy dans chaque tube et bien agiter pour que la culture se mette en suspension dans le liquide de prélèvement. Le matériel prélevé par raclage de 5 tubes est versé dans un Erlenmeyer renfermant 100 ml de bouillon tryptocase-soy; on ensemence alors le nombre voulu de boîtes de Roux (au moins 25-30), chacune avec 3-5 ml de cette suspension de telle sorte que cette dernière couvre bien toute la surface de gélose. Après quelques heures, on retourne les boîtes de Roux que l'on abandonne alors pendant 4 jours dans cette position à l'étuve à 37°C.

Prélèvement des cultures

1. Examiner macroscopiquement chaque boîte de culture; rejeter celles qui sont souillées ou dont le gélose s'est décollé.
2. Enlever tout le liquide en excès, que l'on verse dans un liquide désinfectant.
3. Introduire environ 20 ml de liquide de prélèvement pour mettre les germes en suspension.
4. Réunir le contenu de 6-7 boîtes dans un flacon de 250 ml, en filtrant sur coton de verre stérile ou à travers plusieurs épaisseurs de gaze disposées sur un entonnoir stérile.
5. Examiner la suspension de chaque flacon sur préparation colorée; repiquer dans le milieu avec indicateur d'Andrade et sur milieux aéroanaérobies.
6. Conserver les suspensions mères à 4°C pendant les 48 heures nécessaires à la recherche d'une contamination.
7. Réunir les suspensions pures dans un gros flacon et dénombrer les germes viables par ml, en recourant à une méthode classique de numération microvienne. En même temps, cultiver la suspension sur 5 boîtes de Pétri avec gélose d'Albimi pour étudier la morphologie des colonies. La proportion maximale admissible de colonies non lisses (R) est de 10%.
8. Conserver la suspension à 4°C et l'utiliser dans la semaine qui suit la récolte.

Lyophilisation

1. 1 ml de produit réservé pour la préparation du vaccin lyophilisé (150×10^9 germes par ml) est distribué aseptiquement au moyen d'un appareil automatique dans des flacons de 50 ml. (La suspension mère est ajustée à 150×10^9 germes par ml par dilution avec le liquide de prélèvement).
2. Poser les flacons sur les plateaux d'un appareil Stokes et mise en marche de l'appareil jusqu'à dessiccation complète. La durée de la lyophilisation dépend de l'épaisseur du produit; elle varie entre 20 et 36 heures.
3. Boucher sous vide les flacons ou, ce qui est préférable, les fermer sous azote neutre.
4. Stocker le vaccin dans le frigo à 4°C jusqu'au moment de livraison.
5. Contrôler le nombre de germes vivants et calculer, par flacon, la quantité de doses vaccinales (2×10^9).
6. La durée de validité du vaccin Rev. 1 est fixée à 6 mois, à condition que la conservation se fasse à l'abri de lumière et à $+4^\circ\text{C}$.

EPREUVES D'INNOCUITE ET D'EFFICACITE

Alors que les épreuves d'innocuité et d'efficacité du vaccin Rev. 1 n'ont pas encore fait l'objet de recommandations par les experts en brucellose, l'Institut Razi a cependant adopté les tests classiques sur ceux que l'on exécute pour le vaccin S. 19.

1. Inoculer 4 cobayes de 300 g avec un quart de dose vaccinale (500×10^6 germes) par voie musculaire.
2. Sacrifier 2 animaux après 12 jours et déterminer le nombre moyen de germes Rev. 1 dans 1 g de rate après culture de cet organe sur les parois d'une série de tubes gélose (roll-tubes).
3. L'innocuité du vaccin et le contrôle de la virulence sont considérés comme favorables quand la moyenne des germes démontre qu'il n'y a pas d'atténuation de la souche Rev. 1.
4. Neuf semaines après la vaccination, les 2 autres animaux vaccinés ainsi que 2 cobayes témoins sont infectés avec 1 ml d'une suspension renfermant 5000 *Brucella melitensis* virulents.
5. Les 4 cobayes (vaccinés et témoins) sont tués après 6 semaines et les rates mises en culture. Chez les cobayes immunisés, on constate une différence remarquable par comparaison avec les cobayes témoins, qui révèlent un nombre incalculable de germes de *Brucella melitensis* dans la culture de 1 g de rate. Nous avons ainsi la démonstration du pouvoir protecteur de Rev. 1 et l'indication que le lot de vaccin peut être utilisé.

MODE D'EMPLOI DU VACCIN REV. 1

Chaque lot de vaccin est délivré avec une notice explicative. Le numéro du lot indiqué sur la notice correspond au numéro de flacon de vaccin. Le vaccin Rev. 1 est un vaccin vivant, atténué; il doit être conservé à l'abri de la lumière et à 4°C . Les fioles dont la validité est dépassée doivent être retournées au centre de production avec leur bouchon intact.

Chaque flacon contient x doses de vaccin lyophilisé et y ml de diluant qu'on ajoute aseptiquement au moment de l'emploi (bien agiter). Utiliser le vaccin hydraté dans les deux heures qui suivent la reconstitution.

1 ml de vaccin contenant 2×10^9 germes vivants représente une dose vaccinale. L'injection se fait sous la peau, derrière l'épaule. Le vaccin Rev. 1 ne donne aucune réaction locale; s'il y en a une, elle provient d'une opération maldroite ou d'une aiguille contaminée.

La vaccination des animaux adultes doit être effectuée un mois avant la copulation. L'âge de vaccination des agneaux et des chevreaux est fixé au quatrième mois de naissance. Les béliers gardés dans le troupeau doivent être vaccinés.

RESUME

Description détaillée de la préparation d'un vaccin de **Br. melitensis** lyophilisé (souche Rev. 1) ainsi que des épreuves d'innocuité et d'efficacité adoptées.

Le vaccin, appliqué à des ovins et caprins, procure une immunité solide. Injecté un mois avant la fécondation à la dose de 2×10^9 bactéries vivantes, il protège pendant 2 ans et demi. Agneaux et chevreaux sont vaccinés à l'âge de 4 mois.

SUMMARY

Detailed description of the preparation of a freeze-dried **Br. melitensis** vaccine (Rev. 1 strain) and of the tests adopted to prove its efficacy and safety. The vaccine, applied to sheep and goats, ensures high immunity. Injected one month before fecundation, at a dose of 2×10^9 live bacteria, it gives protection for two and a half years. Lambs and young goats are vaccinated at the age of 4 months.

ANNEXE I

Gélose dextrosée et glycinée

Viande de boeuf (dégraissé et hâchée) 4 kg
Eau distillée 8 litres

Porter à l'ébullition pendant 30 minutes en agitant constamment avec une baguette de verre. Filtrer sur mousseline pour retenir les graisses et les particules de viande. Le volume de liquide filtré est complété à 8 litres par adjonction d'eau distillée.

Maintenir le liquide à ébullition et faire dissoudre 80 g de peptone BDH et 40 g de NaCl. Alcaliniser le liquide et ajuster le pH à 7. 7.

Ajouter 190 g d'agar (Difco) et chauffer jusqu'à dissolution de la gélose. Autoclaver à 120°C pendant 40 minutes. Séparer la partie claire de gélose par siphonage. Ajouter 1% de glucose et 2% de glycérine. Répartir 140 ml dans chaque boîte de Roux et stériliser 45 minutes à 110°C.

ANNEXE II

1) Milieu de prélèvement de culture Rev. I

Bacto-casiton 1%
Saccharose 3%
L-glutamic acid sodium salt 1%

Chauffer 10 minutes au bain-marie bouillant, filtrer sur membrane de Seitz, puis répartir 20 ml en tuebs de 25 x 200 mm contenant des billes de verre.

2) Tampon diluant du vaccin Rev. 1 lyophilisé

Chlorure de sodium	8 g
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	5 g
Na ₂ HPO ₄ , anhydric	2.25 g
Eau distillée	1000 ml

Faire dissoudre le phosphate à chaud dans une petite quantité d'eau distillée, puis ajouter NaCl et compléter le volume avec de l'eau distillée jusqu'à un litre.

Filtrer sur membrane de Seitz, diluer 10 fois avec de l'eau distillée et ajouter 1% de glycérine. Autoclaver à 120°C pendant 30 minutes, puis distribuer aseptiquement dans les fioles.