

# Un vaccin mixte antibovipestique-antipéripneumonique lyophilisé utilisable, sur le terrain, sans réfrigération

## II. Utilisation du vaccin sur le terrain

par A. PROVOST (\*) et C. BORREDON (\*) (\*\*)

### RESUME

Les auteurs donnent les modalités de la technique qui leur a permis d'obtenir un vaccin mixte antibovipestique-antipéripneumonique lyophilisé qui, après reconstitution, conserve ses qualités immunogènes à la température ambiante pendant dix jours, sous réserve d'être conservé en milieu frais et à l'abri de toute exposition directe aux rayons solaires.

*L'imagination est plus importante  
que la connaissance.*

Albert EINSTEIN.

Au regard de l'inactivation thermique, il est banal de dire que le comportement d'un virus est différent selon qu'il est lyophilisé ou en phase liquide hydrique. La comparaison des familles de droites d'inactivation du vaccin bovipestique des figures 1 et 2, établies pour des températures allant de celle de la glace fondante à 50° C, d'après des données colligées de plusieurs auteurs, montre clairement le phénomène. En pratique, cette inactivation en phase hydrique impose la double nécessité de la réhydratation du vaccin bovipestique avec un diluant réfrigéré et de la conservation de la suspension vaccinale sous froid pendant les opérations de vaccination afin que le produit

possède, lors de l'inoculation à l'animal, la richesse en virus de 10<sup>2,5</sup> DCP<sub>50</sub> par dose vaccinale imposée par les normes internationales (11).

Le variant 16b-1009 du virus-vaccin bovipestique n'échappe pas à la règle. Alors que sa demi-vie est considérablement augmentée à l'état lyophile (4 jours à la température de 45° C pour le variant au lieu de 1,8 jour pour son parent originel), l'inactivation des deux populations virales est identique à cette température lorsqu'ils sont en phase liquide hydrique (22). En première approche, il paraissait donc impossible de se passer du froid, même avec le variant 16b-1009, par suite de la nécessité de la réhydratation dans un diluant réfrigéré. Il n'aurait donc été que de peu d'utilité de l'avoir cloné si, dans la pratique, on devait l'utiliser dans les mêmes conditions et avec le même support logistique que le vaccin lyophilisé antibovipestique courant.

(\*) I.E.M.V.T., Laboratoire de Recherches vétérinaires de Farcha, B.P. 433, N'Djamena, Tchad.

(\*\*) Aide technique de Mme G. DUFAU et M. Z. N'GALDAM. Certaines expériences ont été réalisées avec le Dr LAPLANCHE à Nokou (Tchad); les auteurs sont heureux de le remercier ici.

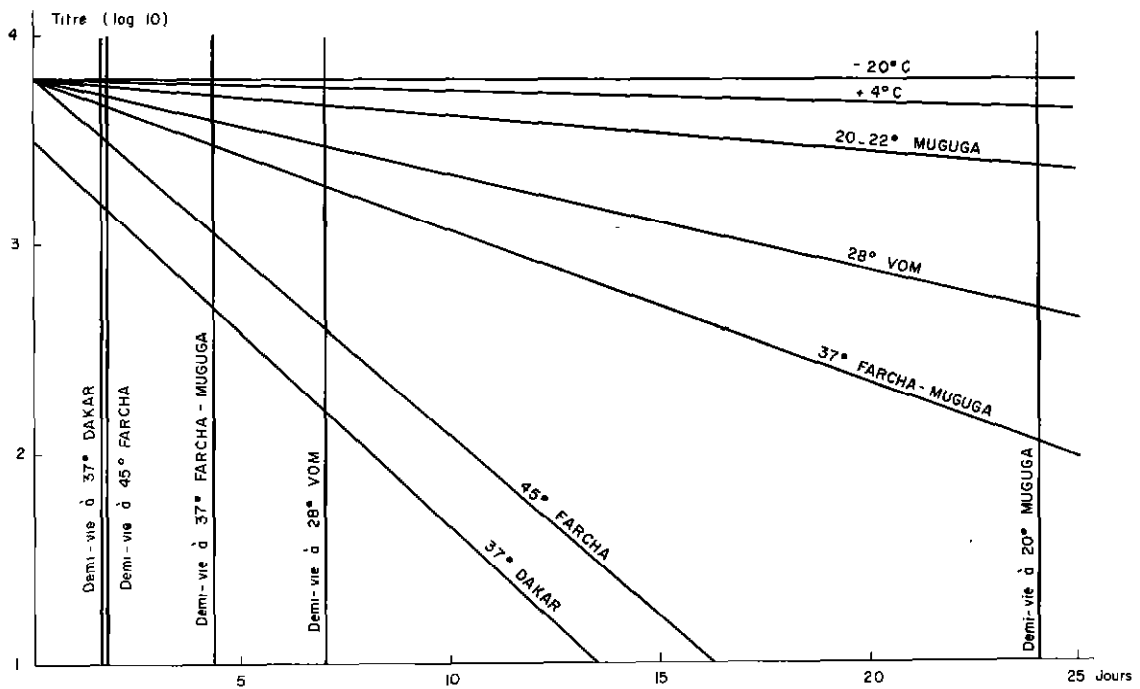


Fig. 1. — Inactivation du virus-vaccin bovipestique lyophilisé (cultures cellulaires) à différentes températures.

Cette figure composite, dont les éléments sont tirés des résultats publiés par différents laboratoires (2, 14), reflète le comportement disparate du produit selon les températures et les diluants de lyophilisation. Pour la commodité de la lecture, on a donné aux droites la même origine sauf pour le vaccin de Dakar, ce qui n'influe pas sur la pente des droites ni sur la demi-vie.

Par ailleurs, depuis 1965, on utilise au Tchad un vaccin mixte antibovipestique-antipéripleurmonique (23). C'est donc dans l'optique de l'utilisation du vaccin sur le terrain que devaient être étudiées les conditions pratiques d'incorporation du variant bovipestique 16b-1009 à la formule vaccinale. De toutes manières, le problème posé revenait à celui du froid en tournée de vaccination, froid qui depuis 1966-67 n'existe plus dans les conditions de brousse au Tchad.

Plusieurs solutions étaient de prime abord envisageables :

— Produire un vaccin de très haut titre pour ses deux constituants, virus bovipestique et microbe péripleurmonique, de façon à ce que les titres minimaux requis soient présents dans la dose vaccinale injectée à l'animal, après les pertes inéluctables dues à l'inactivation thermique : au cours de la conservation et du

transport à température ambiante (minimisées, il est vrai, avec le variant 16b-1009), lors de la réhydratation avec un diluant lui aussi à température ambiante, pendant le délai d'utilisation de la suspension vaccinale. C'était agir sans aucun contrôle, donc trop risqué.

— Trouver une source de froid de production commode en brousse. Dans cet ordre d'idée, on a pensé à l'urée ou au nitrate d'ammonium, dont on sait que le mélange à parties égales en poids avec l'eau produit en quelques minutes un abaissement de température de 29° C du mélange. On aurait donc pu imaginer pouvoir de la sorte réfrigérer le diluant du vaccin (20). Un rapide calcul a montré qu'étant donné le prix de l'urée, il y avait peu d'avantages à recourir à cette source de froid. Par ailleurs, un simple essai indiquait que l'on ne pouvait songer à l'utilisation de la solution rafraîchie d'urée comme diluant, le virus bovipestique y étant instantanément inactivé (20).

DCP 50/0,2 ml

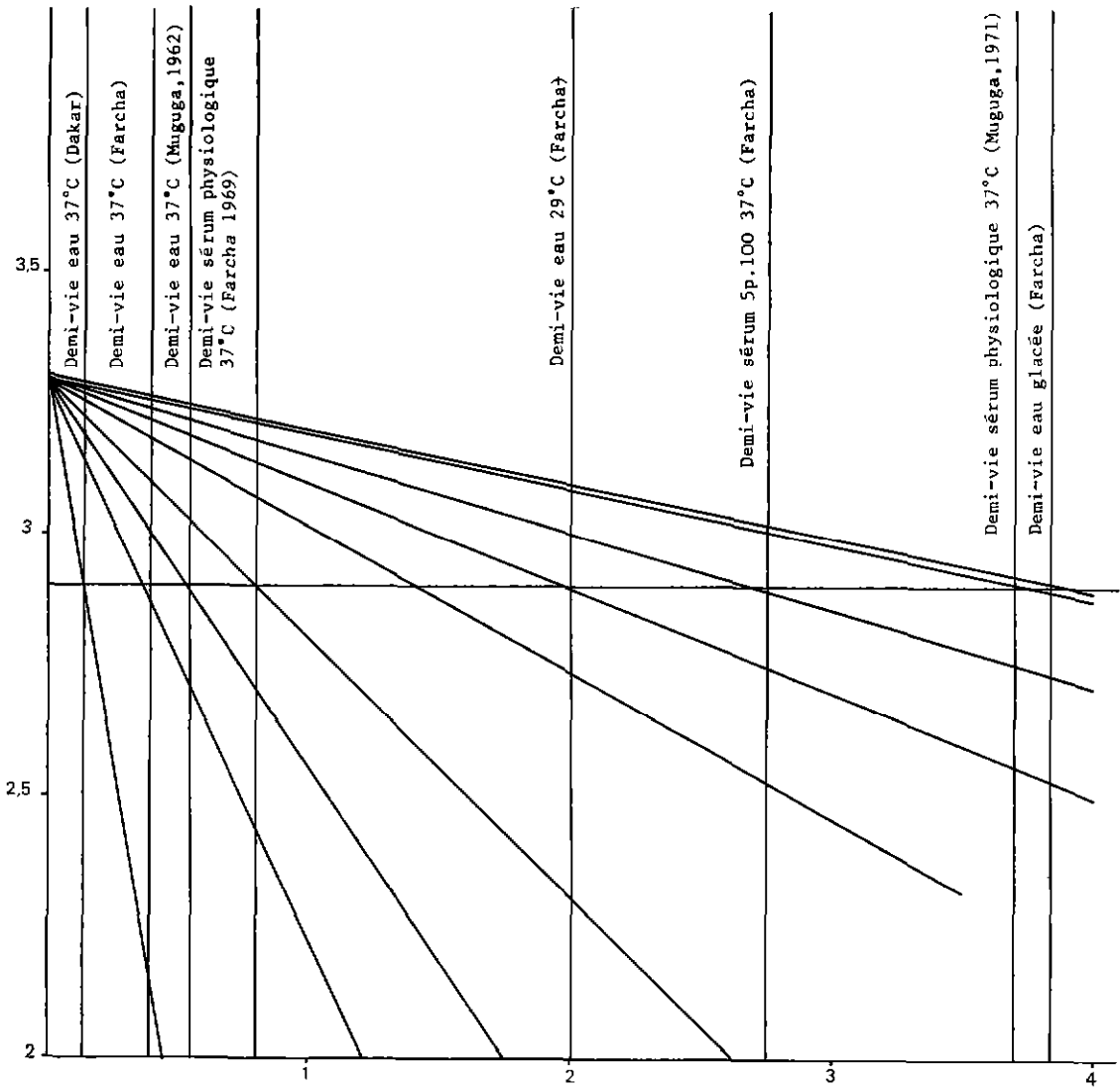


Fig. 2. — Inactivation du virus vaccin bovipestique en phase liquide.

— Revenir à la première idée : vaccin de très hauts titres où serait incorporé le variant 16b-1009, qui ne serait que rafraîchi par des moyens conventionnels du type alcarazas pendant son transport vers le lieu de vaccination; la réhydratation pourrait se faire avec une solution molaire de sulfate de magnésium (ou de sodium) qui assure une protection contre la dégradation thermique du virus bovipestique en phase liquide, comme on l'a déjà montré il y a un certain temps (19, 23, 25).

Il restait si l'on voulait adopter cette solution

à résoudre des inconnues de taille : comportement du virus-vaccin bovipestique sur le terrain dans les conditions de la pratique et, surtout, comportement du composant péripneumonique dans la solution molaire de sulfate de magnésium dont on pouvait craindre qu'elle ne fût délétère par sa pression osmotique pour les fragiles corps mycoplasmatiques.

L'exposé des essais qui ont conduit aux solutions adoptées dans la pratique de la vaccination antipestique-antipéripneumonique au Tchad fait l'objet de cet article.

## I. UTILISATION DU VARIANT 16 b-1009 SUR LE TERRAIN.

### MATERIEL ET METHODES

#### 1. Vaccin

Nous ne reviendrons pas sur la méthodologie de la production du vaccin antibovipestique de cultures cellulaires ni sur celle du vaccin mixte antibovipestique - antipéripnéumonique, déjà largement décrites par ailleurs (24).

Dans cette première partie de l'exposé, on ne s'occupera que du composant bovine pestique du vaccin mixte confectionné avec le variant 16b-1009.

La richesse en virus est calculée classiquement par infection de tubes de cultures cellulaires secondaires de rein d'embryon de veau avec des dilutions du vaccin en sérum physiologique ou en solution molaire de sulfate de magnésium et appréciation visuelle de l'effet cytopathique 12 jours après l'infection. Selon les lots, on obtient des titres allant de  $10^4$  à  $10^{5,2}$  par ml de vaccin reconstitué à son volume initial avant la lyophilisation.

En fonction des expériences, le vaccin lyophilisé est soumis à divers traitements : séjour de 15 jours à l'étuve à  $45^\circ\text{C}$ , conservation à l'abri de la lumière à température ambiante, conservation en caisse de sable humidifié, ainsi qu'il sera précisé plus loin.

Les liquides de réhydratation et de dilution du vaccin lyophilisé, eau distillée ou solution molaire de sulfate de magnésium, ont subi le même traitement, c'est-à-dire se trouvent au moment de l'emploi à la même température que le vaccin. On s'est ainsi toujours placé dans les conditions de la pratique de la vaccination sans glace.

#### 2. Animaux d'expérience

Zébus arabes âgés de 1 à 3 ans, nés et vivant dans des troupeaux quasi sédentaires près de Nokou (Tchad), en principe non vaccinés contre la peste bovine malgré l'obligation qu'en fait la législation tchadienne; avant l'inoculation de vaccin, tous subissent une prise de sang destinée à contrôler leurs anticorps (14).

Les modalités spéciales à l'essai seront exposées plus loin.

#### 3. Tests sérologiques

On a classiquement utilisé la réaction de séro-neutralisation en cultures cellulaires selon la technique de PLOWRIGHT et FER-RIS (18). Les titres sont exprimés par l'exposant du  $\log_{10}$  du titre neutralisant 50 p. 100 ( $TN_{50}$ ).

### RESULTATS

#### 1. Relevé thermométrique de la température dans des caisses de sable humidifié

Les essais réalisés, en novembre et en mai, sont simples : on dispose des caissettes de sable que l'on humidifie avec de l'eau à température ambiante; on relève durant un nyctémère les températures extérieures et au sein du sable.

La figure 3 donne l'exemple de relevés thermométriques de ces températures au mois de mai. La température du sable ne subit pas de grandes amplitudes.

Un autre essai, réalisé en brousse, donne les chiffres suivants :

		t° extérieure	t° sable
Jour 1	8 h	15°	22°
	15 h	33°	28°
	18 h	32°	28°
			— humidif.
Jour 2	8 h	15°	19°
	15 h	32°	
	18 h	29°	25°
			— humidif.
Jour 3	8 h	14°	17°
	18 h	29°	22°

Il est apparu, au cours de cet essai, que le sable présente le désavantage de gonfler au contact de l'eau avec comme conséquence l'éclatement de la caisse qui le contient. Il paraît plus avantageux de le remplacer par des copeaux de bois ou des linges placés dans un sac de jute qui, au demeurant, permettent une plus large évaporation mais nécessitent des humidifications plus fréquentes.

#### 2. Comportement du virus vaccinal en solution molaire de sulfate de magnésium à $45^\circ\text{C}$

L'inactivation du variant 16b-1009 en solution sulfato-magnésienne est illustrée dans la figure 4 où, en comparaison, on a aussi reporté

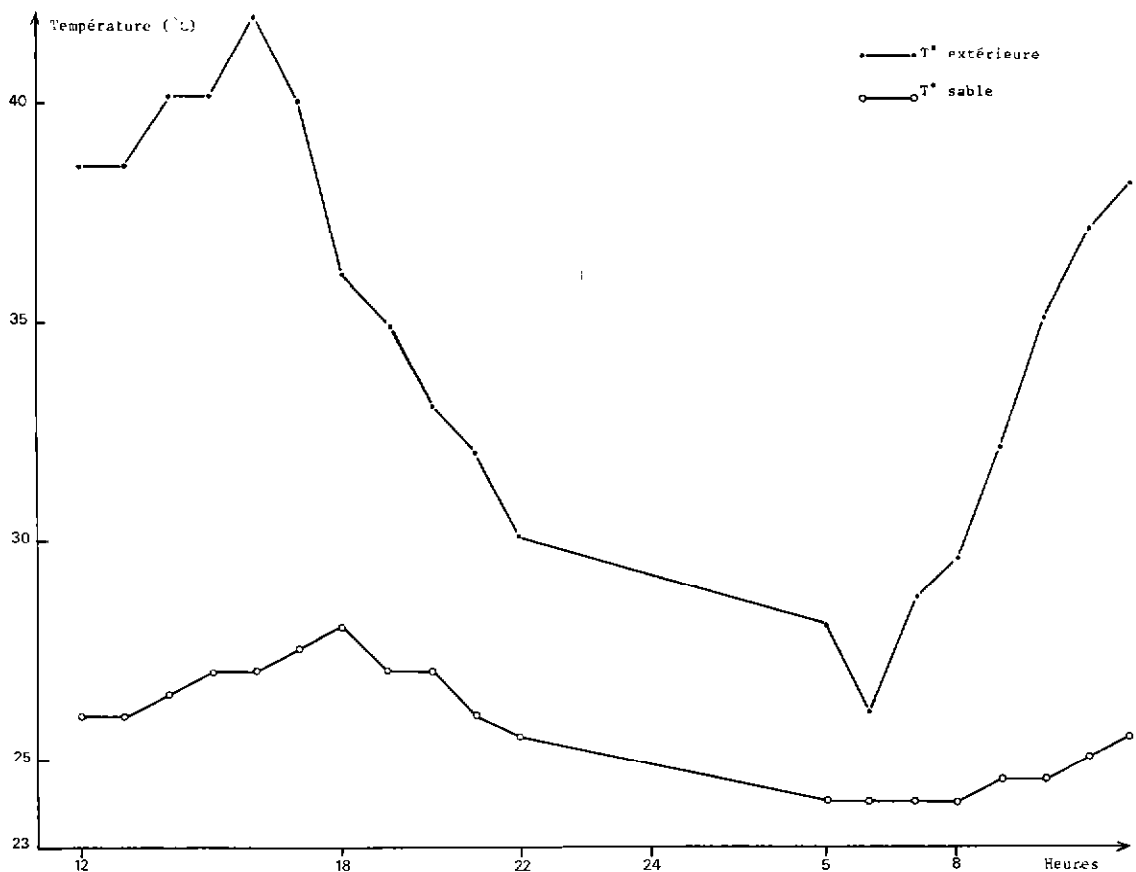


Fig. 3. — Relevés thermométriques.

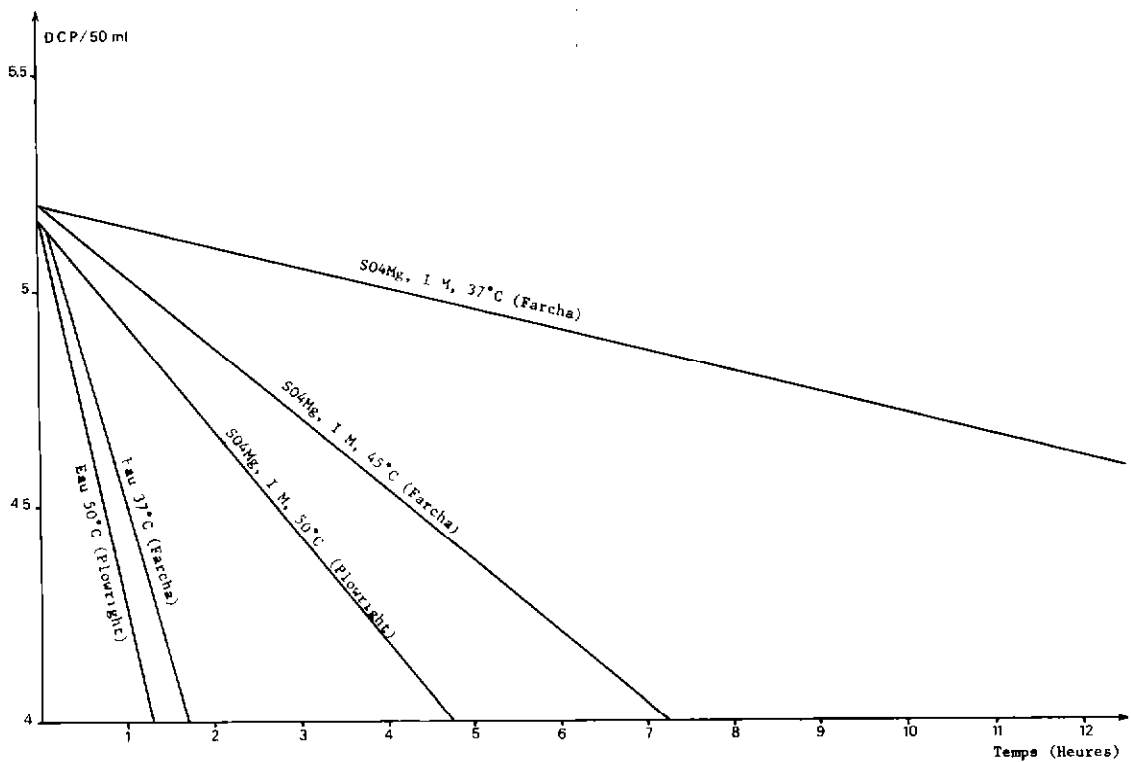


Fig. 4. — Inactivation du virus bovipestique en eau distillée et en SO<sub>4</sub>Mg, 1 M.

les données de PLOWRIGHT (19) obtenues avec le même diluant. Par rapport à l'eau distillée, communément utilisée comme diluant en brousse, le gain d'activité est considérable puisque les demi-vies passent respectivement de 24 minutes à 6 heures pour l'eau et la solution sulfato-magnésienne à la température de 37° C; elle est de 136 minutes à 45° C. Théoriquement, il n'y a donc pas à hésiter à recommander cette dernière, mais encore faut-il avoir la sanction du terrain.

### 3. Comportement du virus vaccinal sur le terrain (essai de Nokou, Tchad)

Cet essai « en grandeur nature » a été réalisé sur le terrain dans le Kanem (nord-est du Tchad), dans des conditions pratiques qui devraient être celles du vaccin à thermodégradation retardée.

Un lot de vaccin antibovipestique est produit sur cellules MDBK de 103<sup>e</sup> passage avec le variant 16b-1009 (20). Le titrage lui assigne une richesse de 100 DCP<sub>50</sub>, par dose vaccinale à la sortie du lyophilisateur; c'est un titre intrinsèquement faible, au demeurant normal avec les cellules MDBK que nous avons utilisées; il permettait de juger du comportement du vaccin et de la réaction des vaccinés dans les pires conditions d'utilisation. L'essai a eu lieu en février. Le vaccin est transporté sur le terrain en caissettes de sable humidifié et est utilisé les 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jours après sa sortie du congélateur. Dans le sein du sable, la température varie de 17 à 28° C au cours d'un nyctémère alors que la température extérieure varie de 15 à 33° C à l'ombre. Le 8<sup>e</sup> jour, de retour au laboratoire, il est de nouveau titré; on retrouve le même titre qu'au départ.

Les bovins, on l'a dit plus haut, ont été choisis dans des campements d'éleveurs semi-sédentaires sans grand contact avec le Service de l'Élevage du Tchad depuis plusieurs années pour des raisons diverses; on pouvait s'attendre à trouver de nombreux animaux sans anticorps antibovipestiques, ce qui effectivement a été le cas (85 pour 92 animaux dont on possède le sérum avant l'expérience).

Sur le terrain, les flacons de vaccin sont réhydratés soit avec 100 ml de la solution molaire de sulfate de magnésie, soit avec de l'eau distillée, toutes deux à température ambiante (30-32° C). Les flacons de vaccin

dilué sont entourés d'une feuille de papier d'aluminium pour arrêter les rayons solaires. La vaccination est effectuée à des temps variables (indiqués dans le tableau I) après la reconstitution. On a ainsi 6 groupes :

- *Groupe A* : vaccin dilué en solution sulfato-magnésienne à 30° C. Vaccination des temps 10 à 50 minutes.
- *Groupe B* : vaccin dilué en solution sulfato-magnésienne à 30° C. Vaccination des temps de 5 à 75 minutes.
- *Groupe C* : vaccin dilué en eau distillée à 30° C. Vaccination des temps 15 à 32 minutes.
- *Groupe D* : vaccin dilué en solution sulfato-magnésienne à 30° C (même vaccin que B). Vaccination des temps 145 à 155 minutes.
- *Groupe E* : vaccin dilué en solution sulfato-magnésienne à 32° C. Vaccination des temps 35 à 55 minutes.
- *Groupe F* : vaccin dilué en eau distillée à 32° C (même vaccin que C, la température a varié). Vaccination des temps 150 à 160 minutes.

On effectue une nouvelle prise de sang 40 jours après la vaccination pour apprécier les séro-conversions. Les résultats sont reportés dans le tableau I.

Essai	Temps après reconstitution	Nombre d'animaux sans anticorps antevaccinaux	Nombre de séro-conversions
A	10 à 50 minutes	18	18
B	5 à 75 minutes	34	34
E	35 à 55 minutes	13	13
D	145 à 155 minutes	5	5
C	15 à 32 minutes	9	9
F	150 à 160 minutes	5	0

*Essai de Nokou. Comparaison, en fonction du diluant et du temps après la reconstitution, de l'efficacité de la vaccination avec le variant 16 b-1009.*

La comparaison des groupes entre eux montre que le diluant n'a pas d'influence, tout au moins aux températures auxquelles on a opéré, pour la première demi-heure après la reconstitution. Mais, à partir de la 2<sup>e</sup> heure après la reconstitution, la supériorité du sulfate de magnésium molaire est incontestable. On retrouve ainsi sur le terrain les résultats obtenus au laboratoire.

Fort de ces résultats, on devait se demander ce qu'il adviendrait du comportement du composant péripneumonique du vaccin mixte si on devait utiliser en pratique la solution sulfato-magnésienne.

## II. UTILISATION DE LA SOLUTION MOLAIRE DE SULFATE DE MAGNESIUM POUR LA REHYDRATATION DES VACCINS ANTIPERIPNEUMONIQUES LYOPHILISES

Les essais rapportés plus haut sur l'utilisation de l'urée ou du nitrate d'ammonium pour obtenir des mélanges réfrigérants portaient d'une idée préconçue : on s'était dit qu'étant donné la forte pression osmotique de la solution molaire de sulfate de magnésium (28,2 atmosphères à 45° C), la faible membrane protoplasmique des mycoplasmes, limitant un cytoplasme où la pression osmotique interne n'est que de 12 atmosphères (10), subirait d'énormes contraintes. Il paraissait plus judicieux de recourir à des mélanges réfrigérants puisque le sulfate de magnésium paraissait condamné. On a tout de même réalisé une expérience « pour voir ».

C'est alors qu'on a eu la surprise de constater que la dilution en solution molaire de sulfate de magnésium du vaccin péripneumonique lyophilisé n'inactivait pas *Mycoplasma mycoides*; les titres étaient les mêmes que lorsque le vaccin était repris en eau distillée ou en sérum physiologique. En fait, le phénomène de la résistance des mycoplasmes aux osmolalités élevées a déjà été signalé indépendamment par SMITH et SASAKI (27) et DENNY (9) avec des solutions 5 M de saccharose. Une étude de RODWELL (26) a illustré, par des images de

microscopie électronique, les changements de morphologie de *M. mycoides* dans des solutions hypo- et hypertoniques. La sanction pratique était que la solution molaire de sulfate de magnésium, déjà indiquée pour la dilution du vaccin antibovipestique lyophilisé, pouvait servir à celle du vaccin antipéripneumonique lyophilisé, donc vraisemblablement aussi à celle du vaccin mixte. Il restait à voir ce qu'il advenait du séjour de *M. mycoides* dans la solution, en fonction du temps et de la température, et quel était le comportement du composant péripneumonique du vaccin mixte vis-à-vis de l'inactivation thermique lors de sa conservation en dehors de la glace.

### 1. Thermostabilisation de *M. mycoides* par les solutions hypertoniques (21)

#### Matériel et méthodes

Des flacons de vaccin antipéripneumonique lyophilisé sont reconstitués à la dose vaccinale, soit dans 100 ml d'eau distillée à 37, 45 ou 47° C, soit en solution molaire de sulfate de magnésium à ces trois températures. On effectue des titrages en milieu liquide aux temps 0, 30, 60, 90 et 120 minutes après la reconstitution.

La même opération est répétée avec les solutions molaires de chlorure de sodium (pression osmotique : 41,54 atmosphères), de chlorure de magnésium (p. o. : 79,46), de sulfate de sodium (p. o. non mesurable) aux températures de 45 et 47° C.

*Résultats* : Ils sont reportés graphiquement dans la figure 5 et exposés synthétiquement dans le tableau II.

Diluant	Température		
	37°C	45°C	47°C
Eau distillée	12	9	<3
Sérum physiologique	NF	12	3
SO <sub>4</sub> Mg, 1M	>120	78	18

*Demi-vies en minutes aux températures de 37, 45 et 47° C du vaccin antipéripneumonique lyophilisé reconstitué en eau distillée, sérum physiologique au SO<sub>4</sub>Mg, 1M*

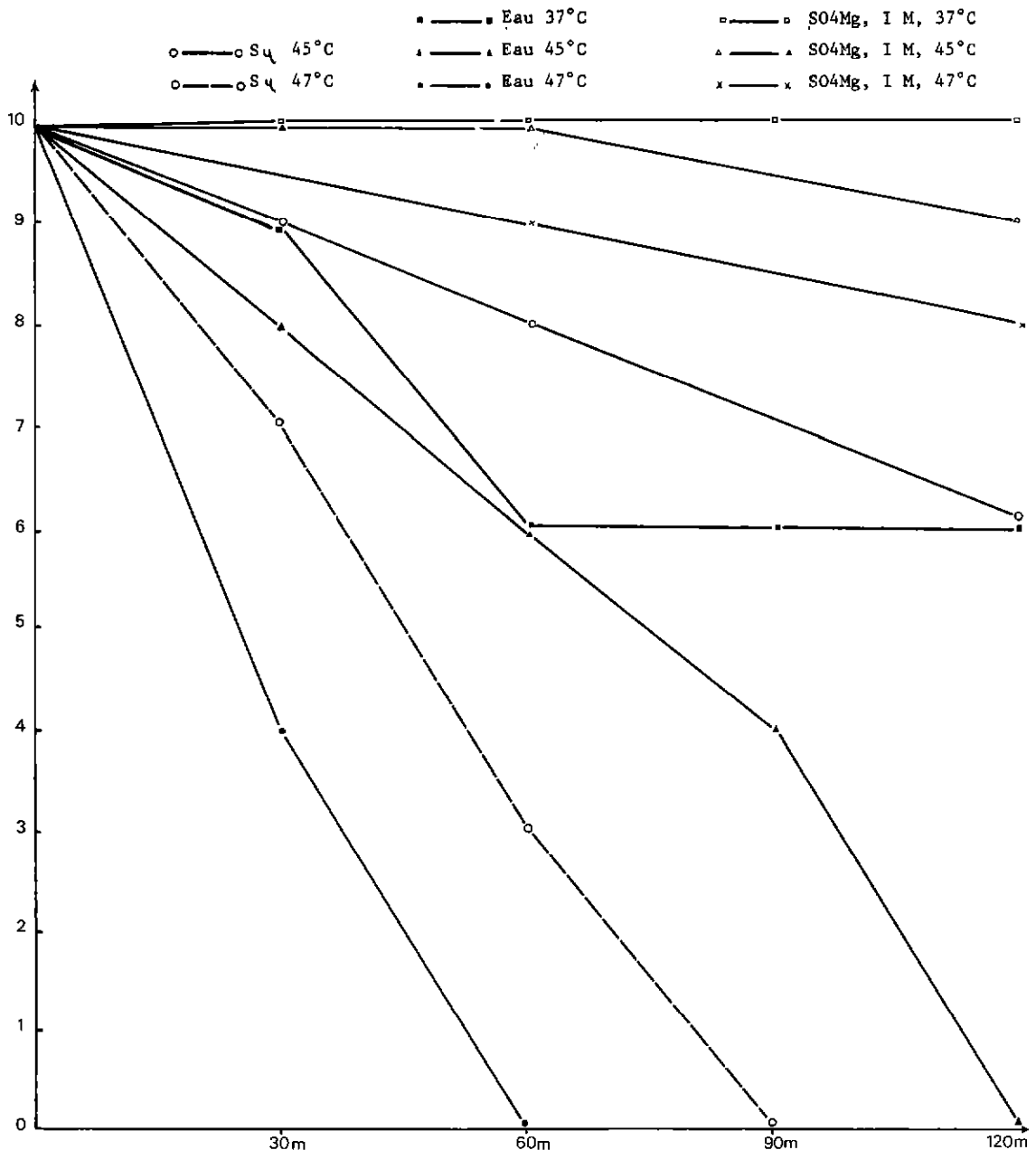


Fig. 5. — Inactivation thermique du vaccin antipéri-pneumonique à différentes températures après mise en suspension en différents milieux.

La supériorité de la reconstitution en solution sulfato-magnésienne molaire est évidente.

Le phénomène de thermoprotection de *M. mycoides* paraît bien être lié à l'osmolalité du milieu de suspension du microbe car, s'il est déjà perçu avec le simple sérum physiologique, on le retrouve aussi avec les solutions molaires de chlorure de sodium, de chlorure de magnésium et de sulfate de sodium. Les demi-vies n'y sont pas calculables car les deux dernières

solutions, aux températures de 45 et 47° C, donnent dès la reconstitution une importante baisse de titre de 2 à 4  $\log_{10}$ ; toutefois, les titrages effectués sur la population restante montrent qu'elle est elle aussi thermoprotégée, tout spécialement avec la solution molaire de chlorure de sodium.

En complément de ces observations, on a constaté que d'autres mycoplasmes lyophilisés (souches caprines YG et Farcha, *M. gallisepti-*



*cum, M. gallinarum*) étaient elles aussi thermo-protégées par le sulfate de magnésium molaire.

L'effet thermoprotecteur de ce sel se retrouve à la température de 50° C mais n'existe plus à 56° C. Sur le plan pratique, ces deux températures sont d'ailleurs sans intérêt.

### Discussion

Nos observations confirment, en les étendant, les observations princeps de SMITH et SASAKI (27) qui relevaient la survie prolongée à 37° de deux souches de mycoplasmes dans les solutions de saccharose 5M et celles de CLYDE et KIM (3) qui avaient vu le même phénomène avec 5 souches de mycoplasmes humains. Le fait nouveau est que les osmolalités élevées préservent la vitalité de *M. mycoides* et d'autres mycoplasmes à des températures où ils sont rapidement inactivés en eau distillée ou dans les solutions à basse osmolalité. Le résultat est d'importance pour un vaccin antipéri-pneumonique où c'est le nombre de mycoplasmes que reçoit l'animal qui conditionne le pouvoir immunogène (6).

Nos essais ne permettent pas de donner l'explication du phénomène de thermoprotection observée; il est en tout cas certainement parfaitement différent de la « stabilisation cationique » des virus (28) dont l'utilisation du sulfate de magnésium molaire pour le virus bovinepestique est une application. Toutefois, en la rapprochant des observations de RODWELL (26) qui constate une rétraction des corps mycoplasmiques dans les solutions hypertoniques, l'hypothèse de SMITH et SASAKI (27) qui admettent une diminution de l'activité métabolique par suite de la déshydratation des corps mycoplasmiques dans les solutions devient dès lors plausible. Dans cet ordre d'idée, on remarquera que le pH de la solution sulfato-magnésienne molaire est de 5,8 et que les mycoplasmes, pourtant sensibles au pH acide, paraissent s'en accommoder fort bien. En d'autres termes et pour parler par images, l'effet déshydratant des solutions hypertoniques s'apparente à celui de la lyophilisation par abolition des processus métaboliques internes.

Tous les auteurs qui ont étudié la stabilité thermique des mycoplasmes en général ont reconnu leur peu de résistance. Il est difficile de synthétiser les données car les conditions

expérimentales sont différentes, mais on peut porter crédit à l'opinion de ADLER (1) qui affirme que « beaucoup sont inactivés en 15 minutes à 45° C ». Les meilleures survies sont atteintes dans les milieux contenant du sérum ou du glycérol, donc à osmolalité élevée. C'est ainsi que le vaccin antipéri-pneumonique australien (*M. mycoides* souche V<sub>5</sub> en bouillon de viande-foie à 10 p. 100 de sérum) a une excellente tenue pendant 3 mois à 37° et même 2 heures à 45° (7).

On pourrait montrer quelque surprise à la lecture des résultats de PALMER et GOURLAY (11): un vaccin antipéri-pneumonique expérimental (\*), constitué de corps microbiens centrifugés de la souche V<sub>5</sub> de *M. mycoides* lyophilisés en Mist-dessicans puis reconstitué avec de l'eau distillée à son volume primitif d'avant la lyophilisation, montre une excellente vitalité pendant 6 heures à 37° ou 1 heure à 45° C. A l'analyse, ce n'est pas le fait de la reconstitution en eau distillée qui est important mais celui que les corps mycoplasmiques sont, après cette reconstitution, en milieu à osmolalité élevée. On remarquera que pour faire la balance entre sa richesse et son prix de revient, le vaccin reconstitué de PALMER et GOURLAY demandait à être dilué pour son inoculation à l'animal; or, c'est précisément à la faveur de cette dilution que se produit la perte en unités viables, à moins qu'on n'utilise les solutions hypertoniques.

Les conclusions auxquelles nous arrivons sur les avantages de tels milieux de reconstitution, s'ils nous ont été dictés par l'étude pratique du vaccin mixte antipestique-antipéri-pneumonique, sont valables pour les simples vaccins antipéri-pneumoniques lyophilisés; il y a avantage, et de loin, à utiliser la solution sulfato-magnésienne pour leur reconstitution plutôt que l'eau distillée, ceci pour le plus grand bénéfice des utilisateurs qui disposent dès lors d'une suspension vaccinale stable.

## 2. Stabilité thermique du composant péri-pneumonique du vaccin mixte

Il est évident que les résultats précédemment acquis ne seraient que d'une utilité réduite si le composant péri-pneumonique du vaccin mixte lyophilisé ne présentait pas une aussi bonne

(\*) Ce vaccin n'est jamais sorti du domaine expérimental, étant donné la complexité de sa préparation.

stabilité que le composant bovine. Avant toute chose, on notera que ce qui est en fin de compte important, est le nombre de mycoplasmes (et de virions) viables que recevra l'animal vacciné. En ce qui concerne la péri-pneumonie, GILBERT et WINDSOR (6) ont montré que la dose vaccinale était de  $10^7$  organismes viables pour la souche T<sub>1</sub>, la plus utilisée maintenant en Afrique.

A l'opposé de leur faible vitalité en milieu liquide, les mycoplasmes lyophilisés sont réputés avoir une excellente stabilité thermique; ils pourraient même résister plusieurs minutes à la température de l'ébullition (\*\*).

### Matériel et Méthodes

Des flacons de vaccin mixte de lots de fabrication courante sont mis dans des étuves à 37 ou 45° C; d'autres flacons sont laissés à température ordinaire, à l'obscurité. Tous les jours, on effectue un titrage après reconstitution du vaccin d'un flacon et dilution à la dose vaccinale avec la solution molaire de sulfate de magnésium, elle-même à la température à laquelle séjournait le vaccin.

### Résultats

A la température de 45° C, la demi-vie de *M. mycoides* dans le vaccin lyophilisé souche T<sub>1</sub> est de 2,1 jours; elle passe à 3,8 jours à 37° C.

En d'autres termes, cela signifie qu'un vaccin contenant après lyophilisation  $2,5 \cdot 10^8$  unités viables par dose vaccinale en aura  $10^7$  au bout de 17 jours à la température de conservation de 45° ou de 30 jours à celle de 37° C, le diluant étant lui-même à ces températures.

### Discussion

S'ils sont acceptables, les résultats qui viennent d'être exposés appellent des commentaires et des mises en garde. En effet, la résistance à l'inactivation thermique du composant péri-pneumonique n'est tout de même que relative; les chiffres qui viennent d'être donnés montrent une fois encore, si besoin en était, que seule l'expérience compte et que l'on ne doit pas extrapoler à partir des données d'autres auteurs.

Pour revenir à un point de vue pratique, on retiendra que le vaccin antipéri-pneumonique doit posséder  $10^7$  organismes viables par dose vaccinale. Autrement dit, ce chiffre sera celui des mycoplasmes vivants après les inactivations successives et cumulatives de la lyophilisation, du stockage à basse température, du transport, de la dilution à la dose vaccinale et de la conservation pendant un temps plus ou moins long de la solution vaccinale.

Ce dernier facteur a reçu une nette amélioration avec la solution molaire de sulfate de magnésium. Les autres paraissent pour le moment être incompressibles. Certes, des recherches sont en cours pour augmenter la tenue à l'inactivation thermique du vaccin antipéri-pneumonique, soit par addition de substances thermoprotectrices, soit par sélection de corps mycoplasmiques plus résistants. Dans l'immédiat, et dans l'optique des opérations de vaccination sans glace, il n'y a pas d'autres solutions que celle de la production d'un vaccin antipéri-pneumonique du plus haut titre possible et l'instauration de précautions lors de la lyophilisation, visant à la meilleure conservation possible de ces hauts titres. Par sécurité, les normes à retenir lors des contrôles effectués à la sortie du lyophilisateur devront être de  $5 \cdot 10^8$  organismes viables par dose vaccinale, chiffre minimal. C'est dire qu'il appartient au producteur de vaccin de polir tous les détails de sa technique de fabrication. Incidemment, il semble que si certains ont des déboires avec la lyophilisation des vaccins antipéri-pneumoniques (8, 13), cela tient plus à des points de technologie qu'à une impossibilité scientifique puisque ces vaccins sont produits ailleurs à des dizaines de millions de doses.

La tenue à l'inactivation thermique du composant antipéri-pneumonique dans le vaccin lyophilisé est bien meilleure que dans les vaccins liquides. Un examen des chiffres de la publication de DAVIES (4) montre qu'après sa sortie de l'étuve, le vaccin liquide s'inactive très rapidement (1 à 4 jours) à la température de 37°; il est impérieux de le conserver sous froid jusqu'au point de vaccination. Si le vaccin australien V<sub>5</sub> paraît bien plus résistant à cette température (7), il est néanmoins inactivé en 2 heures à 45° C. Avec ce type de vaccin, il paraît difficile, en Afrique tropicale, de pouvoir se passer du transport sous froid.

(\*\*) J. R. HUDSON, Communication à la 3<sup>e</sup> réunion du groupe d'experts FAO/OIE/OUA sur la péri-pneumonie, Khartoum 1967.

### III. LE VACCIN MIXTE ANTIBOVIPESTIQUE- ANTIPERIPNEUMONIQUE DANS LA PRATIQUE

Ainsi qu'on l'a déjà souligné (22), les recherches qui viennent d'être exposées avaient été motivées dès 1966 par la diminution des moyens financiers et techniques dont pouvaient disposer certains services de l'Élevage. Les gros moyens mis en place par le P.C. 15 contre la peste bovine disparaissent et aucune relève financière ne se faisait jour. Si l'on voulait continuer l'effort de vaccination contre la peste, déjà bien contenue, il fallait trouver un palliatif; ce fut la sélection des virions vaccinaux bovipestiques à inactivation thermique retardée.

Depuis novembre 1965, le laboratoire de Farcha produit un vaccin mixte antibovipestique-antipéripleurmonique lyophilisé (24). Primitivement composé de la souche originale RPOK atténuée de PLOWRIGHT et FERIS (15, 17) et de la souche KH<sub>3</sub>J-SR (streptomycino-résistante) de *M. mycoides*, on a substitué courant 1970 le mutant 16b-1009 à la souche bovipestique originelle. En effet, au Tchad tout au moins, il n'y avait plus aucune machine à glace dans les postes de brousse; les tournées de vaccination s'arrêtaient alors que la peste bovine existait toujours. Grâce à ce vaccin lyophilisé qui était conservé en linges ou en caissettes avec des copeaux de bois humidifiés, les équipes de vaccination purent aller plus loin ou installer des postes fixes de vaccination au long des pistes à bétail. Le vaccin y était conservé pendant 8 à 10 jours, à l'ombre, et reconstitué à la demande en solution molaire de sulfate de magnésium (paquets de 250 g de SO<sub>4</sub>Mg prépesés par le chef de circonscription d'élevage, à diluer extemporanément dans 1 litre d'eau, volume total). On a eu alors l'occasion d'apprécier le progrès que constituaient les modifications apportées dans la stratégie vaccinale.

A la fin de 1970, la souche KH<sub>3</sub>J du vaccin mixte a été remplacée par la souche T<sub>1</sub>-SR (streptomycino-résistante). C'est ce dernier vaccin qui a fait l'objet des contrôles exposés plus haut.

Les essais et contrôles qui ont été rapportés dans cette note ont, à dessein, été réalisés dans

de dures conditions thermiques sur des périodes de temps prolongées. Il faut bien se rendre compte que la température de 45° C à l'ombre est celle que l'on rencontre au Tchad pendant les heures chaudes de la saison sèche; c'est pour cette raison que l'étude du clonage du variant 16b-1009 a été faite à cette température. C'est également à cause de cette température extérieure qu'est préconisée la solution sulfato-magnésienne molaire. Les droites d'inactivation des figures 2 et 4 peuvent donner une fausse impression de sécurité avec l'eau distillée employée comme diluant. Or, lorsque le titre du vaccin lyophilisé s'abaisse au cours de la conservation à des températures relativement élevées, pour parfois devenir marginal, c'est à ce moment qu'un diluant thermoprotecteur trouve son intérêt, pour le virus pestique comme pour *M. mycoides*.

En pratique, les solutions adoptées sont les suivantes.

— Au niveau du laboratoire producteur :

- Production de lots de vaccin mixte avec le variant 16b-1009 et la souche T<sub>1</sub>-SR, titrant à la sortie du lyophilisateur au minimum 10<sup>3,5</sup>DCP<sub>50</sub> pour le virus bovipestique et 5.10<sup>8</sup> unités viables pour *M. mycoides* par dose vaccinale; ce sont de dures contraintes et certains lots ne passent pas le contrôle.

- Conservation du stock de vaccin à — 22° C, en chambre froide.

— Au niveau de l'utilisateur :

- Expédition à partir du laboratoire du vaccin en caisses isothermes sous glace fondante; l'opération de transfert échappe en effet à des techniciens et le vaccin pourrait indûment être exposé à l'ensoleillement direct.

- Conservation au lieu de destination (chefferie de service, chefferie de secteur d'élevage voire simple poste vétérinaire) en congélateur à pétrole, donnant selon la saison des températures de — 7 à — 12° C.

- Conservation en caissettes de copeaux de bois humidifiés ou de linges humidifiés pour les tournées de vaccination qui ne doivent pas excéder 10 jours; on insiste pour que les caissettes ne soient pas exposées au soleil.

- Reconstitution du vaccin et dilution en solution molaire de sulfate de magnésium à

l'aide de paquets prépesés par le chef de sec-teur. La suspension vaccinale doit, par prudence, être utilisée dans l'heure, les flacons de vaccin reconstitué et les seringues entourées de linges humidifiés, destinés autant à arrêter le rayonnement solaire qu'à apporter un peu de fraîcheur.

L'immunité conférée par le vaccin mixte est identique à celle de ses composants, ainsi que l'a indépendamment montré le laboratoire de Dakar (4), c'est-à-dire plusieurs années pour la peste bovine, au moins un an pour la péripneumonie.

La conséquence de l'aisance nouvelle apportée dans la vaccination antipestique a été la *disparition de la peste bovine au Tchad et au*

*Cameroun*; le dernier cas de peste en Afrique centrale francophone a été observé et contrôlé en octobre 1971 près de N'Djamena. Depuis lors, plus aucun cas n'est signalé; à chaque fois qu'une suspicion a eu lieu, il s'est toujours avéré qu'il s'agissait de maladies des muqueuses ou de la forme muqueuse de la maladie nodulaire cutanée bovine.

Certains pourront objecter que l'utilisation du sulfate de magnésium introduit une complication dispendieuse. Il n'y a en fait aucune commune mesure entre le prix de revient de la conservation sous froid pour les tournées de vaccination et le prix du sulfate de magnésium. Il revient actuellement au Tchad à 52 Francs CFA le kg, ce qui majore par animal le coût de la vaccination de 0,05 F CFA.

## SUMMARY

### **A combined lyophilised rinderpest-CBPP vaccine to be used in the field without refrigeration.**

#### **II. Use of the vaccine in the field.**

These experiments have been devised by the authors in order to use without refrigeration in the field a combined rinderpest-CBPP vaccine; the interest of the molar magnesium sulphate is evidenced. In this solution, the vitality of rinderpest virus is well preserved (half-life 6 hours at 37° C instead of 24 minutes in water; 135 minutes at 45° C) and also that of mycoplasmas at temperatures otherwise harmful (half-life 78 minutes for *M. mycoides* in molar SO<sub>4</sub>Mg at 45° C instead of 9 minutes in water).

The incorporation of the variant 16 b-1009 of rinderpest virus in the combined vaccine and the use of the molar SO<sub>4</sub>Mg solution for dilution have allowed the practical use in central Africa of making vaccination without refrigeration in the field.

## RESUMEN

### **Una vacuna mixta contra la peste bovina y la perineumonía liofilizada utilizable, sobre terreno, sin refrigeración.**

#### **II. Utilización de la vacuna sobre terreno**

Con el objeto de utilizar sin refrigeración sobre terreno la vacuna mixta contra la peste bovina y la perineumonía, los autores realizan una serie de experiencias que muestran el interés de la solución molar del sulfato de magnesio. Dicha solución preserva la vitalidad del virus bovipestico (media vida de 6 horas a 37° C en lugar de 24 minutos para el agua, de 136 minutos a 45° C) y, hecho recién adquirido, la de micoplasmas a temperaturas disgenesicas para ellos (media vida de 78 minutos para *M. mycoides* en SO<sub>4</sub>Mg, 1M a 45° C en lugar de 9 minutos en agua destilada).

La incorporación del variante 16 b-1009 del virus vacuna bovipestico en la vacuna mixta y la utilización de la solución molar del sulfato de magnesio para su rehidratación permitieron la vulgarización en Africa central de la vacunación sin conservación con hielo sobre terreno.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ADLER (H. E.). Mycoplasmosis in animals. *Adv. vet. Sci.*, 1965, **10** : 205-244.
2. BOURDIN (P.). In : Rapport annuel du Laboratoire de Dakar, 1966, pp. 56-59.
3. CLYDE (W. A.) et KWANG SOO KIM. Biophysical characterization of human mycoplasma species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1967, **143** : 425-434.
4. DAVIES (G.). Growth characteristics of the T<sub>1</sub> strain of *Mycoplasma mycoides*. *Trop. anim. Hlth. Prod.*, 1969, **1** : 7-12.
5. DOUTRE (M. P.), CHAMBRON (J.) et BOURDIN (P.). Valeur de l'immunité conférée par un vaccin mixte antibovipestique-antipéripleurpneumonique lyophilisé préparé à l'aide de la souche T<sub>1</sub>-SR. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1972, **25** : 1-14.
6. GILBERT (F. R.) et WINDSOR (R. S.). The immunizing dose of T<sub>1</sub> strain of *Mycoplasma mycoides* against contagious bovine pleuropneumonia. *Trop. anim. Hlth. Prod.*, 1971, **3** : 71-76.
7. HUDSON (J. R.). The keeping properties of the V<sub>6</sub> vaccine used in Australia. *Aust. vet. J.*, 1968, **44** : 123-129.
8. KARST (O.). Contagious bovine pleuropneumonia : lyophilised (T<sub>1</sub>) vaccine. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1973, **21**, n° spécial sur la péripleurpneumonie : 69-76.
9. KIM (K. S.), CLYDE (W. A.) et DENNY (F. W.). Physical properties of human *Mycoplasma* species. *J. Bact.*, 1966, **92** : 214-219.
10. LEACH (R. H.). The osmotic requirements for growth of *Mycoplasma*. *J. gen. Micr.*, 1962, **27** : 345-354.
11. Normes relatives au vaccin anti- peste bovine (vivant) préparé en cultures cellulaires et au vaccin anti- peste bovine (vivant) préparé sur l'animal. Genève, O.M.S., 1970. (Rapport technique O.M.S. n° 444.)
12. PALMER (R. F.) et GOURLAY (R. N.). Lyophilisation of *Mycoplasma mycoides* culture vaccine. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1964, **12** : 397-400.
13. PEARSON (C. W.) et LLOYD (L. C.). Freezedrying of the KH<sub>3</sub>J vaccine strain of *Mycoplasma mycoides*. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, 1971, **19** : 117-122.
14. PLOWRIGHT (W.). The application of monolayer tissue culture technique in rinderpest research. I. Introduction : use in serological investigations and diagnosis. *Bull. O.I.E.*, 1962, **57** : 1-23.
15. PLOWRIGHT (W.). The production and use of culture-attenuated rinderpest vaccine. Rapport 17<sup>e</sup> Cong. Mond. Vét., 1963, **1** : 679-682.
16. PLOWRIGHT (W.). Rinderpest virus. *Monographs in Virology*, 1968, **3** : 25-110.
17. PLOWRIGHT (W.). The production and use of rinderpest cell culture vaccine in developing countries. *Wrlld Anim. Rev.*, 1972 (1) : 14-18.
18. PLOWRIGHT (W.) et FERRIS (R. D.). Studies with rinderpest virus in tissue culture. III. The stability of cultured virus and its use in virus neutralization tests. *Arch. ges. Virusf.*, 1961, **11** : 516-533.
19. PLOWRIGHT (W.), HERNIMAN (K. A. J.) et RAMPTON (C. S.). Studies on rinderpest culture vaccine. IV. The stability of the reconstituted product. *Res. vet. Sci.*, 1971, **12** : 40-46.
20. PROVOST (A.). In : Rapport annuel du Laboratoire de Farcha pour 1969, pp. 73-76.
21. PROVOST (A.). Activité thermoprotectrice de la solution molaire de sulfate de magnésium sur l'inactivation thermique de *Mycoplasma mycoides* en phase liquide. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 1970, **270 D**, 3156-3157.
22. PROVOST (A.) et BORREDON (C.). Un vaccin mixte antibovipestique-antipéripleurpneumonique lyophilisé transportable sans réfrigération. 1. Sélection de virions bovipestiques à inactivation thermique retardée. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1972, **25** : 507-520.
23. PROVOST (A.), BORREDON (C.), MAURICE (Y.) et QUEVAL (R.). In : Rapport annuel du Laboratoire de Farcha pour 1965, p. 62.
24. PROVOST (A.), BORREDON (C.) et QUEVAL (R.). Recherches immunologiques sur la péripleurpneumonie. XI. Un vaccin mixte vivant antibovipestique-antipéripleurpneumonique inoculé en un seul temps. *Bull. Off. int. Epiz.*, 1969, **72** (1a) : 165-203.
25. ROBIN (P.) et BOURDIN (P.). Note sur l'action du sulfate de sodium, du sulfate de magnésium et du chlorure de magnésium sur le virus de la peste bovine adapté aux cultures cellulaires. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** : 451-456.
26. RODWELL (A. W.). The stability of *Mycoplasma mycoides*. *J. gen. Micr.*, 1965, **40** : 227-234.
27. SMITH (P. F.) et SASAKI (S.). Stability of Pleuropneumonia-like Organisms to some physical factors. *Appl. Micr.*, 1958, **6** : 184-189.
28. WALLIS (C.), MELNICK (J. L.) et RAPP (F.). Different effects of MgCl<sub>2</sub> and MgSO<sub>4</sub> on the thermostability of viruses. *Virology*, 1965, **26** : 694-699.