

La péripneumonie bovine

Étude et mise au point

de l'ovo-vaccin antipéripneumonique

par G. MÉMERY et J. ORUE

Avec la collaboration technique de L. MÉMERY

Nous avons, au cours des quatre dernières années, effectué une série d'études et de travaux sur l'ovo-vaccin antipéripneumonique. Ils ont abouti, après une mise au point minutieuse de sa préparation, à sa vulgarisation avec toutes les garanties de conservation, d'utilisation et d'efficacité.

Nous nous sommes inspirés directement, comme tous les chercheurs ayant abordé ces recherches, des travaux de SHERIFF et PIERCY (1-2) et de PIERCY et KNIGHT (3-4).

Nous nous sommes attachés, en premier lieu, à résoudre la question délicate du titrage en établissant une méthode simple, rapide, fidèle et reproductible, dérivant de celle de PIERCY et KNIGHT (5). Nous avons étudié, ensuite, la lyophilisation et la valeur relative des stabilisateurs ou des adjuvants, en fonction du titre et de la conservation du vaccin. Puis le problème de la reconstitution et surtout de la survie du *Mycoplasma mycoides* après reconstitution a été abordé. Ce problème, très important, conditionne, en effet, à notre avis, toute l'efficacité du vaccin, son mode d'utilisation, et sa facilité d'emploi sur le terrain.

En dernier lieu, des tests de conservation de l'ovo-vaccin ont été effectués à différentes températures.

I. — GÉNÉRALITÉS

L'ovo-vaccin antipéripneumonique est un vaccin vivant obtenu par culture de *M. mycoides* sur œufs embryonnés.

Les souches vaccinales de ce micro-organisme

sont des souches atténuées, mais non modifiées (*sensu stricto*). Elles ont conservé toutes les caractéristiques de leur pouvoir pathogène spécifique et tissulaire. La seule modification constatée est une diminution de l'intensité de ce pouvoir pathogène.

En l'occurrence, l'œuf embryonné ne joue qu'un rôle passif de milieu de culture, au même titre que le bouillon-cœur-sérum, dans lequel le germe s'atténue par passages successifs. Le nombre de passages nécessaires varie avec la capacité d'atténuation de la souche (MENDES-MARTIN (6), PRIESTLEY, 7).

Aussi au nom de « vaccin avianisé » réservé au véritable virus vaccin modifié, nous préférons celui « d'ovo-vaccin » ne pouvant prêter à confusion. Cependant, de même qu'en bouillon-cœur-sérum, on constate un certain degré d'adaptation qui se traduit, après plusieurs passages, par des cultures *in vitro* ou *in vivo* plus riches et plus abondantes.

Souches

Une souche isolée au Sénégal, DK₁ a été adaptée sur œuf embryonné sans difficulté. Déjà atténuée après dix passages sur chorio-allantoïde, puis après 15 passages sur vitellus, elle reste cependant encore trop virulente pour être utilisée comme souche vaccinale.

Nous lui avons préféré la souche T₃, de PIERCY et KNIGHT (1) dont les titres en unités revivifiables sont très intéressants et dont l'atténuation est compatible avec la réceptivité moyenne des bovins de l'Ouest-Africain.

(1) Nous remercions MM. PIERCY et KNIGHT d'avoir bien voulu nous faire parvenir la souche T₃ du Laboratoire de Muguga (Kenya) en 1957.

Ovoculture et préparation du vaccin

La technique d'ovoculture est celle de SHERIFF et PIERCY (1) avec quelques variantes peu importantes.

Nous avons constitué avec la souche T₃ une banque de broyat d'embryons lyophilisés en ampoules. Les embryons utilisés ont été choisis, pour l'importance de leurs lésions, après contrôle de non-contamination, parmi ceux qui étaient morts le 5^e et le 6^e jours après inoculation.

Lors de la préparation d'un lot de vaccin, le contenu d'une ampoule de cette banque est reconstitué avec de l'eau distillée stérile, réfrigérée. Il est inoculé à 10 œufs embryonnés de 7 jours, à la dose de 2/10 de ml. L'incubation s'effectue à 37° et les embryons morts les 5^e et 6^e jours sont récoltés et contrôlés par ensemencements en milieux nutritifs ordinaires, en milieux anaérobies et en bouillon-cœur-sérum.

Ces embryons, après broyage, constituent l'inoculum destiné à la préparation de vaccin proprement dit.

100 à 200 œufs sont inoculés, puis mis à incuber à une température de 33 à 35°C. La mortalité apparaît légèrement moins étalée qu'à 37°C. Elle débute dès le 3^e jour et dépasse rarement le 7^e ; elle est généralement maxima les 4^e et 5^e jours.

Après contrôle, les œufs embryonnés conservés à - 20°C sont finement broyés au mixer (Atomix) (Trois broyages successifs de 2 minutes à la vitesse maxima).

Le broyat constitue une suspension mère à laquelle on ajoute 50 p. 100 de sérum de cheval et généralement 1 000 U. de pénicilline par ml. Un 4^e passage au mixer est ensuite effectué.

Le vaccin ainsi préparé est immédiatement réparti en ampoules, congelé et lyophilisé.

Nous verrons par la suite pour quelles raisons l'adjonction de sérum de cheval s'est avérée nécessaire.

II. — TITRAGE

Comme pour les virus, le titrage des P. P. L. O. ne consiste pas, contrairement à celui d'une bactérie, en une numération précise des germes, mais en la détermination du nombre d'unités infectantes à l'égard de tel ou tel animal (ou milieu) dans des conditions bien déterminées.

On définit ainsi des « unités virulentes » ou « revivifiables » qui sont propres à chaque technique et, par suite, différentes entre elles. En conséquence, un résultat ne pourra servir de référence ou d'élément de comparaison que s'il est accompagné d'une description détaillée de la méthode utilisée, la meilleure n'étant pas, à notre avis, obligatoirement celle qui donne le titre le plus élevé, mais celle qui est la plus fidèle et la plus aisément reproductible.

Pour des raisons de rentabilité et de facilité d'exécution, nous avons éliminé le titrage sur œufs embryonnés (PIERCY et KNIGHT) (8) au profit de la méthode *in vitro* aussi précise. Le titrage *in ovo* en climat tropical peut être, de plus, sujet à des variations importantes consécutives aux modifications qualitatives que présentent les œufs d'une saison à l'autre, et signalées par G. THIERY (9).

Technique

On effectue une série de dilutions de raison 10 jusqu'à 10⁻⁹ ou 10⁻¹¹, soit avec du vaccin lyophilisé après reconstitution, volume à volume, du contenu de 10 ampoules d'un même lot, soit directement avec du vaccin frais.

A partir de chaque dilution, cinq tubes de bouillon-cœur-sérum sont ensemencés avec un millilitre de la suspension bien homogénéisée.

Les tubes placés à 37°C sont examinés toutes les 24 heures à partir du 4^e jour. La lecture définitive intervenant le 8^e jour.

On relève :

— d'une part, la dilution la plus élevée pour laquelle une culture s'est développée dans la totalité des 5 tubes.

— d'autre part, le nombre de cultures positives dans la dilution immédiatement supérieure. Il est exceptionnel de constater sur plus d'une dilution une culture incomplète, c'est-à-dire, sur moins de cinq tubes, les dilutions supérieures étant totalement négatives (cf tableau n° 1).

Les cultures sont contrôlées sur milieux ordinaires, sur milieu au sérum, et au microscope à contraste de phase.

a) Avantages de cette technique

Elle s'est révélée, à l'usage, d'une précision suffisante pour les besoins de la recherche et du contrôle des vaccins à la production.

Elle est fidèle et reproductible. Des titrages en séries, à partir du même matériel, ne donnent jamais de résultats contradictoires, et variant de plus d'un tube, en plus ou en moins, autour du nombre de tubes à culture positive de la dilution extrême.

L'emploi de cinq tubes par dilution s'est révélé le meilleur : un nombre plus important n'améliore pas la précision des résultats, alors qu'un nombre inférieur peut, au contraire, entraîner des erreurs.

La lecture est aisée et relativement rapide. Les souillures éventuelles sont généralement visibles à l'œil nu et, en cas de doute, mises en évidence par les contrôles.

b) Précisions sur les différentes phases du titrage

Elles concernent principalement la nature du diluant utilisé et l'homogénéité du vaccin.

Importance de la nature du diluant :

Contrairement aux constatations de certains auteurs, (PRIESTLEY : 10) la nature du diluant a une très grande influence sur les résultats des titrages.

Les meilleurs et les plus constants sont toujours obtenus par dilution en bouillon-cœur-sérum qui nous sert de base de comparaison dans toute cette expérimentation.

Nous avons ainsi étudié la valeur d'un certain nombre de diluants par des titrages comparatifs à partir des mêmes ampoules d'ovo-vaccin, en suivant la même méthode et avec un temps de contact rigoureusement identique (10 minutes) nécessaire à la préparation des dilutions et à l'ensemencement.

Les diluants expérimentés ont été :

- l'eau distillée
- l'eau physiologique à 8,5 p. 1 000 de ClNa
- l'eau peptonée ordinaire.
- l'eau physiologique à 50 p. 1000 de glucose.
- l'eau physiologique additionnée de 1 p. 100 et de 5 p. 100 de glutamate de Na.
- une solution de « Néopeptone » Difco à 10 p. 100.
- l'eau physiologique additionnée de 10 p. 100 de sérum de cheval.

Par rapport aux résultats obtenus avec le

TABLEAU I - Influence de la nature du diluant dans le titrage de l'ovo-vaccin lyophilisé (Titrage immédiat)

Nature du diluant	Taux de dilution						
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Bouillon-cœur-sérum témoin	5	5	5	5	5	1	-
Eau physiologique à 10 p. 100 de sérum	5	5	5	5	5	2	-
Solution de néo-peptone à 10 p. 100	5	5	5	3	-	-	-
Eau peptonée ordinaire à 2 p. 100	5	5	3	-	-	-	-
Eau physiologique à 5 p.100 de glutamate	5	5	5	1	-	-	-
Eau physiologique à 1 p.100 de glutamate	5	5	2	-	-	-	-
Eau physiologique à 50 p. 100 de glucose	5	5	5	-	-	-	-
Eau physiologique à 8,5 p. 100 de ClNa	5	5	2	-	-	-	-
Eau distillée	5	5	1	-	-	-	-

Les chiffres représentent le nombre de tubes à cultures positives pour chaque dilution (voir méthode de titrage).

Les résultats sont, pour chaque diluant, les moyennes de plusieurs titrages sur le même lot d'ovo-vaccin lyophilisé (lot n° 3).

bouillon-cœur-sérum, nous constatons toujours les pertes de titres suivantes (tableau 1).

— avec l'eau distillée et avec l'eau physiologique à 8,5 p. 1000 de ClNa : 3 parfois 4 logarithmes.

— avec l'eau peptonée, l'eau physiologique à 50 p. 1000 de glucose et l'eau physiologique à 5 p. 100 et 1 p. 100 de glutamate de sodium : 2 à 3 logarithmes.

— avec la solution de « Néopeptone » Difco à 10 p. 100 : supérieure à 1 logarithme.

— avec l'eau physiologique additionnée de 10 p. 100 de sérum : la perte est généralement nulle ou inférieure à un logarithme.

Il est donc évident que *M. mycoides* est assez rapidement tué dans certains milieux et que le sérum de cheval joue un rôle protecteur

très intéressant vis-à-vis de ce micro-organisme.

Lorsqu'on prolonge le temps de contact, ce phénomène est encore plus caractéristique. Les mêmes titrages ont été effectués avec les mêmes diluants, en abandonnant les dilutions sur la paillasse pendant une heure, avant ensemencement des séries de 5 tubes de bouillon-cœur-sérum. Les pertes de titres sont alors bien plus marquées encore :

— avec l'eau distillée et avec l'eau physiologique à 8,5 p. 1000 de *CINa* : 3 à 5 logarithmes. Parfois même on ne peut plus mettre en évidence aucune unité revivifiable.

— avec l'eau peptonée et avec l'eau physiologique à 50 p. 1000 de glucose : 3 à 4 logarithmes.

— avec l'eau physiologique à 5 p. 100 et 1 p. 100 de glutamate : 2 à 3 logarithmes.

— avec la solution de 10 p. 100 de Néo-peptone Difco : de 2 logarithmes environ.

— enfin, avec le bouillon-cœur-sérum on constate seulement une légère baisse de titre par rapport au titrage immédiat de référence.

En conclusion, parmi les diluants que nous avons expérimentés, le bouillon-cœur-sérum est le seul qui donne toute garantie pour le titrage de *M. mycoides* par la technique précédemment décrite.

Importance de l'homogénéité du vaccin.

L'homogénéité du vaccin devrait avoir aussi une grande influence sur l'uniformité des résultats des titrages par dilution.

En pratique, en utilisant un ovo-vaccin très finement et soigneusement broyé, l'expérience prouve qu'une centrifugation préalable, à faible vitesse, n'est pas indispensable. L'amélioration de la précision que l'on pourrait attendre de cette précaution supplémentaire n'est apparue nullement significative.

Titres des vaccins antipéri-pneumoniques.

Les titres des ovo-vaccins sont toujours plus faibles que ceux des vaccins-cultures. À l'état frais, le titre moyen des ovo-vaccins varie de 10^7 à 10^8 . Avec les vaccins-cultures, il n'est pas rare d'atteindre 10^{11} .

Mais ces résultats ne sont pas comparables. Les unités revivifiables qu'ils représentent ne sont pas identiques et ne correspondent pas au même nombre de germes vivants : l'expérience

montre que l'unité revivifiable de l'ovo-vaccin est beaucoup plus riche en germes que celle du vaccin-culture.

Ce rapport, entre les unités revivifiables et le nombre de germes vivants qu'elles représentent, est variable et différent avec tous les vaccins antipéri-pneumoniques. Ainsi les titres de deux vaccins ne pourront être valablement comparés que si ces derniers sont de même nature, de même composition, préparés suivant le même procédé (finesse du broyage etc...) et titrés par la même méthode.

Ces différentes notions étant acquises, nous avons pu aborder les autres problèmes concernant la lyophilisation, la conservation et l'utilisation de l'ovo-vaccin antipéri-pneumonique.

III. — LYOPHILISATION DE L'OVO-VACCIN

Sans « stabilisateur » ni « adjuvant »

La première étude a porté en premier lieu sur l'ovo-vaccin brut sans stabilisateur ni adjuvant.

Il est réparti en ampoules à fond plat de 2 ml à raison de 1 ml par ampoule, puis congelé et lyophilisé.

La cryo-dessiccation est relativement facile et s'effectue en 10 à 14 heures selon le type d'appareil utilisé.

Les ampoules sont scellées sous vide et conservées à -15°C .

Au cours de la lyophilisation, le titre baisse généralement d'un logarithme à un logarithme et demi, exceptionnellement de deux (tableau n° 2).

Avec adjuvant

Un certain nombre d'adjuvants ou de stabilisateurs ont été ensuite expérimentés pour faciliter la lyophilisation, pour diminuer la perte de titre et éventuellement pour améliorer la conservation.

Adjuvant A, constitué de :

sérum de cheval	80 ml
eau peptonée à 40 p. 100	20 ml
lactose	10 g

et utilisé, soit à parties égales avec le vaccin brut, soit à raison d'une partie pour trois parties de vaccin.

TABLEAU 2 - Perte de titre à la lyophilisation
(avec et sans "adjuvants" ou "stabilisateurs")

Numéro du lot de vaccin	Taux de dilution							
	à l'état frais				après lyophilisation			
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Lot n° 3 vaccin brut	5	5	5	4	5	5	1	-
Lot n° 4 vaccin brut	5	5	5	4	5	5	3	-
Lot n° 4 vaccin brut } adjuvant A } _{da}	5	5	5	3	5	5	2	-
Lot n° 4 vaccin brut } adjuvant B } ₉ 1	5	5	5	4	5	5	1	-
Lot n° 4 vaccin brut } adjuvant C } ₂ 1	5	5	5	3	5	5	3	-
Lot n° 5 vaccin brut } sérum cheval } _{da}	5	5	5	2	5	4	-	-
Lot n° 6 vaccin brut } sérum cheval } _{da}	5	5	5	2	5	5	1	-
Lot n° 7 vaccin brut } sérum cheval } _{da}	5	5	5	1	5	-	-	-
Lot n° 8 vaccin brut } sérum cheval } _{da}	5	5	5	3	5	5	1	-
Lot A (souche DK 1) vaccin brut } sérum cheval } _{da}	5	5	5	4	5	5	3	-

Le lot n° 5 a subi une perte assez prononcée.

Le lot n° 7 a été mal lyophilisé et n'a pas été utilisé : il a été éliminé.

La lyophilisation n'est pas sensiblement plus rapide et meilleure. La perte en unités revivifiables est identique à celle du vaccin brut (tableau n° 2).

Adjuvant B, constitué de :

saccharose	70 g
acide glutamique	1 g
eau distillée	100 ml
ajusté à pH	7,2

et utilisé à raison d'une partie d'adjuvant pour 9 parties de vaccin brut.

La lyophilisation est moins bonne, le produit semble manquer d'homogénéité. La perte en unités revivifiables est identique ou supérieure à celle constatée avec le vaccin brut (sans adjuvant).

Adjuvant C, constitué de :

lactose	30 g
acide glutamique	1 g
sérum de cheval	50 ml
eau distillée	50 ml
ajusté à pH	7,2

et utilisé à raison d'une partie d'adjuvant pour deux parties de vaccin brut.

Il ne s'est pas révélé plus favorable que les précédents.

En conclusion, il s'avère absolument illusoire d'ajouter un stabilisateur pour améliorer une lyophilisation qui est déjà excellente. Ce sont d'autres considérations qui nous ont amenés à ajouter 50 p, 100 de sérum de cheval à notre vaccin.

IV. — RECONSTITUTION ET DILUTION

La reconstitution et la dilution de l'ovo-vaccin au moment de son emploi pose plusieurs problèmes : celui du mode de reconstitution proprement dit, et celui de la survivance du micro-organisme après la réhydratation et la dilution.

Technique de reconstitution

L'ovo-vaccin brut se reconstitue assez difficilement, même après une excellente lyophilisation, et cette opération ne peut être réalisée correctement dans l'ampoule. Nous conseillons de briser l'ampoule et d'introduire la « pastille » de vaccin sec dans un flacon de type « plasma » contenant le volume requis d'eau distillée stérile réfrigérée et facultativement des billes de verre.

La reconstitution est rapide et totale, la dilution immédiate. Le produit est facilement prélevé à travers le bouchon de caoutchouc, tout en restant protégé des souillures extérieures. Le flacon est, d'autre part, conservé sur glace.

Ce procédé permet le conditionnement en ampoules de faible volume, facilite une longue conservation au congélateur et le transport sur glace. Enfin, les envois par avion à grandes distances sont simplifiés et moins onéreux.

Survie du micro-organisme après reconstitution et dilution

a) Rôle de la composition du diluant.

La reconstitution volume à volume s'effectue, comme nous l'avons signalé, sans perte de titre quel que soit le milieu choisi. Nous préconisons l'eau distillée d'un emploi plus simple et plus commode.

Cependant, au cours des opérations vaccinales, l'ovo-vaccin n'est pas seulement reconstitué mais dilué au 1/10^e ou au 1/20^e et même à ces faibles dilutions, on constate déjà comme dans le titrage, une perte sensible en unités revivifiables lorsqu'on n'utilise pas un diluant approprié.

Des séries de titrages comparatifs ont permis :

- de choisir le diluant le meilleur ;
- de déterminer le temps de survie des micro-organismes après reconstitution garantissant une dose sûrement vaccinale ;
- de fixer la température optima de conservation du vaccin reconstitué.

b) Choix d'un diluant.

L'expérimentation a porté successivement sur :

- l'eau distillée
- l'eau physiologique à 8,5 p. 1000 de ClNa ;
- l'eau physiologique à 50 p. 1000 de glucose ;
- la solution à 70 p. 1000 de saccharose ;
- l'eau peptonée ;
- le bouillon-cœur sans sérum ;
- l'eau distillée à 10 p. 100 de sérum ;
- le bouillon-cœur-sérum.

Comme dans l'utilisation du vaccin, des dilutions au 1/20^e sont préparées avec chacun de ces diluants, puis le titrage s'effectue selon la technique décrite avec le bouillon-cœur-sérum.

On constate une baisse de titre instantanée de 1 à 2 logarithmes avec n'importe lequel des six premiers diluants cités. Seules, l'eau distillée et l'eau physiologique additionnées de 10 p. 100 de sérum permettent une survie du micro-organisme identique à celle obtenue avec le bouillon-cœur-sérum, servant toujours de référence.

Dans ces mélanges, le sérum apparaît être le seul agent protecteur de *M. mycoides* ; le bouillon-cœur sans sérum se comportant, en effet, sensiblement comme l'eau distillée.

Ces essais mettent en évidence la nécessité impérieuse d'utiliser un diluant spécial, en l'occurrence du sérum de cheval, pour éviter une baisse de titre trop sensible.

Cette obligation fait perdre à l'ovo-vaccin beaucoup de ses avantages (simplicité de reconstitution et de conditionnement, faible volume, etc..) C'est pourquoi nous avons recherché un moyen de pallier ces inconvénients en incorporant le diluant au vaccin avant la lyophilisation. Nous avons ainsi précisé la concentration minima en sérum susceptible d'assurer une bonne protection des micro-organismes.

Elle s'est révélée aussi efficace avec 5 p. 100

TABLEAU 3 - Rôle du sérum de cheval.
Recherche de la concentration minima protectrice.

Nature du diluant	Taux de dilution						
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Bouillon-cœur-sérum Témoin	5	5	5	5	5	3	-
Eau physiologique à 20 p. 100 de sérum	5	5	5	5	4	2	-
Eau physiologique à 10 p. 100 de sérum	5	5	5	5	5	1	-
Eau physiologique à 5 p. 100 de sérum	5	5	5	5	5	2	-
Eau physiologique à 2 p. 100 de sérum	5	5	5	5	5	1	-
Eau physiologique à 1 p. 100 de sérum	5	5	5	1	-	-	-

L'ovo-vaccin lyophilisé est dilué au 1/20^e avec les différents diluants comme dans les conditions d'emploi ; ensuite le titrage (par dilution) est effectué immédiatement en bouillon-cœur-sérum à partir de chaque dilution.

Les chiffres représentent le nombre de tubes à culture positive pour chaque dilution (voir méthode).

qu'avec 10 p. 100 de sérum ; elle est encore satisfaisante, avec 2 p. 100 concentration qui semble être la limite inférieure, car, au-dessous, le titre décroît sensiblement (tableau n° 3).

Aussi nous incorporons à l'ovo-vaccin antipneumonique 50 p. 100 de sérum, qui, après reconstitution et dilution au 1/20^e donne une concentration protectrice de 2,5 p. 100.

Des expériences et des titrages ont prouvé l'efficacité de ce procédé, et la survie des microorganismes est suffisante pour offrir toutes les garanties d'efficacité.

Cette adjonction de sérum à l'avantage, d'autre part, de fluidifier le vaccin, de rendre sa répartition en ampoules plus aisée et sa reconstitution plus rapide.

c) Influence du temps de contact et de la température sur la survie de *M. mycoides* après reconstitution de l'ovo-vaccin.

Le premier facteur est très important et accentue la chute rapide et instantanée du nombre d'unités revivifiables constatées avec l'emploi d'un diluant non approprié. Des titrages sont effectués après 30 minutes et après une, deux, six, douze, dix-huit, et vingt-quatre heures de contact, avec chacun des diluants de l'expérimentation précédente. Les différences entre les pouvoirs protecteurs de ces solutions sont mis en évidence plus nettement qu'après le titrage immédiat.

Avec l'eau distillée, par exemple, le titre baisse rapidement et devient pratiquement nul vers la 6^e heure. L'eau saccharosée à 7 p. 100 permet, au contraire, une meilleure survivance, mais seules, l'eau distillée et l'eau physiologique additionnées de sérum, donnent des résultats satisfaisants et comparables à ceux obtenus avec le bouillon-cœur-sérum.

Cependant, cette chute de titre, proportionnelle au temps de contact, est très variable avec la température.

De nouveaux titrages ont donc été effectués après 30 minutes, une, deux, six heures de contact, respectivement à 4°C, à 24°C, à 37°C, et enfin à 45°C, mais uniquement avec le bouillon-cœur-sérum et avec l'ovo-vaccin lyophilisé à 50 p. 100 de sérum dilué avec l'eau distillée. Les résultats sont identiques dans ces deux cas, nouvelle démonstration de l'efficacité protectrice du sérum (ajouté au vaccin brut), avant la lyophilisation (tableau n° 4).

Titrages à + 4°C

Après une demi-heure de contact la chute de titre, si elle existe, n'est pas perceptible.

TABEAU 4 — Influence de la température et du temps sur le titre de l'ovo-vaccin reconstitué, et diluée au 1/20

Température	Temps de contact	Taux de dilution						
		10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
+ 4°C	immédiat	5	5	5	5	5	3	-
	1/2 h	5	5	5	5	5	3	-
	1 h	5	5	5	5	5	2	-
	2 h	5	5	5	5	3	-	-
	6 h	5	5	5	5	3	-	-
+ 24°C	1/2 h	5	5	5	5	5	1	-
	1 h	5	5	5	2	-	-	-
	2 h	5	5	5	4	-	-	-
	6 h	5	5	3	-	-	-	-
+ 37°C	1/2 h	5	5	5	5	5	2	-
	1 h	5	5	5	5	-	-	-
	2 h	5	5	3	2	-	-	-
	6 h	5	5	4	1	-	-	-
+ 45°C	1/2 h	5	5	5	4	-	-	-
	1 h	5	5	1	-	-	-	-
	2 h	5	3	-	-	-	-	-

Après une heure elle est apparente, mais encore difficile à apprécier.

Après deux heures, elle varie autour d'un logarithme.

Après 6 heures, elle n'est pas sensiblement plus prononcée qu'après deux heures.

Titrages à 24°C et 37°C

La diminution du nombre des unités revivifiables est très irrégulière et il n'est pas possible, du fait de la discordance des nombreux résultats que nous avons obtenus, de donner un ordre de grandeur de ce phénomène. Toutefois, cette perte est toujours sensible et amène rapidement le nombre des unités revivifiables à un taux inférieur à celui de la dose sûrement vaccinale.

Titrage à 45°C

A cette température, les germes sont très rapi-

dement tués et le vaccin perd toute sa virulence.

Du point de vue pratique, on constate que l'ovo-vaccin peut être utilisé efficacement pendant une heure après sa reconstitution *s'il est placé à + 4°C*, et que les températures supérieures ne permettent pas d'assurer une conservation suffisante des unités revivifiables.

V. — CONSERVATION DE L'OVO-VACCIN LYOPHILISÉ

Il était indispensable, avant toute utilisation par les services chargés de la prophylaxie, de s'assurer des propriétés de conservation de ce vaccin.

Des ampoules scellées sous vide ont été placées à -20°C , à $+4^{\circ}\text{C}$, à $+25^{\circ}\text{C}$ à $+37^{\circ}\text{C}$ et à 45°C pendant deux ans. Des titrages réguliers ont été effectués à des intervalles d'autant plus rapprochés que la température de conservation était plus élevée.

A — 20°C

L'ovo-vaccin lyophilisé se conserve très bien. Après un an, la baisse de titre n'est pas appréciable. Elle est encore inférieure à un logarithme après deux ans.

A + 4°C

La conservation est excellente, mais le titre baisse plus sensiblement qu'à -20°C . On enregistre, parfois sur certains lots, une baisse d'un logarithme après deux mois. Aussi, par précaution, nous déconseillons le stockage prolongé à cette température.

A + 25°C

La baisse de titre est sensible, mais, généralement, non appréciable en un mois. Elle varie entre un et un logarithme et demi, selon les lots, en deux ou trois mois.

A + 37°C

Le titre perd en moyenne un logarithme en dix jours et trois en un mois.

Enfin à + 45°C

Les micro-organismes sont tués rapidement. En 6 jours, aucune culture ne peut être obtenue par repiquage. Cette constatation prouve la nécessité d'une conservation sur glace au cours des expéditions sur les lieux d'utilisation.

VI. — DOSE VACCINALE ET MODE D'UTILISATION

La détermination de la dose vaccinale a déjà fait l'objet de certains commentaires (11, 12). Elle ne peut être définie qu'en fonction du mode d'application.

Nous préconisons la voie intradermique (13) mais en des régions bien définies et plus particulièrement la face supéro-externe du pavillon auriculaire (12), seul lieu d'élection où il soit relativement aisé de pratiquer une injection intradermique de 1 millilitre.

La dose sûrement vaccinale a été déterminée par cette voie. Elle est évaluée en *unités revivifiables* (*) définies par notre technique de titrage et n'a qu'une valeur relative.

Approximativement, la dose sûrement vaccinale est de 20.000 unités revivifiables. Cette détermination ne peut être qu'approximative étant donné les difficultés rencontrées pour expérimenter sur des lots de bovins homogènes.

Une plus grande précision dans la détermination de cette dose se heurte, d'autre part, comme nous l'avons déjà signalé (11), à l'absence de critère valable dans l'appréciation de l'immunité en matière de péripneumonie.

En pratique, tout lot de vaccin titrant moins de 10^6 unités par ml après lyophilisation est considéré comme insuffisant. Utilisé à la dilution au $1/20^{\circ}$ chaque animal reçoit un minimum de 50.000 unités revivifiables, c'est-à-dire plus de deux doses sûrement vaccinales.

VII. — SUITES VACCINALES

Les suites consécutives à l'emploi de ce vaccin ont déjà été décrites en détails (11) (12), mais nous voulons insister de nouveau sur un caractère qui est bien spécifique de l'ovo-vaccin ; le rôle d'adjuvant que jouent ses composants inertes (vitellus, débris embryonnaires, sérum).

Ces éléments font obstacle à la résorption lymphatique des germes au niveau du point d'inoculation. Si nous avons noté qu'avec de la sérosité virulente (11-12) ou avec des vaccins-

(*) Dans un article précédent (11) un lapsus nous a fait écrire *germes* à la place d'*unités*.

cultures virulents, on obtient rarement des réactions tissulaires par inoculation intra-dermique sur la face externe du pavillon auriculaire, au contraire, il est possible d'en observer avec l'ovo-vaccin provenant d'une souche cependant atténuée. Ce paradoxe ou cette contradiction apparente peut s'expliquer par un ralentissement de la résorption due aux composants inertes du vaccin. *M. mycoides* peut dans ces conditions cultiver *in situ* et gagner le tissu conjonctif sous-jacent pour provoquer une réaction de type willemsien. Ces accidents le plus souvent bénins ne constituent pas un obstacle à l'emploi de l'ovo-vaccin mais doivent être connus des utilisateurs (*).

VIII. — DISCUSSION

Il n'est pas nécessaire de reprendre chaque caractère de l'ovo-vaccin pour démontrer que son emploi s'impose dans la prophylaxie médicale de la Péripneumonie bovine en Afrique.

Rationnellement utilisé, le vaccin-culture qui a déjà donné des résultats inestimables (Mali) doit être abandonné au profit de cette nouvelle préparation. L'évolution des techniques prophylactiques et les considérations économiques et médicales l'imposent. D'ores et déjà, l'utilisation généralisée de l'ovo-vaccin et son application par voie intradermique au niveau de l'oreille doit permettre, en quelques années, de faire régresser considérablement cette affection.

Mais nous sommes amenés à faire un certain nombre de remarques sur les techniques que nous préconisons et à les comparer avec les résultats obtenus par d'autres auteurs.

Le titrage de l'ovo-vaccin est une question assez complexe dont les résultats doivent être discutés avec circonspection. La plupart des auteurs (PROVOST, PRIESTLEY, PIERCY et KNIGHT etc...) assimilent le titre de leur vaccin au nombre de micro-organismes vivants par ml. Cette interprétation peut porter à confusion et, à notre avis, il serait plus exact de parler d'unités revivifiables.

En effet, PIERCY et KNIGHT (5) constatent

(*) Nous signalons qu'au cours de l'année 1961 plus de 100.000 vaccinations avec ce type de vaccin ont déjà été effectuées au Sénégal et en Mauritanie, par voie intradermique.

que la congélation des œufs, avant la préparation du vaccin, augmente le titre de ce dernier. En fait, ce procédé accroît bien le nombre d'unités revivifiables pouvant être mises en évidence par titrage, mais il ne modifie en rien le nombre réel de micro-organismes vivants qui, seuls, confèrent au vaccin sa valeur immunogène. Son efficacité ne peut être améliorée par congélation et décongélation préalables. Son titre est peut-être plus élevé, mais, à quantité égale, le même nombre de micro-organismes est injecté. Il est donc très délicat de comparer les titres de deux vaccins différents, et impossible d'en déduire, *a priori*, des hypothèses valables sur leur pouvoir immunogène respectif.

La lyophilisation de l'ovo-vaccin ne présente aucune difficulté. PROVOST, VILLEMOT et QUEVAL (15) le diluent à parties égales avec un stabilisateur composé de :

glucose	108 g
sérum de cheval	100 ml
eau distillée q. s. p.	1.000 ml
pénicilline	1.000.000 U
pH.....	7

La reconstitution serait améliorée par l'adjonction de ce mélange. Le sérum de cheval, comme nous l'avons vu, doit jouer, ici également, le rôle protecteur vis-à-vis du micro-organisme.

La survie de *M. mycoides* après reconstitution a été abordée par PRIESTLEY (16) au sujet du titrage par dilution. Ses constatations ne concordent pas exactement avec les nôtres. Si la survie de *M. mycoides* est très limitée en eau distillée, selon cet auteur, elle serait bien meilleure en eau physiologique à 8,5 p. 1000 de CINa. Cependant, au laboratoire de Karthoum (17) certains auteurs se sont rapidement aperçu du rôle protecteur du sérum à 50 p. 100 vis-à-vis de ce micro-organisme.

Le saccharose, le mannitol et le glutamate permettraient d'améliorer la reconstitution du vaccin (18). Pour nous, ces adjuvants ne confèrent au germe qu'une protection insuffisante. C'est pour cette raison que nous avons été amenés à diluer notre ovo-vaccin brut dans 50 p. 100 de sérum dont le pouvoir protecteur est supérieur.

Pour conclure, nous constatons que les grands progrès réalisés dans l'amélioration de la prophylaxie médicale de la péripneumonie doivent déjà permettre une lutte plus efficace contre cette

affection. Cependant, il sera indispensable d'approfondir nos connaissances sur les processus intimes de la pathogénie et de l'immunogénèse si l'on veut améliorer les qualités de l'immunisation.

CONCLUSION

La préparation de l'ovo-vaccin péripneumonique est décrite.

Une méthode de titrage par dilution est mise au point. Il est insisté sur l'influence notable de la composition des diluants sur les titres obtenus.

Les problèmes de la lyophilisation sont abor-

dés et les qualités de conservation définies.

La reconstitution fait l'objet d'une étude particulière, qui met en évidence l'importance considérable de la nature du diluant et de la température de conservation après reconstitution sur le titre de l'ovo-vaccin.

Enfin, la dose « sûrement vaccinale » est définie en fonction du mode d'utilisation et de la technique de titrage choisie.

*Institut d'élevage et de médecine vétérinaire
des pays tropicaux :*

*Laboratoire national de recherches vétérinaires
« Georges Curasson », Dakar-Hann.*

SUMMARY

Contagious bovine pleuropneumonia. Avianised vaccine

The technique of production of avianised P. P. vaccine is described. A method of titration by dilution is explained. The marked effect on the titre, through variation of the composition of the diluents is emphasised. The problems of lyophilisation are referred to and the keeping qualities of the vaccine.

Reconstitution of the vaccine was studied particularly. This brought out the considerable effect on the titre of the type of diluent and of the ambient temperature after reconstitution.

The effective vaccinal dose is defined in accordance with the manner of administration and of titration.

RESUMEN

La perineumonia bovina. Estudio y puesta a punto de la ovo-vacuna antiperineumonica

Se describe la preparacion de la ovo-vacuna perineumonica.

Un metodo de titulacion por dilucion es puesto a punto. Se insiste en la marcada influencia de la composicion de los diluyentes sobre los titulos obtenidos.

Los problemas de la liofilizacion son abordados y la calidad de conservacion definida.

La reconstitucion hace referencia a un estudio particular que pone en evidencia la considerable importancia de la naturaleza del diluyente y de la temperatura de conservacion despues de reconstituir sobre el titulo de la ovo-vacuna.

Finalmente, la dosis que garantiza la vacunacion, se define en funcion del modo como se utilice y de la tecnica de titulacion empleada.

BIBLIOGRAPHIE

1. SHERIFF (D.) et PIERCY (S. E.). — **Experiments with an avianised strain of the organism of contagious Bovine Pleuro-pneumonia.** *Vet. Rec.*, 1952, 54 : 615.
2. SHERIFF (D.) et PIERCY (S. E.). — **Further observations on an avianised bovine pleuropneumonia vaccine in Kenya.** *Proceed 15th int. vet. Cong. Stockholm*, 1953, I : 333.
3. PIERCY (S. E.) et KNIGHT (G. J.). — **The growth and modification of organism of bovine pleuro-pneumonia in embryonated eggs.** *East. Afri. vet. Res. Org. Annual report*, 1954-1955, p. 43.
4. PIERCY (S. E.) et KNIGHT (G. J.). — **Studies with *Asterococcus mycoïdes* in embryonated eggs and the production of Pleuro-**

- pneumonia vaccine. *East. Afri. vet. Res. Org. Annual report, 1955-1956*, p. 67-79.
5. PIERCY (S. E.) et KNIGHT (G. J.). — Studies with avianised strains of the organism of Contagious Bovine Pleuro-pneumonia. IV. The préparation, titration and challenge of avianised bovine pleuro-pneumonia vaccine. *Bull. epiz. Dis. Africa*, 1957, 5 : 161.
 6. MENDES MARTIN (A.). — Subsídio para o estudo de peripneumonia contagiosa des bovinos em Angola. *Ministerio do Ultramar Lisboa*, 1958.
 7. PRIESTLEY (E. W.). — The growth of the contagious bovine pleuro-pneumonia organism in egg and its constituents. *Brit. vet. J.*, 1954, 110 : 517.
 8. PIERCY (S. E.) et KNIGHT (G. J.). — Strains with avianised strains of the organism of Contagious bovine Pleuro-pneumonia. *Vet. Rec.*, 1956, 68 : 367-373.
 9. THIERY (G.). — Etude des variations tissulaires saisonnières de quelques espèces vivant dans la région de Dakar. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, 12 : 273-292.
 10. PRIESTLEY (F. W.). — Immunisation against contagious bovine pleuro-pneumonia with special reference to the use of a dried vaccine. *J. comp. Path. Therap.*, 1955, 65 : 168.
 11. ORUE (J.), MEMERY (G.) et THIERY (G.). — La péripneumonie bovine. Le lymphotropisme de *Mycoplasma mycoides*. II. Conséquences sur la pathogénie et l'immunogénèse. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1961, 14 : 43-51.
 12. ORUE (J.) et MEMERY (G.). — Note sur la vaccination intradermique contre la péripneumonie contagieuse bovine. *Bull. Acad. vét.* 1960, 33 : 411-8.
 13. ORUE (J.) et MEMERY (G.). — La péripneumonie bovine. Précision sur une nouvelle voie d'immunisation. Résultats, conséquences et hypothèses. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1960, 13 : 161-173.
 14. ORUE (J.) et MEMERY (G.). — La péripneumonie contagieuse des bovidés. Immunité. Prophylaxie médicale. Traitement. *Note techn.*, n° 4, déc. 1960, Laboratoire central de l'Elevage de Dakar.
 15. PROVOST (A.), VILLEMOT (J. M.) et QUEVAL (R.). — Recherches immunologiques sur la péripneumonie VII. Immunisation au moyen d'une souche avianisée de *Mycoplasma mycoides var. mycoides* inoculée par la voie du mufle. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1959, 12 : 381-403.
 16. PRIESTLEY (F. W.). — Freeze-drying of the organism on contagious bovine Pleuro-pneumonia. *J. comp. Path. Therap.*, 1952, 62 : 125.
 17. ANONYMES. — On Contagious bovine Pleuro-pneumonia. Report to the Direction. Department of animal Production ; 1953-1955, Khartoum.
 18. PROVOST (A.). — Rapport de mission du Congrès International de Melbourne 1960. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1960, 13 : 181-204.