

Production et essais de vaccins inactivés en excipient huileux contre la maladie de Newcastle en Éthiopie

F. Thiaucourt¹

THIAUCOURT (F.). Production et essais de vaccins inactivés en excipient huileux contre la maladie de Newcastle en Éthiopie. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (3) : 229-233.

Deux expériences ont été effectuées au National Veterinary Institute à Debre Zeit, Éthiopie, pour tester la faisabilité de vaccins en excipient huileux contre la maladie de Newcastle. L'antigène choisi était la souche « LaSota ». Dans une première expérience, la réponse en anticorps a paru proportionnelle à la quantité d'antigène incorporée dans le vaccin. Dans une seconde expérience, un vaccin préparé avec le liquide allantoidien pur, comme phase aqueuse, s'est révélé suffisamment efficace pour obtenir des titres d'anticorps allant de 1/250, au début, à 1/80, à la fin de l'année suivant la vaccination d'un élevage commercial de pondeuses. Par comparaison, les poulets IOPS (*indemnes d'organismes pathogènes spécifiques*) avaient des titres atteignant 1/512 en dépit d'un temps de stockage du vaccin de 6 mois à 4 °C. *Mots clés* : Poulet - Maladie de Newcastle - Vaccin inactivé - Éthiopie.

d'autres valences inactivées, ce qui diminue les coûts et la vaccination peut se faire pour les pondeuses à l'occasion du transfert en cage. Enfin, ce qui peut être un avantage décisif pour les pays tropicaux, ces vaccins sont beaucoup plus résistants à la chaleur que les vaccins vivants (1).

Plusieurs expériences successives ont eu lieu au National Veterinary Institute (N.V.I.) pour étudier la faisabilité de tels vaccins en Éthiopie, d'abord pour déterminer la quantité d'antigène à incorporer ensuite pour tester l'immunité effective obtenue dans des conditions de terrain.

INTRODUCTION

La maladie de Newcastle est une menace constante pour les élevages avicoles des pays en voie de développement. En Éthiopie, le principal élevage industriel de Debre Zeit a été décimé en 1984 par celle-ci et d'autres foyers ont encore été diagnostiqués en 1985 et 1987.

Seules de strictes mesures de prophylaxie sanitaire et médicale peuvent permettre de protéger les élevages situés en zone d'enzootie. Malheureusement, les vaccins vivants distribués dans l'eau de boisson ne semblent pas conférer une protection absolue. Le recours à une vaccination par des vaccins tués en excipient huileux est maintenant largement répandu en Europe au moins en ce qui concerne les poules pondeuses et les reproductrices. De tels vaccins sembleraient très utiles en Éthiopie où le risque d'apparition de la maladie de Newcastle est encore plus grand qu'en Europe.

Les inconvénients de tels vaccins, par rapport aux vaccins vivants, sont principalement leur coût plus élevé et l'obligation de manipuler tous les animaux. Leurs avantages compensent largement ces inconvénients : leur efficacité est très supérieure à la fois en intensité et en durée ; il est possible d'incorporer

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Antigène

La souche « LaSota » utilisée au NVI pour la production de vaccins vivants a été inoculée à des oeufs embryonnés de 9 jours à la dose de 10^5 DIO (Dose Infectieuse Oeuf). Ces oeufs provenaient de l'élevage du NVI dont les poules sont dépourvues d'anticorps contre la maladie de Newcastle. Après trois jours d'incubation à 37 °C, le liquide allantoidien est prélevé, une partie aliquote conservée pour le titrage, et le reste inactivé par la β propiolactone à 1/1000 pendant 3 heures à 30 °C.

Émulsion

Quatre émulsions sont préparées avec le liquide allantoidien pur, dilué à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , la cinquième émulsion est préparée avec du PBS (*Phosphate Buffer Saline*).

La matériel utilisé est le suivant :

- Ultraturax T 45
- Huile : Marcol 52*
- Adjuvant huileux : Montanide 888*
- Adjuvant aqueux : Montanox (tween 80)*

1. Mission vétérinaire française en Éthiopie, National Veterinary Institute, BP 19, Debre Zeit, Éthiopie.

Reçu le 15.03.88, accepté le 22.03.88.

(*) Échantillons fournis par la société SEPPIC, 70 Champs-Élysées, 75008 Paris (France).

F. Thiaucourt

Chaque constituant est stérilisé séparément sous le volume désiré : Marcol = 70 ml, Montanide = 7 ml, Montanox = 0,7 ml (dilué avec 2 ml de PBS pour diminuer la viscosité).

- Le tween est ajouté à la phase aqueuse dont le volume est de 20 ml
- Le Montanide est incorporé au Marcol puis homogénéisé pendant deux minutes
- la phase aqueuse est ajoutée goutte à goutte toujours sous agitation
- Mise en émulsion pendant dix minutes

Toute l'opération s'effectue en bain-marie glacé pour éviter trop d'échauffement.

Pour l'expérience 2, le même mode opératoire est observé à la seule différence qu'un seul type d'émulsion est préparé (avec du liquide allantoïdien non dilué) pour un volume final de 500 ml.

Animaux d'expérience

Expérience 1 : 125 poulettes âgées de 22 semaines, de souche Yarkon, élevées dans une ferme de Debre Zeit appartenant à la Poultry Development Enterprise, sont placées dans un local isolé et séparées en 5 lots de 25 poules.

Expérience 2 : 16 poulets provenant de l'élevage IOPS (*indemne d'organisme pathogène spécifique*) du NVI et gardés en isolement dans le local de quarantaine et 300 poules de la ferme de Dembi (Poultry Development Enterprise).

Protocole

Expérience 1 : chaque lot de poulettes est vacciné à J-0 avec un vaccin différent. Chaque animal reçoit 0,5 ml de vaccin dans les muscles de la poitrine. A J+30 tous les animaux reçoivent une injection de rappel avec le vaccin dilué à 10^{-1} .

Expérience 2 : toutes les poulettes reçoivent 0,5 ml d'un vaccin fraîchement préparé alors que les poulets du NVI reçoivent un vaccin préparé 6 mois auparavant et conservé à 4 °C.

Sérologie

Effectué en microméthode avec des plaques à fond en U, l'emploi d'un même sérum de référence permet d'éviter la disparité des résultats obtenus à des dates différentes.

RÉSULTATS

Expérience 1

Antigène

Le titre du liquide allantoïdien est égal à $5 \cdot 10^{10}$ DIO/ml ; cela correspond à $5 \cdot 10^9$ DIO par dose pour le vaccin le plus concentré et dix fois moins pour chaque dilution ultérieure.

L'inactivation du liquide allantoïdien est vérifiée par inoculation à des oeufs embryonnés.

Émulsion

La stabilité de chaque émulsion est testée par centrifugation à 1 500 g pendant 30 minutes et une partie aliquote est conservée à température du laboratoire (de 20 à 30 °C) pendant toute la durée de l'expérience. Il n'y a pas de séparation de phase après la centrifugation ; on peut noter simplement l'apparition d'une mince phase huileuse en surface des flacons conservés en témoins qui ne dépasse pas 2 p. 100 de la hauteur totale et qui ne semble pas augmenter avec le temps.

Sérologie

Les titres en anticorps inhibant l'hémagglutination sont résumés dans les courbes de la figure 1.

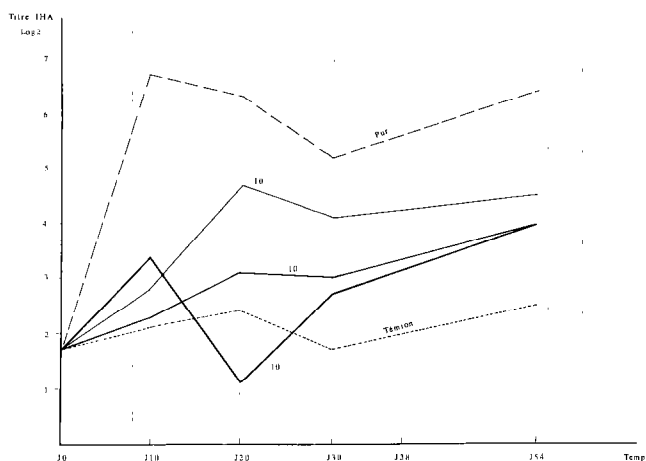


Fig. 1 : Courbes sérologiques obtenues avec différentes concentrations de liquide allantoïdien. Expérience 1.

Expérience 2

Antigène

Le titre est égal à $5 \cdot 10^{9.5}$ DIO/ml, soit dix fois moins par dose vaccinale.

Émulsion

Le vaccin conservé 6 mois à 4 °C ne présentait qu'une légère séparation de phase.

Sérologie

Les résultats sont rapportés en figure 2.

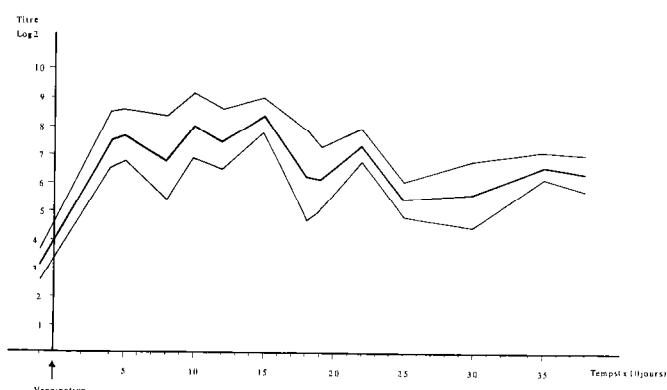


Fig. 2 : Cinétique sérologique. Expérience 2.

— Titre moyen en anticorps IHA

— Intervalle de confiance à 5 p. 100 autour de la moyenne $m \pm t \cdot s / \sqrt{n}$ où m = moyenne, s = écart-type, n = taille de l'échantillon, t = donné pour le risque 5 p. 100 et fonction de n .

DISCUSSION

Émulsion

La procédure utilisée, rapport huile/eau = 1/4, tween ajouté à la phase aqueuse, donne entièrement satisfaction. D'autres rapports huile/eau peuvent aussi être employés ; le tween n'est peut-être pas indispensable mais il semble augmenter la stabilité de l'émulsion (10) ainsi que son efficacité, enfin la viscosité est moindre quand il est ajouté à la phase aqueuse et non pas à la phase huileuse (3, 10, 11).

Choix de l'antigène

Certains auteurs utilisent une souche hautement

pathogène (4) mais d'autres des souches lentogènes de type « LaSota » (1, 6, 10, 11, 12). Les souches lentogènes offrent l'avantage d'une meilleure adaptation à l'oeuf embryonné donc d'une récolte d'antigène plus importante par oeuf inoculé. Les risques de contamination accidentelle sont aussi fortement réduits sans compromettre l'efficacité du vaccin car il existe une grande similitude entre les différentes souches de virus Newcastle.

Quantité d'antigène

L'expérience 1 montre que seules des doses d'antigène supérieures à 10^9 DIO sont efficaces ; des doses inférieures induisent une réponse immunitaire plus faible et plus tardive mais qui reste globalement proportionnelle à la quantité d'antigène. Ceci confirme des résultats antérieurs (10) à la seule différence que des doses égales à 10^8 DIO semblaient alors suffisantes pour initier une bonne réponse immunitaire.

Sérologie

Les titres en anticorps inhibant l'hémagglutination (IHA) après un rappel avec un vaccin inactivé varient habituellement entre 1/40 et 1/1280 selon les auteurs, la majorité se situant à 1/200. La persistance du titre IHA est assez longue mais peut aussi fluctuer d'un mois sur l'autre, par exemple entre 1/50 et 1/200 (12). Il serait sans doute plus exact de considérer, non seulement le titre maximal obtenu, mais aussi l'augmentation du titre après rappel. Ainsi dans l'expérience 1 le titre maximal obtenu est de 1/128 ce qui n'est pas très bon mais l'augmentation du titre, elle, correspond à 5 dilutions.

La seconde expérience confirme les résultats de la première avec un titre passant de 1/10 à 1/200 ; ce titre semble à peu près stable pendant 4 mois mais la tendance générale est à une décroissance faible et progressive. Après un an, soit à la fin de la vie commerciale des poules, le titre est encore de 1/80 ce qui est satisfaisant.

La réponse immunitaire d'animaux commerciaux peut être influencée par leur état sanitaire (infection par des mycoplasmes, maladie de Marek...). C'est pourquoi une vaccination parallèle d'animaux dont le statut sanitaire était parfait (poulets IOPS) a été entreprise. Le titre IHA obtenu a été de 1/512, ce qui est excellent, néanmoins cela ne représente qu'une augmentation du titre de 3 dilutions. Ceci peut éventuellement s'expliquer par une légère diminution d'activité due à la période de stockage. D'autres auteurs ont montré une diminution de l'activité des vaccins huileux après stockage, en particulier lorsqu'on leur ajoute un conservateur du type « thiomersal » (9).

CONCLUSION

Au terme de ces deux expériences, il a pu être montré que :

- la réalisation de vaccins inactivés en émulsion huileuse est possible au NVI,
- ces vaccins sont d'une parfaite innocuité,
- ces vaccins induisent une réponse immunitaire nettement supérieure aux vaccins vivants habituellement employés en Éthiopie ; en ce qui concerne la maladie de Newcastle, il existe une relation directe entre le titre IHA et la protection effective, on peut donc penser que ces vaccins sont aussi plus efficaces,
- leur administration ne pose pas de problème

THIAUCOURT (F.). Production and trials of inactivated oil-emulsion Newcastle disease vaccines in Ethiopia. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (3) : 229-233.

Two experiments were undergone at the National Veterinary Institute, Debre Zeit, Ethiopia, to test the feasibility of oil-emulsion Newcastle vaccines. The antigen chosen was the « LaSota » strain. In a first experiment, the antibody response seemed proportional to the quantity of antigen incorporated into the vaccine. In a second experiment, a vaccine prepared with pure allantoic fluid, as aqueous phase, proved efficient enough to elicit antibody titers ranging from 1/250 to 1/80 from the beginning up to the end of the year following the vaccination of a commercial flock of layers. For comparison purpose, chickens from specific pathogen free origin had titers reaching 1/512 despite a vaccine storage time of 6 months at 4 °C. *Key words* : Poultry - Newcastle disease - Vaccine - Ethiopia.

particulier dans des conditions de « terrain ».

L'étude de leur production en quantité semi-industrielle est déjà entreprise ainsi que l'adjonction d'autres valences ; parmi toutes celles envisageables (2, 5, 7, 8, 13), la pullorose est sans doute la plus intéressante ainsi que les mycoplasmoses.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la Poultry Development Enterprise qui m'a permis d'effectuer ces expériences dans les fermes de Debre Zeit, le Dr. MOHAMED qui a assuré le suivi sur le terrain, ainsi que les Dr FIKRE et MABRATU sans qui ce travail n'aurait pas été possible à l'Institut National Vétérinaire (NVI).

THIAUCOURT (F.). Producción y ensayos de vacunas inactivadas en excipiente aceitoso contra la enfermedad de Newcastle en Etiopia. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (3) : 229-233.

Se efectuaron dos experimentos en el Instituto Nacional Veterinario de Debre Zeit, Etiopia para comprobar la posibilidad de producción de vacunas en excipiente aceitoso contra la enfermedad de Newcastle. Era la cepa LaSota el antígeno escogido. Durante un primer experimento, la respuesta de anticuerpos pareció proporcional a la cantidad de antígeno incorporada en la vacuna. Durante un segundo experimento, una vacuna preparada con el líquido puro de la alantoides, como fase acuosa, se mostró suficientemente eficaz para obtener títulos de anticuerpos de 1/250, al principio, a 1/80, al fin del año después de la vacunación de una cría comercial de ponedoras. En comparación, los pollos SPF (*Specific Pathogen Free*) tenían títulos llegando a 1/512 a pesar de un periodo de almacenamiento de la vacuna de 6 meses a 4 °C. *Palabras claves* : Pollo - Enfermedad de Newcastle - Vacuna inactivada - Producción de vacuna - Etiopia.

BIBLIOGRAPHIE

1. BEARD (C. W.), MITCHELL (B. W.). Influence of environmental temperatures on the serologic responses of broiler chickens to inactivated and viable Newcastle disease vaccines. *Avian Dis.*, 1987, 31 (2) : 321-326.
2. BENNEJEAN (G.). Utilisation des vaccins aviaires à virus inactivés en excipient huileux : bilans et perspectives. *Dev. Biol. Stand.*, 1981, 51 : 11-17.
3. BOKHOUT (B. A.), VAN GAALLEN (C.), VAN DER HEIDEN (P. J.). A selected water in oil emulsion : composition and usefulness as an immunological adjuvant. *Vet. Immun. Immunopath.*, 1981, 2 : 491-500.
4. CESSI (P.), NARDELLI (L.). Vaccination against Newcastle disease : efficacy of an oil emulsion vaccine. *Avian Path.*, 1974, 3 (4) : 247-253.
5. DEVRIESE (L.), DEVOS (A.). Immunity to salmonellosis in pigeons : resistance to an experimental infection six months after a single vaccination with an inactivated *Salmonella typhimurium* oil-adjuvant vaccine. *Vlaams Dierg. Tijd.*, 1982, 51 (4) : 281-289.
6. EIDSON (C. S.). Vaccination of breeder chickens and their progeny with a live or with an inactivated oil emulsion Newcastle disease vaccine. *Dev. Biol. Stand.*, 1981, 51 : 191-205.

7. GLISSON (J. R.), DAWE (J. F.), KLEVEN (S. H.). The effect of oil emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *synoviae*. *Avian Dis.*, 1984, **28** (2) : 397-405.
8. MOREAU (Y.), BOUQUET (J. F.), CHEVRIER (A.), DEVAUX (B.), WITTMAN. Un vaccin viral trivalent inactivé en adjuvant huileux, résultats préliminaires. *Dev. Biol. Stand.*, 1981, **51** : 309-315.
9. STONE (H. D.). Effect of thimerosal concentration on the efficacy of inactivated Newcastle disease oil-emulsion vaccines. *Avian Dis.*, 1985, **29** (4) : 1030-1035.
10. STONE (H. D.), BRUGH (M.), BEARD (C. W.). Influence of formulation on the efficacy of experimental oil-emulsion Newcastle disease vaccines. *Avian Dis.*, 1983, **17** (3) : 688-697.
11. STONE (H. D.), BRUGH (M.), HOPKINS (S. R.), YODER (H. W.), BEARD (C. W.). Preparation of inactivated oil emulsion vaccines with avian viral or mycoplasma antigens. *Avian Dis.*, 1978, **22** (4) : 666-673.
12. THAYER (S. G.), EIDSON (C. S.), KLEVEN (S. H.). Multivalent inactivated virus oil-emulsion vaccines in broiler breeder chickens. *Poultry Sci.*, 1983, **62** : 1978-1983.
13. YODER (H. W.), HOPKINS (S. R.), MITCHELL (B. W.). Evaluation of inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil-emulsion bacterins for protection against airsacculitis in broilers. *Avian Dis.*, 1984, **28** (1) : 224-234.