

Mise au point d'un vaccin mixte contre la maladie de Newcastle et le choléra aviaire

par J. RAMISSE, H. SERRES, J. M. BLANCOU, J. J. RIBOT
E. RAKOTONDRAMARY, J. RAZAFINDRAMANANA

RÉSUMÉ

Afin de simplifier la vaccination des volailles, les vaccins anti-Newcastle et anti-pasteurellique ont été associés.

Le premier de ces vaccins est lyophilisé et, à l'emploi, on le dilue dans le vaccin anti-pasteurellique tué à la Béta-propio lactone et aluminé. Plusieurs séries d'expériences ont montré :

- que le virus vaccin Newcastle peut être convenablement lyophilisé en lait écrémé ;
- qu'il conserve sa vitalité après dilution dans la culture de pasteurelles tuée, pourvu que la B. P. L. ayant servi à l'inactivation soit hydrolysée ;
- qu'il garde alors son pouvoir immunisant à un titre suffisamment élevé pour une utilisation efficace dans la pratique.

Parallèlement, le vaccin pasteurellique traité à la B. P. L. se montre au moins aussi actif que le vaccin formolé.

L'association de deux ou plusieurs vaccins présente l'avantage de réduire le nombre des interventions. Ce n'est pas négligeable lorsqu'on a affaire à des effectifs nombreux de volailles. L'administration séparée des vaccins anti-Newcastle et anti-pasteurellique nécessite l'emploi de deux seringues et se fait par deux injections successives. Le mélange des deux vaccins simplifie les opérations.

Nous avons donc recherché dans quelles conditions les deux vaccins pouvaient être associés. Le vaccin anti-pasteurellique s'administre sous le volume de 1 ml de culture tuée. Le vaccin anti-Newcastle constitué de liquide allantoidien infecté avirulent doit être dilué à l'emploi. Il était logique de penser à se servir de la suspension aluminée de Pasteurelles tuées pour diluer le virus vaccin Newcastle au moment de l'emploi. Cela implique que ce virus vaccin garde sa

vitalité dans le mélange. Il faut donc que l'agent inactivant des Pasteurelles soit inoffensif pour le virus Newcastle. Or le vaccin anti-pasteurellique formolé n'est pas convenable pour cela. Nous avons donc étudié la possibilité d'association avec :

- un vaccin anti-pasteurellique tué par la chaleur ;
- un vaccin anti-pasteurellique tué par la Bétapropio-lactone (B. P. L.).

D'autre part, pour améliorer la survie du virus vaccin pendant les expéditions, le transport en brousse et le stockage, nous avons dû envisager de le présenter sous forme lyophilisée. La lyophilisation augmentera le prix de revient du vaccin, mais permettra de se passer de glace pour l'expédition.

Nous nous sommes par conséquent proposés

de lyophiliser le virus vaccin Newcastle et de l'associer, au moment de l'emploi, avec le vaccin anti-pasteurellique en utilisant ce dernier comme diluant du premier, le mélange devant correspondre à 125 doses individuelles de 1 ml. Plusieurs points ont été successivement étudiés :

— Choix d'un agent inactivant pour la culture de Pasteurelles (chaleur ou B. P. L.).

— Choix d'un diluant pour la lyophilisation du virus vaccin Newcastle. En effet, le liquide allantoïdien n'est pas lyophilisé tel quel, mais dilué au 1/5^e ce qui, sous le volume de 1 ml correspond à 125 doses.

— Contrôle du pouvoir vaccinant du virus vaccin lyophilisé. Pour cela nous avons fait des comparaisons entre le virus témoin de référence (virus conservé au congélateur), le virus lyophilisé dilué dans de l'eau déminéralisée, et le virus lyophilisé dilué dans le vaccin anti-pasteurellique.

INACTIVATION DES PASTEURELLES PAR LA CHALEUR

La chaleur tue facilement les Pasteurelles. La suspension de Pasteurelles tuées est utilisable pour la dilution du virus vaccin Newcastle. Mais l'efficacité du vaccin mixte obtenu est presque nulle en ce qui concerne le choléra. C'est pourquoi nous ne nous étendrons pas sur cette technique qui a dû être abandonnée.

INACTIVATION DES PASTEURELLES PAR LA BÉTA-PROPIO-LACTONE

La B. P. L. est un agent antiseptique qui possède la propriété de s'hydrolyser rapidement dans l'eau et les solutions aqueuses. Selon GUILLOTEAU, l'hydrolyse de solutions aqueuses de B. P. L. se fait à 37 °C dans les conditions suivantes :

Concentrations en B. P. L. des solutions	Temps nécessaire pour qu'il y ait hydrolyse complète
—	—
0,06 p. 100	20 minutes
0,1 p. 100	20 minutes
0,3 p. 100	65 minutes
0,5 p. 100	75 minutes

Pendant l'hydrolyse, la solution s'acidifie. Il faut donc réajuster le pH.

Seule la B. P. L. est activement virulicide, les produits d'hydrolyse ne le sont pas.

Si l'on traite une suspension de Pasteurelles avec une concentration suffisante de B. P. L., les bactéries seront tuées, et au bout d'un certain temps, il n'y aura plus de B. P. L. active dans le milieu. Si on ajoute alors à cette suspension le virus Newcastle, celui-ci ne devrait pas être détruit. C'est ce que nous avons recherché.

1) Détermination de la quantité minimale de B. P. L. nécessaire pour l'inactivation des Pasteurelles.

a) Technique.

Nous avons additionné de B. P. L. des suspensions de Pasteurelles de densités bactériennes variées. Nous avons contrôlé l'inactivation en fonction de la concentration en B. P. L., et du temps de contact.

La technique est la suivante : on récolte dans 50 ml d'eau physiologique une culture de Pasteurelles sur gélose sérum en boîte de Roux de 1 l.

La densité optique de la suspension obtenue est déterminée au photomètre JOBIN et YVON, et le nombre de bactéries vivantes par dilution et ensemencement sur bouillon sérum. On effectue deux dilutions successives en eau physiologique de la suspension mère, de façon à obtenir au total trois échantillons de densités optiques décroissantes. Chacun de ces trois échantillons est lui-même subdivisé en deux séries de quatre ballons dans lesquels on ajoute les concentrations suivantes de B. P. L. :

1 p. 100, 0,5 p. 100, 0,25 p. 100, 0,12 p. 100.

Pour chaque concentration, l'un des ballons est placé à 37 °C, l'autre est laissé à la température du Laboratoire.

On contrôle l'inactivation par ensemencement de la culture traitée sur bouillon sérum, après 2 H, 6 H et 24 H de contact.

b) Résultats.

Trois suspensions de Pasteurelles ont été soumises à l'action de la B. P. L. Leurs densités optiques et leurs teneurs en bactéries sont les suivantes :

Suspension A (origine) :

Densité optique : 0,85.

Numération par dilution : 10^7 germes vivants/ml.

Suspension B (suspension A diluée au $1/10^6$) :

Densité optique : 0,4.

Numération : 10_8 germes vivants/ml.

Suspension C (suspension A diluée au $1/1.000^6$)

Densité optique : 0,18.

Numération : 10^4 germes vivants/ml.

Les résultats des contrôles d'inactivation sont représentés dans le tableau I.

La concentration de 0,5 p. 100 permet de tuer à tous coups les Pasteurelles, même en suspensions concentrées, et dans un laps de temps assez court, qui apporte toute sécurité.

2) Pouvoir immunogène des suspensions de Pasteurelles traitées à la B. P. L.

Le vaccin est un mélange à volume égal d'une culture de Pasteurelles en bouillon traitée à la B. P. L., et de gel d'alumine à 2 p. 100 d'extrait sec. Le pH du vaccin est réajusté à 7. La dose vaccinale est de 1 ml à injecter par voie sous-cutanée.

Deux lots de poulets ont été vaccinés, puis éprouvés 3 semaines après. Les résultats de l'épreuve sont les suivants :

1^{er} lot : épreuve avec $1/16^6$ de ml de culture virulente :

Poulets vaccinés (6) : tous ont résisté.

Témoins (2) : tous sont morts en moins de 48 H.

2^e lot : épreuve avec $1/8^6$ de ml de culture virulente :

Poulets vaccinés : survivants = 7

morts en moins de 48 H = 6

morts en moins de 24 H = 2

Témoins : tous morts en moins de 24 H.

Bien qu'il n'y ait pas eu protection totale contre une épreuve très sévère, ces résultats sont à considérer comme corrects dans les conditions de l'expérience. En effet, avec le vaccin formolé, si l'on se contente d'une vaccination unique, les résultats ne sont pas meilleurs.

VITALITÉ DU VIRUS VACCIN NEWCASTLE DANS UNE SOLUTION HYDROLYSÉE DE B.P.L.

Le virus Newcastle a été dilué à 10^{-2} dans deux solutions hydrolysées de B. P. L. dont la concentration initiale était de 0,5 p. 100. L'une a été conservée 1 mois à 4 °C, l'autre 24 H à 20 °C, avant de servir pour la dilution du virus. Après un contact de 24 H à 4 °C le virus a été titré sur embryon de poulet. Les résultats sont les suivants :

— Virus décongelé

(de référence) : DL 50 = 10^{-9}

— Virus dilué dans la solution

hydrolysée de B. P. L. : DL 50 = $10^{-7,4}$

(préparée depuis 24 H).

— Virus dilué dans la solution

hydrolysée de B. P. L. : DL 50 = $10^{-8,66}$

(préparée depuis 1 mois).

Les solutions hydrolysées de B. P. L., ont un effet négligeable (solution de 1 mois) ou réduit (solution de 24 H) sur le virus Newcastle.

TABLEAU N° I

Concentrations minimales de β - propio - lactone nécessaires pour tuer les suspensions de Pasteurelles.

Nature des suspensions traitées	Temps de contact		
	2 h	6 h	24 h
A (10^7 Past/ml)	0,25 p.100	0,25 p.100	0,12 p;100
B (10^6 Past/ml)	0,25 "	0,25 "	0,12 "
C (10^4 Past/ml)	0,12 "	0,12 "	0,12 "

Il apparaît donc possible de tuer les Pasteurelles avec la B. P. L. et de mélanger la suspension de Pasteurelles ainsi traitée avec le virus vaccin Newcastle.

CHOIX D'UN DILUANT POUR LA LYOPHILISATION DU VIRUS VACCIN NEWCASTLE

Actuellement le virus vaccin est présenté liquide en ampoules sous le volume de 0,2 ml correspondant à 125 doses. Mais il ne serait pas très commode de lyophiliser 0,2 ml dans un flacon de 5 ml. Pour augmenter le volume du produit à lyophiliser, nous devons donc le diluer, le diluant servant de support. Le virus est dilué au 1/5^e, ce qui forme dans le fond du flacon une couche de 2 à 3 mm. La nature du diluant joue un rôle important pour la vitalité du virus lyophilisé.

Un travail précédent de BOURDIN a montré que le virus Newcastle pur se lyophilise très bien sans chute notable du titre. Mais l'adjonction d'un diluant pouvant modifier le titre, nous avons dû tester un certain nombre de produits susceptibles de servir comme diluants :

a) le bouillon de culture pour Pasteurelles ;

Ce milieu s'est révélé inadéquat car il se lyophilise mal, et le produit terminal est « moussieux ».

b) le sérum de veau ;

c) le lait écrémé stérilisé à l'autoclave ;

d) l'eau peptonée à 10 p. 100 ;

e) la polyvinyl pyrrolidone à 10 p. 100 en eau déminéralisée ;

f) un tampon physiologique aux phosphates de pH neutre ;

g) un tampon phosphaté peptoné de pH neutre ;

h) l'eau distillée.

D'autre part, nous avons comparé deux modes de lyophilisation :

— *En ampoules* : le virus dilué est réparti sous le volume de 1 ml en ampoules de 10 ml. Il est congelé en coquille à -70°C . Les ampoules sont ensuite fixées aux tétines d'un lyophi-

lisateur USIFROID (MS 104) dont le condenseur-piège est refroidi à -180°C par l'azote liquide. La lyophilisation dure de 4 à 5 H. Les ampoules sont scellées sous azote rectifié. Le virus est ensuite conservé à 4°C en attendant le titrage

— *En flacons* : le virus dilué est réparti sous le volume de 1 ml en flacons de 5 ml ou de 20 ml. Le virus est congelé en masse, sous une épaisseur de 2 à 3 mm, au contact des plateaux réfrigérés d'un lyophilisateur BONNET SOGEV (JUNIOR). La congélation est lente (1 H environ) et n'atteint que -30 à -32°C . La sublimation est complète au bout de 15 à 20 H. Le vide descend à $3 \cdot 10^{-2}$. Le bouchage des flacons se fait sous vide. Le virus est conservé à 4°C en attendant le titrage.

Pour le titrage, le virus est dilué en eau déminéralisée, inoculé à des embryons de poulet de 10 jours. Les résultats sont notés après 3 jours d'incubation des embryons inoculés. Chaque lot de lyophilisation est comparé au virus initial dont il dérive, et qui a été conservé au congélateur.

Les résultats des titrages sont groupés dans le tableau II.

La lyophilisation du virus dilué entraîne une chute du titre. Cependant avec le lait écrémé et l'eau peptonée, la chute est moins importante. A condition de lyophiliser un virus de titre élevé, le résultat final est acceptable.

En raison de l'économie, nous avons opté pour le lait écrémé comme diluant courant.

CONTRÔLE DU TITRE ET DU POUVOIR VACCINANT DU VIRUS NEWCASTLE LYOPHILISÉ DANS LA CULTURE DE PASTEURELLES TRAITÉE A LA B. P. L.

A) Titrage sur embryon du virus lyophilisé dilué dans une suspension de Pasteurelles traitée à la B. P. L., et additionnée de gel d'alumine.

Deux essais ont été réalisés. Nous avons fait varier :

1^o le taux de dilution du virus lyophilisé dans la culture traitée (1/500^e et 1/1.000).

2^o le délai entre le traitement de la culture à la B. P. L., et la dilution du virus dans la culture tuée (11 j. et 4 j.) ;

TABLEAU N°II
Titration du virus Newcastle lyophilisé

N° de l'essai	Virus	Mode de lyophilisation	Diluant	Titre sur embryons de poulet
1	P 81 lyophilisé	Flacons	Tampon phosphaté Tampon peptoné Eau distillée	DL 50 = 10^{-6} DL 50 = 10^{-7} DL 50 = 10^{-6}
	P 81 congelé (témoin)			DL 50 = 10^{-10}
2	P 82 lyophilisé	Ampoules	Lait écrémé Eau peptonée 10p.100 Bouillon de culture pour Pasteurelles Subtosan 10 p. 100 Sérum de veau	DL 50 = $10^{-7,6}$ DL 50 = 10^{-7} DL 50 = $10^{-7,7}$ DL 50 = $10^{-6,5}$ DL 50 = $10^{-6,2}$
	P 82 congelé (témoin)			DL 50 = 10^{-9}
3	P 82 lyophilisé	Ampoules	Lait écrémé Peptone 10 p. 100	DL 50 = $10^{-8,2}$ DL 50 = $10^{-7,3}$
	P 82 congelé (témoin)			DL 50 = $10^{-8,8}$
4	P 82 lyophilisé	Flacons	Lait écrémé Peptoné 10 p. 100	DL 50 = $10^{-7,5}$ DL 50 = $10^{-7,7}$
	P 82 congelé (témoin)			DL 50 = 10^{-10}

TABLEAU N°III

Titration du virus lyophilisé dilué dans la culture de pasteurelles tuées à la β .P.L.

Virus	Mode de lyophilisation	Diluant de lyophilisation	Diluant du virus lyophilisé après reconstitution	Taux de dilution	Temps de contact	Résultats des titrages
P 81 lyophilisé	Flacon	Tampon peptoné	Culture de pasteurelles traitée à la β .P.L. depuis 11j.	1/500	48 h à 4° C	DL 50 = $10^{-7,4}$
			Même culture mais additionnée d'alumine	1/500	48 h à 4° C	DL 50 = $10^{-6,7}$
P 81 décongelé	Virus témoin de référence dilué en eau déminéralisée			1/500	48 h à 4° C	DL 50 = 10^{-9}
P 83 lyophilisé	Flacon	Lait écrémé	Culture de pasteurelles traitée à la β .P.L. depuis 4 j.	1/1000	24 h à 4° C	DL 50 = $10^{-7,2}$
			Eau déminéralisée	1/1000	24 h à 4° C	DL 50 = 10^{-8}
P 83 décongelé	Virus témoin de référence dilué en eau déminéralisée			1/1000	24 h à 4° C	DL 50 = $10^{-8,7}$

3^o le temps de contact du virus et du diluant (48 H et 24 H à 4 °C).

Nous avons également titré, comme référence, le virus décongelé du lot dont dérivait le virus lyophilisé. Le virus témoin a été dilué en eau déminéralisée. Le virus lyophilisé a été dilué soit dans la culture tuée à la B. P. L. additionnée ou non de gel d'alumine, soit en eau déminéralisée. Pour les dilutions suivantes en vue du titrage, nous avons pris l'eau déminéralisée.

Nous avons noté les résultats après une incubation de 3 jours des embryons inoculés.

Les résultats sont résumés dans le tableau III.

A la lecture du tableau, on s'aperçoit :

1) que la lyophilisation du virus en lait écrémé n'a provoqué qu'une baisse modérée du titre ;

2) que la dilution du virus Newcastle dans la culture de Pasteurelles traitée à la B. P. L. depuis plusieurs jours entraîne une nouvelle chute du titre ;

3) que l'addition d'alumine hydratée à la culture servant de diluant, abaisse encore légèrement le titre.

Mais si l'on utilise au départ un virus de titre suffisamment élevé, le titre final du virus dilué dans le vaccin cholérique demeure très acceptable ($10^{-6,7}$) pour la pratique.

B) Pouvoir vaccinant du virus Newcastle lyophilisé dilué avec la culture de Pasteurelles traitée à la B. P. L.

Les différentes dilutions de virus vaccin ont été injectées par voie sous-cutanée (dose : 1 ml) à 66 poulets neufs de 6 semaines.

Simultanément, nous avons testé le virus vaccin congelé servant de référence, le virus lyophilisé dilué en eau déminéralisée, le virus lyophilisé dilué avec la culture de Pasteurelles traitée, et le virus lyophilisé dilué avec la même culture mais additionnée d'alumine hydratée.

Nous avons éprouvé individuellement les poulets, 10 jours après la vaccination, avec 1/4 de ml de virus virulent pur ($3,5 \times 10^5$ DL) injecté en sous-cutanée. 12 témoins non vaccinés ont servi de comparaison.

Les symptômes sont apparus dans les 4 jours suivant l'épreuve.

Nous rapportons les résultats dans le tableau IV.

D'après les résultats, il s'avère que le virus vaccin Newcastle lyophilisé et dilué à l'emploi dans le vaccin pasteurellique tué à la B. P. L. protège les poulets au moins jusqu'à la dilution 10^{-6} . Or la dilution d'emploi est de 2×10^{-3} . Il y a donc une importante marge de sécurité.

*Institut d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux
Laboratoire Central de l'Élevage
Tananarive.*

TABLEAU N° IV

Epreuve des poulets vaccinés avec le virus Newcastle lyophilisé

Lot de vaccin	Excipient de lyophilisation	Diluant du virus vaccin à l'emploi	Taux de dilution	Nombre de poulets	Résultats de l'épreuve
P 82	Lait écrémé	eau déminéralisée	de 10^{-3} à 10^{-6}	4 x 3	tous ont résisté
P 83	Lait écrémé	eau déminéralisée	de 10^{-3} à 10^{-6}	4 x 3	tous ont résisté
P 83	Lait écrémé	culture de pasteurelles traitée à la B.P.L. depuis 4 jours (ph 7)	de 10^{-3} à 10^{-6}	4 x 3	tous ont résisté
P 83	Lait écrémé	culture de pasteurelles traitée à la B.P.L. depuis 45 jours et additionnée d'alumine (ph 7)	de 10^{-3} à 10^{-6}	4 x 4	tous ont résisté sauf un (vacciné à la dilution 10^{-6})
P 83	Lait écrémé	culture de pasteurelles traitée à la B.P.L. depuis 4 jours et additionnée d'alumine (ph 7)	de 10^{-3} à 10^{-6}	4 x 4	tous ont résisté
Témoins non vaccinés				12	tous sont morts

SUMMARY

A mixed vaccine against Newcastle Disease and Fowl Cholera

In order to simplify the vaccination of poultry, we have sought to combine the vaccines of Newcastle Disease and Fowl Cholera.

The Newcastle vaccine is lyophilised and, at the time of use, is diluted with the Fowl Cholera vaccine, which is killed by Beta-propiolactone and aluminised.

Several series of experiments have shown that :

— the virus of Newcastle vaccine can conveniently be lyophilised in skimmed milk ;

— its vitality is preserved after dilution with the killed culture of Pasteurella, as long as the B. P. L. usef for the inactivation is hydrolysed ;

— it then keeps its immunising properties at a level sufficiently high for its practical use.

Similarly, the Fowl Cholera vaccine treated with B. P. L. is found to be as active as the formolised vaccine.

RESUMEN

Mejora de una vacuna mixta contra la enfermedad de Newcastle y el colera aviar

Para simplificar la vacunación de las aves, se ensayó asociar las vacunas contra la enfermedad de Newcastle y contra el colera aviar. Se liofiliza el primer de dichas vacunas, y al utilizar se le dilue en la vacuna contra el colera aviar matada por la beta-propiolactone y aluminada.

Varias series de experiencias mostraron que :

— se puede liofilizar convenientemente al virus vacuna Newcastle en leche desnatada.

— conserva su vitalidad despues de la dilución el cultivo de pasteurelas-matadas, con tal de que la B. P. L. utilizada para la inactivación esté hidrolisada

— guarda entonces su poder inmunizante en un título bastante elevado para una utilización práctica eficaz.

Paralelamente, se encuentra la vacuna contra el colera aviar tratada con la B. P. L. por lo menos tan activa como la vacuna sometida a la acción del formol.

BIBLIOGRAPHIE

BOURDIN (P.). — **Lyophilisation du virus vaccin Newcastle.** Rapport annuel du Laboratoire Central de l'Elevage, Madagascar, 1963 : 141.

COTTEREAU (P.). — **Les divers types de vaccins et leurs indications dans la prévention de la maladie de Newcastle et de la bronchite infectieuse des volailles.** *Rev. Méd. Vét.*, 1965, 126, 347-70.

FAYET (M. T.). — **La courbe d'inactivation du virus aphteux par la B. propio-lactone.** *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, 112, 145-52.

GUILLOTEAU (B.). — **Vaccins antirabiques formolés et lactonés formolés d'usage vétérinaire.** Alfort, Au manuscrit, 1963. Thèse Méd. vét. 1963. n° 75.

LANCASTER. — **Newcastle disease — Control by vaccination.** *Vet. Bull.* 1964, 34, 57.