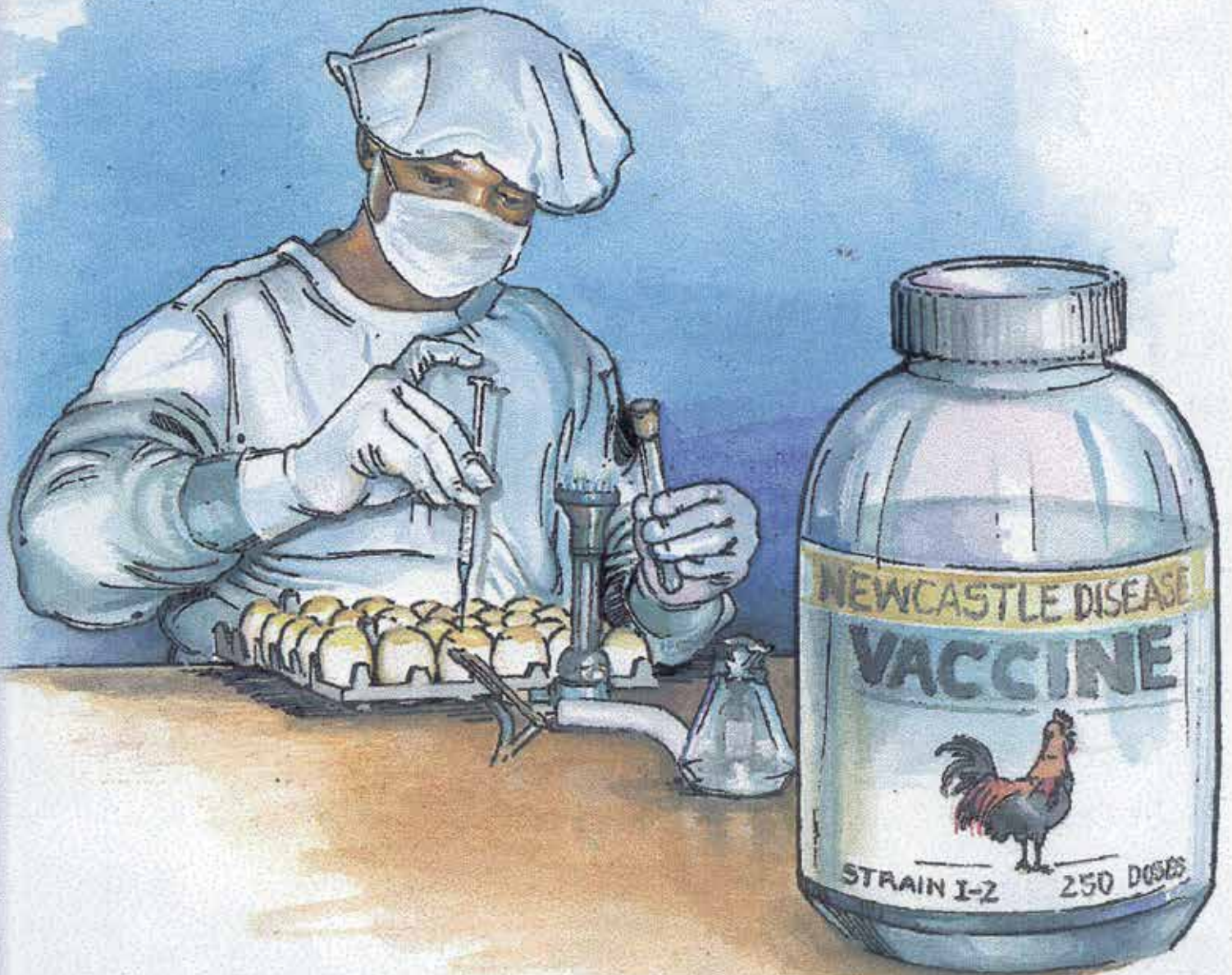




Australian Government
Australian Centre for
International Agricultural Research



CONTROLE DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

dans l'Aviculture Villageoise

**Manuel de
Laboratoire**

LA MALADIE DE NEWCASTLE

**CONTROLE
DE LA MALADIE
DE NEWCASTLE**
dans l'Aviculture Villageoise

**Manuel de
Laboratoire**

Mary Young, Robyn Alders, Sally Grimes, Peter Spradbrow,
Paula Dias, Amílcar da Silva et Quintino Lobo

Le Centre International Australien pour la Recherche Agricole (ACIAR) a été établi en juin 1982 par un Acte du Parlement Australien. ACIAR exerce ses activités dans le cadre du programme de coopération de développement international avec, pour mission, l'établissement de systèmes agricoles plus productifs, plus durables et bénéfiques aux pays en développement et à l'Australie. L'agence recommande la recherche collaborative entre les chercheurs australiens et ceux de pays en développement dans des domaines où l'Australie a des compétences de recherche particulières. L'agence administre aussi la contribution de l'Australie aux Centres de Recherche Agricoles Internationaux.

L'utilisation des noms commerciaux dans le présent document ne constitue ni un endossement, ni une discrimination contre aucun produit par le Centre.

SERIE MONOGRAPHIE D'ACIAR

Cette série contient les résultats de la recherche originale d'ACIAR, ou du matériel jugé approprié aux objectifs de recherche et de développement d'ACIAR. La distribution internationale de la série vise principalement les pays en développement.

© Centre Australien International pour la Recherche Agricole (ACIAR) [2012]
Ce travail est sous copyright. Excepté l'usage permis sous l'Acte de Copyright de 1968, toute reproduction partielle ou intégrale par quelque procédé et sur quelque support que ce soit est interdite sans l'autorisation préalable écrite de ACIAR, GPO Box 1571, Canberra ACT 2601, Australie.
aciara@aciara.gov.au

Première publication 2002. Seconde édition 2012.

Young M., Alders R., Grimes S., Spradbrow P., Dias P., da Silva A. et Lobo Q. 2012. Le Contrôle de la Maladie de Newcastle chez les poulets de village: un manuel de laboratoire. 2e éd. Monographie ACIAR No. 87a. Centre Australien International pour la Recherche Agricole: Canberra. 153 p.

Monographie ACIAR No. 87a 2e édition

Monographies ACIAR – ISSN 1031-8194 (imprimé), ISSN 1447-090X (en ligne)

ISBN 978 1 921962 45 5 (imprimé)

ISBN 978 1 921962 46 2 (en ligne)

Procédé de production éditorial géré par Melanie Lawrence.
Claviste, Beverley McIntyre.

Avant-propos

La maladie de Newcastle (MN) est une contrainte majeure dans la production avicole mondiale. Elle est endémique dans beaucoup de pays en développement et elle est particulièrement importante dans les villages où les moyens de subsistance des populations dépendent de l'aviculture. Le contrôle efficace et durable de la MN dans les volailles de village est accompli par la vaccination et dépend d'une source sûre, facilement accessible d'un vaccin à prix abordable correspondant aux besoins des propriétaires de poulets de village. La production locale et l'utilisation de la souche vaccinale I-2 de MN sont en cours dans un certain nombre de pays en développement dans le cadre des programmes de lutte contre la MN et cela a abouti à une amélioration de la production de poulets et des conditions de vie de beaucoup de familles en zone rurale. Ces familles bénéficient maintenant d'une nutrition améliorée et d'une source de revenu supplémentaire générée par la vente des excédents d'œufs ou de poulets.

Au cours des 15 dernières années, l'Australie a soutenu la mise en œuvre de programmes efficaces de contrôle de la MN en Asie et en Afrique, y compris un certain nombre de projets de recherche financés par le Centre Australien pour la Recherche Agricole Internationale (ACIAR). La recherche financée par ACIAR contribue à la sécurité alimentaire et nutritionnelle, à la sûreté alimentaire et à une production animale écologiquement durable. Ce manuel et ses volumes associés contribuent de manière significative à ce travail en permettant un meilleur contrôle de la MN au niveau local, et une meilleure production avicole dans les villages, ce qui à son tour contribue à une meilleure qualité de vie, de nutrition et d'environnement pour les éleveurs vivant dans la pauvreté.

Depuis sa première publication en 2002, ce manuel a été utilisé avec succès dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie qui produisent et utilisent la souche vaccinale I-2 de la MN. Le manuel est reconnu comme une source précieuse d'information pour le personnel de laboratoire et a été utilisé comme matériel de base pour les ateliers de formation pratique de chercheurs et techniciens de laboratoires producteurs de vaccins en Afrique et en Asie. L'usage de ce manuel permet aux pays de contrôler à la fois la qualité des vaccins produits localement et importés, et d'assurer la livraison efficace de vaccin dans les zones où la chaîne de froid n'est pas fiable.

Cette deuxième édition, mise à jour après 10 ans d'expérience sur le terrain, a été publiée en raison de l'intérêt croissant dans la production locale du vaccin de la MN, particulièrement le vaccin I-2. La traduction en Français assurera que cette information soit facilement accessible aux pays francophones de la région.



Nick Austin
Directeur Général
ACIAR

Remerciements

Lors de la préparation de ce manuel, les auteurs se sont inspirés des informations contenues dans les manuels *Small-scale production and testing of Newcastle disease vaccine: Laboratory manual*, préparé par Peter Spradbrow, Zuhara Bensink et Sally Grimes (1995) et *Training course in local production of I-2 Newcastle disease vaccine* par Murray Maclean et Malcolm Ramsay (1999). La Section 4.9 est une contribution du Dr Ian Morgan et la Section 4.8.3, celle du Dr Zuhara Bensink. Nous tenons à les remercier pour leur contribution. Nous remercions aussi tout particulièrement Mr Razac Chame pour sa patience et son excellence artistique.

Nous tenons également à souligner le soutien, les conseils et l'assistance de tous ceux qui ont été impliqués dans notre travail:

- le Directeur des Sciences Animales au Mozambique,
- le personnel de l'Ecole des Sciences Vétérinaires à l'Université de Queensland, en particulier Dr Joanne Meers,
- le Centre Australien pour la Recherche Agricole Internationale (ACIAR),
- Claire Leclercq, Natalie Bloch, Ibrahim Diallo et Patrick Derrien pour leur travail méticuleux dans la préparation de cette traduction française.

Table des Matières

	Page
Avant-propos	3
Remerciements	4
Abréviations	8
1.0 Introduction Générale	9
1.1 Introduction	9
1.2 Comment se servir de ce manuel	10
1.3 La maladie de Newcastle et son contrôle	10
1.4 Vaccin de souche vaccinale I-2 de la MN	13
1.4.1 Caractéristiques du lot de semence primaire I-2 de la MN	15
1.4.2 Séquence nucléotidique du lot de semence primaire du virus I-2 de la MN	15
1.5 Qualité du vaccin	16
2.0 Gestion et entretien du laboratoire	18
2.1 Laboratoire de production de vaccin	18
2.1.1 Exigences élémentaires pour le laboratoire	18
2.2 Sécurité au laboratoire	19
2.3 Technique d'asepsie	21
2.3.1 Utilisation d'un bec Bunsen	23
2.3.2 Utilisation d'une enceinte de sécurité biologique	23
2.4 Utilisation et entretien de l'équipement de laboratoire	24
2.4.1 Centrifugeuses	25
2.4.2 pH mètre	25
2.4.3 Pipetmans	26
2.5 Nettoyage, décontamination et disposition des déchets	26
2.5.1 Laboratoire	26
2.5.2 Equipement et consommables	26
2.5.3 Nettoyage des incubateurs à œufs	27
2.5.4 Fumigation des incubateurs à œufs et des salles de production du vaccin	28
2.5.5 Elimination des déchets	29
2.6 Suivi des stocks, réactifs et consommables	29
2.7 Tenue des registres	30
3.0 Production du vaccin I-2 de la MN	32
3.1 Vue d'ensemble de la production du vaccin I-2	32
3.2 Structure de l'œuf embryonné de poule	35
3.3 Sélection et traitement des œufs pour la production et le contrôle de vaccins	36
3.3.1 Choix des œufs	37
3.3.2 Nettoyage des œufs	38
3.3.3 Incubation des œufs	38
3.3.4 Mirage et marquage des œufs	39

3.4	Inoculation des œufs par la cavité allantoïdienne	40
3.5	Récolte du liquide allantoïdien	43
3.6	Lots de semence de vaccin	44
3.6.1	Dilution du lot de semence primaire du vaccin I-2	46
3.6.2	Préparation de la semence de travail du vaccin I-2	46
3.6.3	Préparation du vaccin I-2 à partir de la semence de travail	47
3.7	Préparation du vaccin I-2	48
3.7.1	Exemples pratiques	51
3.7.2	Exercices	52
4.0	Contrôle de la souche vaccinale I-2 de la MN	54
4.1	Collecte de sang à la veine de l'aile des poulets	54
4.2	Préparation d'une suspension de globules rouges après lavage	56
4.3	Test pour la présence du virus (test d'hémagglutination)	58
4.3.1	Test rapide d'hémagglutination	59
4.3.2	Test d'hémagglutination	59
4.3.3	Titration de l'hémagglutinine en utilisant le test quantitatif d'hémagglutination	61
4.4	Estimation de la concentration de virus vivant de la MN	62
4.4.1	Exemple pratique	67
4.4.2	Exercices	69
4.5	Test du vaccin pour la présence de contaminants	72
4.5.1	Vérification de l'absence de contamination bactérienne et fongique dans le vaccin	72
4.5.2	Vérification de l'absence d'agents viraux exogènes dans le vaccin	73
4.6	Essais en laboratoire du vaccin I-2 de MN	74
4.7	Préparation du sérum	76
4.8	Titration des anticorps (test d'inhibition d'hémagglutination)	77
4.8.1	Préparation de l'antigène pour le test d'inhibition d'hémagglutination	78
4.8.2	Test d'inhibition d'hémagglutination	78
4.8.3	Exercices	84
4.8.4	Préparation du sérum de contrôle IH-négatif	86
4.8.5	Préparation du sérum de contrôle IH-positif	86
4.8.6	Adsorption d'agglutinines naturelles	87
4.8.7	Calcul de la moyenne géométrique des titres (MGT)	88
4.9	Enquêtes sérologiques	88
4.9.1	Estimation de la prévalence de la maladie	88
4.9.2	Déterminer l'efficacité du vaccin	90
4.9.3	Exercices	91
5.0	Aspects pratiques de la distribution du vaccin I-2 de la MN	92
5.1	Recommandations générales pour la lyophilisation du vaccin I-2 de la MN	92
5.2	Inspection du vaccin après lyophilisation	92
5.3	Test de stabilité du vaccin	93
5.4	Étiquetage du vaccin	94

5.5	Stockage du vaccin	95
5.6	Maintien de la chaîne de froid	96
5.7	Emballage du vaccin	99
5.7.1	Vaccin lyophilisé	99
5.7.2	Vaccin liquide	100
5.7.3	Réipients et compte-gouttes pour vaccin sans effet nocif pour le virus	100
5.7.4	Taille de la goutte	100
5.8	Transport du vaccin	101
5.9	Reconstitution et administration du vaccin I-2 par compte-gouttes	102
5.9.1	Reconstitution et administration du vaccin I-2 lyophilisé	102
5.9.2	Administration du vaccin I-2 liquide en utilisant un compte-gouttes	102
5.10	Résolution des problèmes	103
6.0	Diagnostic de la maladie de Newcastle	108
6.1	Isolement et caractérisation du virus	109
6.2	Tests de pathogénicité	110
7.0	Références bibliographiques	112
8.0	Glossaire	118
9.0	Annexes	121
Annexe 1.1	Solution saline de phosphate tamponné (sans calcium ni magnésium)	121
Annexe 1.2	Tampon de formol neutre à 10%	123
Annexe 1.3	Solution d'iode à 3,5%	124
Annexe 1.4	Tampon de glycérol phosphate à 50%	125
Annexe 1.5	Alcool à 70%	126
Annexe 1.6	La solution d'Alsever	127
Annexe 1.7	Solution d'acide-citrate-dextrose (ACD)	128
Annexe 1.8	Solution véronal gélatine dextrose (VGD)	129
Annexe 2	Liste générale de verrerie et de consommables de laboratoire	130
Annexe 3	Enregistrement du vaccin	131
Annexe 4	Utilisation d'un pipetman multicanaux	133
Annexe 5	Conversion de r.p.m. en force centrifuge relative (FCR)	134
Annexe 6	Utilisation d'antibiotiques dans la production de vaccins	136
Annexe 7	Calcul du titre en utilisant la méthode Spearman-Kärber	137
Annexe 8	Préparation des dilutions en série	140
Annexe 9	Instructions élémentaires pour l'administration du vaccin vivant, thermotolérant, contre la maladie de Newcastle	142
Annexe 10	Comment calculer le volume d'eau nécessaire pour diluer le vaccin lyophilisé	145
Annexe 11	Solutions des exercices	146
Annexe 12	La maladie de Newcastle en Australie	151
Annexe 13	Sources d'informations supplémentaires	153

Abréviations

ACD	Acide citrique/citrate/dextrose
ACIAR	Centre Australien pour la Recherche Agricole
AQ	Assurance de qualité
ASEAN	Association des Nations d'Asie du Sud-Est
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
°C	Degrés Celsius
CQ	Contrôle de qualité
DIE ₅₀	Dose infectieuse moyenne pour l'embryon
DLE ₅₀	Dose létale moyenne pour l'embryon
°F	Degrés Fahrenheit
FCR	Force centrifuge relative
g	Grammes
<i>g</i>	Accélération due à la pesanteur
GR	Globule rouge
HA	Hémagglutination ou test d'hémagglutination
HN	Glycoprotéine hémagglutinine-neuraminidase située sur l'enveloppe du virus de la MN
I-2	Souche thermostable avirulente du virus de la MN, utilisée sous forme de vaccin vivant
IH	Inhibition de l'hémagglutination
IPIIC	Indice de pathogénicité intracérébrale (Intracerebral Pathogenicity Index)
IPIIV	Indice de pathogénicité intraveineuse (Intravenous Pathogenicity Index)
L	Litre
Log	Logarithme
m	Mètre
µL	Microlitre
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MDT	Temps moyen de l'effet létal (mean death time)
MGT	Moyenne géométrique des titres
MN	Maladie de Newcastle
MSDS	Fiche technique de sécurité du matériel
NDV4-HR	Souche de vaccin vivant, avirulent, thermostable contre la Maladie de Newcastle
OIE	Organisation Mondiale de la Santé Animale (Organisation Internationale des Epizooties)
ONG	Organisation non gouvernementale
PBS	Solution saline de phosphate tamponné
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PCV	Volume globulaire (ou hématocrite)
PE-BD	Polyéthylène basse densité
pH	Mesure de l'acidité ou de l'alcalinité d'une solution
PON	Procédure Opératoires Normalisées
PM	Poids moléculaire
RA	Réactif d'analyse
r.p.m.	Tours par minute
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne par la transcriptase inverse
SPF	Exempt d'agents pathogènes spécifiques
US	Etats-Unis d'Amérique
UV	Ultraviolet
V4	Vaccin vivant, avirulent, thermostable contre la Maladie de Newcastle
VGD	Tampon véronal gélatine dextrose
w/v	Poids par volume (par exemple g/ml ou g/100 ml)

1.0

Introduction Générale

1.1 Introduction

Le contrôle de la maladie de Newcastle (MN) est un obstacle majeur dans la production de poulets de village dans beaucoup de pays du monde, et présente des défis particuliers pour les autorités vétérinaires nationales et les agriculteurs. Bien que des vaccins efficaces soient disponibles auprès de grandes sociétés pharmaceutiques, ils sont rarement utilisés dans les zones où des températures ambiantes élevées, un manque d'infrastructure stable, des petits élevages et une pénurie de devises étrangères sont monnaie courante. Dans les villages où les éleveurs de poulets qui désirent protéger leurs élevages contre la MN sont tenus d'acheter le vaccin, le coût du vaccin est une contrainte supplémentaire. Plus le vaccin est cher, moins les agriculteurs seront en mesure de l'acheter, et plus la couverture vaccinale sera limitée.

Le vaccin I-2 vivant thermotolérant avirulent contre la MN a été développé pour surmonter certains de ces problèmes. La souche I-2 du virus de la MN est librement accessible et gratuite, et elle est disponible pour les laboratoires gouvernementaux producteurs de vaccins et autres organisations dans les pays en développement souhaitant produire le vaccin localement. La production à petite échelle du vaccin I-2, pour une utilisation locale dans les villages, est considérée comme une stratégie intérimaire. L'usage d'un moyen effectif et à prix abordable de contrôle de la MN résultera dans l'augmentation de la production de poulets villageois. Grâce à une production accrue, le pouvoir d'achat des producteurs de poulets augmentera, et cela leur permettra d'utiliser des vaccins plus onéreux.

Thermotolérance

Dans ce manuel, le terme thermotolérance sert à décrire la capacité du vaccin I-2 MN et du virus parental à conserver un niveau infectieux après exposition à la chaleur. Pour le vaccin I-2 MN, cette propriété est définie par le temps durant lequel le vaccin conserve un titre infectieux suffisant pour induire une réponse immunitaire protectrice à une température définie.

Pour fournir l'information nécessaire aux utilisateurs du vaccin, les producteurs du vaccin doivent mesurer le titre infectieux du vaccin après exposition à une gamme de températures (par exemple 4°C, température ambiante, 37°C) pour des périodes réalistes (un nombre spécifique de jours, semaines, mois ou années).

Ce manuel décrit les procédés nécessaires pour produire et tester le vaccin thermotolérant avirulent vivant I-2 contre la MN. Il aborde également le traitement des prélèvements pour la confirmation d'un diagnostic de la MN et les procédures utilisées dans la réalisation du challenge avec le vaccin.

Ce manuel est destiné aux techniciens de laboratoire et aux chercheurs qui ont besoin d'un guide étape par étape pour la production de vaccin I-2 de la MN et/ou pour les tests requis sur ledit vaccin. L'information présentée dans ce manuel devrait aider les autorités vétérinaires intéressées par le contrôle de la MN dans les élevages de poulets de village à décider si les ressources et les installations disponibles sont suffisantes pour la production locale du vaccin I-2. Des renseignements sont aussi inclus pour assister les producteurs du vaccin à préparer des demandes d'enregistrement pour le vaccin I-2.

1.2 Comment se servir de ce manuel

Ce manuel a six sections:

1. une introduction à la MN et son contrôle
2. les aspects généraux de gestion et d'entretien de laboratoire
3. les techniques de production du vaccin I-2 de la MN
4. les essais du vaccin I-2 de la MN
5. les aspects pratiques de la distribution du vaccin y compris l'emballage, l'étiquetage, le stockage et l'administration
6. le diagnostic de la MN

L'information sur la préparation des réactifs et solutions, l'enregistrement du vaccin, et autres informations de référence utiles sont présentées dans les Annexes 1 à 13. Les termes utilisés dans ce manuel sont définis dans le glossaire à la Section 8.

Ce manuel doit être utilisé avec les volumes associés suivants: *Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual* (Alders et Spradbrow 2001), et *Controlling Newcastle disease in village chickens: a training manual* (Alders et al. 2002).

1.3 La maladie de Newcastle et son contrôle

La maladie de Newcastle est une maladie très contagieuse des volailles domestiques et des oiseaux sauvages. Elle est provoquée par un virus et est généralement considérée comme une des maladies aviaires les plus importantes. Bien que la plupart des espèces aviaires soient sensibles à l'infection par le virus responsable de la MN, ce sont les poulets qui sont les plus sensibles à cette maladie. La MN a d'abord été identifiée en Indonésie et en Angleterre en 1926 (Doyle 1927) et les virus de la MN sont maintenant répandus dans le monde entier (Aldous et Alexander 2001).

La MN sous sa forme hautement pathogène est une maladie répertoriée dans le Code Sanitaire pour les Animaux (2011a) de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) et doit être signalée à l'OIE. Les maladies répertoriées par l'OIE sont des maladies qui peuvent se propager de pays en pays, qui ont un taux de mortalité ou morbidité importante au sein des espèces sensibles, et/ou qui peuvent être transmises à l'homme (zoonoses). Les pays atteints ont l'obligation de déclarer les foyers à l'OIE. La MN est d'une importance majeure dans les élevages commerciaux aussi bien que dans les élevages locaux de poulets car elle peut provoquer jusqu'à 100% de mortalité.

Les oiseaux infectés par les virus de la MN peuvent avoir une variété de signes cliniques en fonction de la souche responsable de la MN. L'âge, la santé et l'état immunitaire de l'animal et la présence d'infections concomitantes influenceront également la sévérité des signes cliniques. Certaines souches du virus de la MN ne provoquent aucun signe clinique, tandis que d'autres tuent les oiseaux rapidement. Les souches du virus de la MN ont été divisées en cinq groupes ou pathotypes sur la base des signes cliniques observés chez les poulets infectés expérimentalement (Beard et Hanson 1984). Ces pathotypes sont définis par une variété de signes et de lésions (Tableau 1) et il peut parfois être difficile de distinguer clairement ces signes et lésions les uns des autres.

Tableau 1 Pathotypes du virus de la maladie de Newcastle

Pathotype	Description de la maladie	Signes cliniques et lésions post mortem
Viscérotrope vélogène	Infection aiguë mortelle chez les poulets de tous âges	Lésions hémorragiques dans le tractus gastro-intestinal
Neurotrope vélogène	Infection aiguë chez les poulets de tous âges; mortalité élevée	Signes respiratoires et nerveux
Mésogène	Moins pathogène avec faible mortalité; plus souvent chez les jeunes poulets	Signes respiratoires et nerveux
Lentogène	Légère infection inapparente; décès confinés aux jeunes poulets	Signes respiratoires
Asymptomatique entérique (Avirulente)	Infection avirulente; aucune mortalité	Aucun signe ou lésion

La MN est causée par un virus qui s'appelle *Paramyxovirus aviaire 1* (OIE 2011b). La particule virale est constituée d'un assemblage composé d'acide ribonucléique monocaténaire entouré d'une enveloppe protéique (Figure 1). Cet ensemble est enveloppé par des membranes de la cellule hôte. L'enveloppe extérieure est hérissée de pointes faites de glycoprotéines d'origine virale, la Neuraminidase Hémagglutinine (HN) et la Glycoprotéine de Fusion (F), toutes les deux codées par le génome viral.

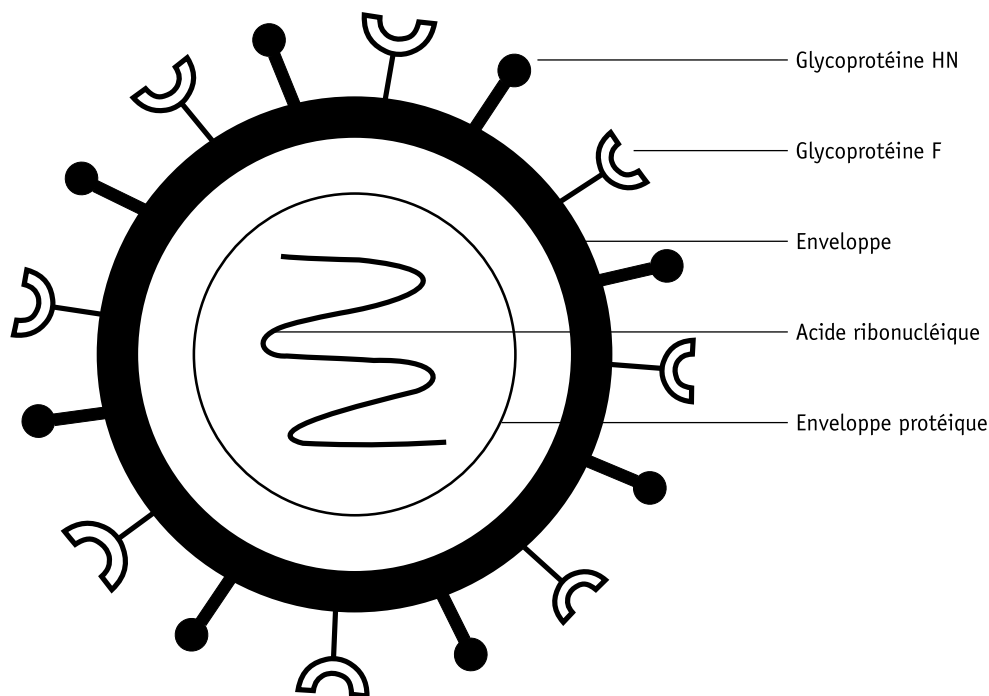


Figure 1: Virus de la maladie de Newcastle – une représentation schématique.

Afin de se répliquer, la particule virale de la MN doit pénétrer dans la cellule. La protéine HN aide la particule virale à s'attacher à des sites spécifiques de la cellule hôte, appelés récepteurs, et la protéine F aide l'enveloppe de la particule virale à se fusionner avec la membrane cellulaire. Ceci permet aux constituants internes de la particule virale de pénétrer le cytoplasme de la cellule, où la répllication se produit. Après répllication, la particule virale bourgeonne de la surface de la cellule et s'échappe de la cellule. Ce procédé est représenté schématiquement sur la Figure 2. L'enveloppe de la particule virale est dérivée de la membrane de la cellule hôte. Certains des tests décrits plus loin dans ce manuel exploitent les propriétés de la protéine HN.

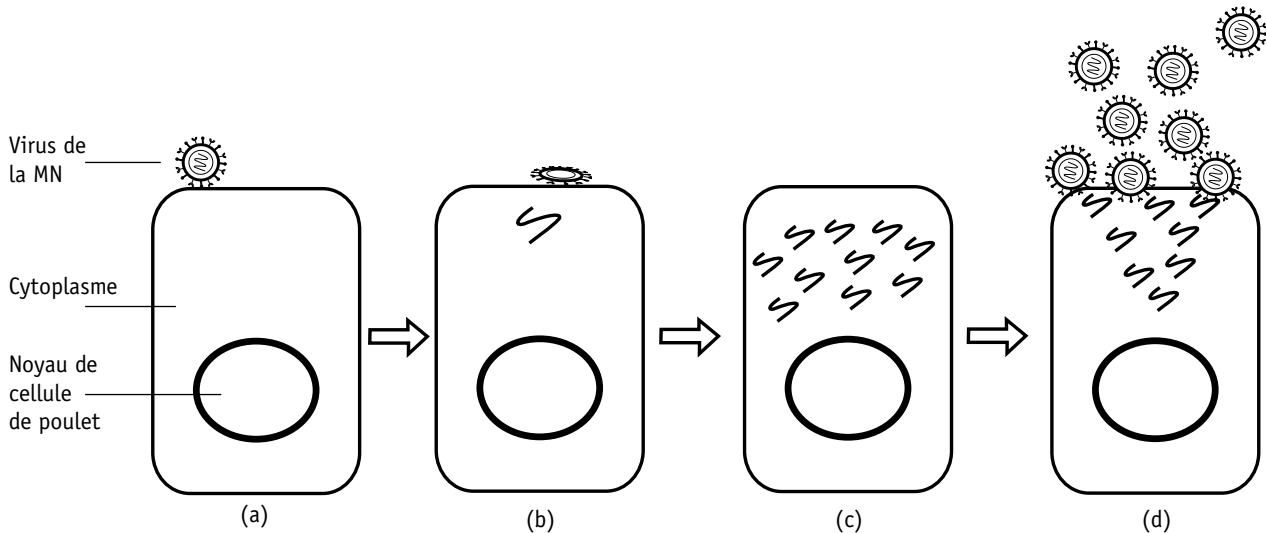


Figure 2: Réplication du virus de la maladie de Newcastle: (a) la protéine HN aide la particule virale à s'attacher à une cellule de poulet, (b) la protéine F aide l'enveloppe de la particule virale à se fusionner avec la membrane cellulaire et les constituants internes de la particule virale pénètrent dans la cellule, (c) répllication dans le cytoplasme de la cellule; (d) la particule virale bourgeonne de la surface cellulaire et s'échappe de la cellule.

Dans beaucoup de pays, la MN est contrôlée par la vaccination. L'immunogénicité, le type de vaccin (inactivé ou vivant) et l'innocuité du vaccin sont les principaux facteurs régissant le choix du vaccin (Alexander 2000). Plusieurs vaccins à immunogénicité et innocuité convenables sont disponibles pour le contrôle de la MN chez les poulets villageois. Les avantages et les inconvénients de ces vaccins ont été examinés par Bell (2001). La facilité du transport, le coût, l'expérience préalable dans l'utilisation des vaccins, la structure des services vétérinaires en place, la distribution de la population et l'infrastructure des communications sont des facteurs qui doivent être considérés lors du choix d'un vaccin.

Les autorités vétérinaires souhaitant utiliser des vaccins pour contrôler la MN chez les poulets villageois doivent tenir compte des ressources disponibles, de la demande pour le vaccin et du consentement des agriculteurs à acheter ce vaccin. Ils doivent ensuite décider quelle est l'option la mieux adaptée à ces circonstances (Tableau 2). Le prix du vaccin importé doit être comparé aux coûts impliqués dans la production locale d'un vaccin de qualité acceptable. Le vaccin I-2 de la MN liquide produit localement est probablement le plus abordable, suivi du vaccin I-2 de la MN lyophilisé produit localement, et le vaccin importé NDV4-HR est le plus onéreux.

Tableau 2 Comparaison des vaccins contre la maladie de Newcastle

	Newcavac	ITA-NEW	Komarov	La Sota	NDV4-HR	I-2
Type	Inactivé	Inactivé	Vivant mésogène	Vivant lentogène	Vivant avirulent	Vivant avirulent
Immunogénicité	Très bonne	Très bonne	Bonne	Modérée	Modérée	Modérée
Thermotolérance	Modérée	Modérée	Faible	Faible	Très bonne	Très bonne
Production	Œufs SPF	Œufs SPF	Œufs SPF (parfois)	Œufs SPF (parfois)	Œufs SPF	Œufs provenant d'élevage à contamination minimale
Devises étrangères nécessaires	Oui	Oui	Oui, sauf si produit localement	Oui, sauf si produit localement	Oui	Non
Voie d'administration	Injection	Injection	Injection	Goutte oculaire, dans les abreuvoirs	Goutte oculaire, dans les abreuvoirs, dans l'alimentation	Goutte oculaire, dans les abreuvoirs, dans l'alimentation
Transmissibilité	n.a.	n.a.	Oui	Oui	Oui	Oui

n.a. Non applicable
 SPF Exempt agents pathogènes spécifiques.

Si une institution gouvernementale envisage de produire le vaccin localement, il faudra qu'elle s'engage, à long terme, à fournir du personnel, des installations et des fonds pour pouvoir établir et maintenir la production. Des mécanismes de récupération des coûts (par exemple, un fonds de roulement) doivent être établis, de telle sorte que les produits de la vente du vaccin reviennent directement au producteur pour permettre l'achat en temps voulu des œufs, des réactifs et des consommables nécessaires à la fabrication de vaccins en cours.

L'autre avantage pour les autorités vétérinaires est que la production locale va aussi faciliter le renforcement des capacités locales à tester les vaccins importés afin de s'assurer qu'ils répondent bien aux normes nationales de qualité.

Le contrôle de la MN par la vaccination devrait toujours être accompagné d'une bonne pratique d'élevage, d'une bonne hygiène et d'une bonne biosécurité. Une bonne alimentation et un bon logement permettront aux poulets d'augmenter leur réponse immunitaire contre le vaccin. Des précautions doivent être prises pour limiter la propagation de la MN à partir des oiseaux infectés par le contrôle des mouvements de personnes et d'animaux, par la séparation des oiseaux malades et par la destruction des oiseaux infectés et leurs carcasses. Il faut se rappeler que les oiseaux vaccinés exposés à un virus virulent de la MN peuvent s'infecter et excréter le virus virulent, bien qu'ils restent cliniquement sains. Ces oiseaux peuvent donc être une source d'infection pour les oiseaux non vaccinés.

1.4 Vaccin de souche vaccinale I-2 de la MN

Depuis 1984 le Centre Australien pour la Recherche Agricole Internationale (ACIAR), a aidé des projets qui ont conduit au développement de moyens simples et fiables pour vacciner les poulets villageois contre la MN. Le NDV4-HR et le I-2, deux vaccins à thermotolérance améliorée, ont été développés à cette fin. Le NDV4-HR a été testé avec succès en Asie et en Afrique et il est devenu un vaccin commercial, avec le lot de semence primaire sous patente commerciale. La souche vaccinale I-2 de la MN est similaire au NDV4-HR, mais elle n'est pas sous patente et le lot de semence primaire est librement accessible aux laboratoires des pays en développement souhaitant produire le vaccin localement.

La souche I-2, une souche avirulente du virus australien de la MN, a été sélectionnée après analyse de quarante-cinq isolats de virus avirulents de la MN.

Ces isolats ont été examinés pour leur antigénicité, leur innocuité et leur capacité à se propager (Spradbrow, Mackenzie et Grimes 1995).

Dix-huit isolats ont ensuite été testés pour leur thermostabilité, et les isolats ayant fait preuve de résistance thermique améliorée ont été sélectionnés. La souche I-2 donna les meilleurs résultats et elle fut ensuite cultivée dans des œufs provenant d'un élevage exposé à un minimum de contamination pour former un lot de semence primaire. Ce lot de semence primaire a ensuite été testé pour son innocuité et pour l'absence de contamination bactérienne (Bensink et Spradbrow 1999). Des tests ultérieurs ont confirmé que le lot de semence primaire était exempt de virus étrangers et de contamination bactérienne et fongique (Laboratoire Australien de Santé Animale, rapport des essais des spécimens SAN: 02-0506, 2002). Les résultats complets des tests figurent dans la feuille de renseignements du lot de semence primaire pour la souche vaccinale I-2 de la MN. Voir l'Annexe 13 pour les coordonnées.

La souche vaccinale I-2 de la MN a des propriétés similaires au vaccin NDV4-HR. Elle est

- vivante
- thermotolérante
- non virulente pour les poulets
- elle se propage entre les poulets par contact direct
- elle provoque une réponse immunitaire semblable à celle obtenue avec le NDV4-RH
- elle se réplique dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés atteignant un titre très élevé
- elle n'est pas toxique pour les embryons de poulet inoculés dans la cavité allantoïdienne (aucun embryon n'est mort dans les 148 heures suivant l'inoculation, et donc le délai moyen de mort n'a pas pu être calculé).

L'innocuité de la souche vaccinale I-2 de la MN a été confirmée chez des poussins SPF de un jour (Spradbrow et al. 2001). Aucun signe clinique n'a été observé pendant trois semaines chez les poussins inoculés par voie oculaire avec un vaccin produit à partir du lot de semence primaire I-2 de la MN et des doses de $10^{6,9}$ à $10^{7,9}$ DIE₅₀ (soit environ 10 et 100 fois la dose recommandée).

Comme d'autres vaccins thermotolérants, le vaccin I-2 conservera un titre d'infectivité supérieur plus longtemps s'il n'est pas exposé à la lumière du soleil, à la chaleur et aux changements fréquents de température. A titre indicatif, le vaccin I-2 lyophilisé devrait conserver un titre supérieur à 10^6 DIE₅₀ par dose pendant au moins 12 mois s'il est stocké à 4°C, pendant 8 semaines à 28°C et pendant deux semaines à 37°C (Alders et al. 2002). En revanche, le vaccin liquide I-2 de la MN (vaccin liquide) dilué au quart avec 2% de gélatine ne conservera un titre élevé que pendant 2 mois à 4°C, et seulement 14 jours à 28°C.

Le vaccin I-2 peut être administré par instillation oculaire, dans l'abreuvoir ou mélangé à des aliments (Alders et Spradbrow 2001). Des essais au Mozambique ont montré que les agriculteurs préféraient l'instillation oculaire à d'autres méthodes de vaccination: un plus grand nombre d'oiseaux vaccinés par instillation oculaire ont survécu à des épidémies de la MN sur le terrain, le vaccin n'avait pas besoin d'être administré aussi souvent et la vaccination était facile.

La souche vaccinale I-2 de la MN a été testée dans plusieurs pays dont le Bhoutan, le Cambodge, le Ghana (Amakye-Anim et al. 2000), Myanmar (Hlaing et al. 2000), le Sénégal, la Tanzanie et le Vietnam. Dans des expériences de laboratoire,

la souche vaccinale I-2 de la MN s'est avérée protectrice contre des souches locales virulentes du virus de la MN (Tu et al. 1998; Dias et al. 2001; Wambura, Kapaga et Hyera 2000). Au Mozambique le taux de protection conféré par le vaccin I-2 de la MN administré tous les 4 mois par voie oculaire a été d'environ 80% dans des situations d'épidémie (Dias et al. 2001).

Le vaccin I-2 de la MN produit dans des œufs provenant d'un élevage testé et déclaré exempt des principaux agents pathogènes transmis verticalement chez les volailles, (élevage exposé à un minimum de contamination) est recommandé uniquement pour le contrôle de la MN chez les poulets d'élevage villageois. Son utilisation n'est pas recommandée dans les élevages commerciaux, ni dans les élevages commerciaux à petite échelle ou les élevages péri-urbains, à moins que des procédures plus rigoureuses d'assurance de qualité ne soient mises en place pour assurer l'absence d'agents pathogènes importants transmis verticalement dans les élevages intensifs.

1.4.1 Caractéristiques du lot de semence primaire I-2 de la MN

Bensink et Spradbrow (1999) ont décrit les traits suivants pour le lot de semence primaire du virus I-2 de la MN.

- **Délai moyen de mort**
Aucune mortalité n'a été observée durant une période de 148 heures chez des embryons inoculés par voie allantoïdienne avec des doses de virus allant de $10^{1,7}$ à $10^{8,7}$ DIE₅₀.
- **Effet cytopathogène en culture cellulaire**
Le virus I-2 de la MN a provoqué un effet cytopathique avec destruction totale de monocouches cellulaires de reins d'embryons de poulet en 4 jours.
- **Thermotolérance**
Le lot de semence primaire du virus I-2 de la MN dans du liquide allantoïdien a survécu à une exposition à 56°C pendant 2 heures.
- **Préparation et présentation**
Le lot de semence primaire du virus I-2 de la MN a été préparé dans des œufs embryonnés provenant d'un élevage à exposition minimale à des pathogènes et gardé dans des conditions de sécurité biologique stricte à l'Institut de Recherche Animale, au Queensland Department of Primary Industries, à Brisbane, en Australie en 1994. Aucune croissance bactérienne aérobie ou anaérobie n'a été observée en bouillon trypticase soja et en bouillon viande cuite inoculés avec le lot de semence primaire du virus I-2 de la MN. Aucun *Mycoplasma* spp. n'a été isolé.

Le lot de semence primaire du virus I-2 de la MN est fourni sous forme de poudre lyophilisée composée de liquide allantoïdien mélangé à du lait en poudre écrémé à 5% dans une ampoule de verre scellée sous vide.

1.4.2 Séquence nucléotidique du lot de semence primaire du virus I-2 de la MN

Au cours de la réplication du virus, des particules virales de la MN sont produites avec des précurseurs inactifs de glycoprotéines F, appelés F0. Pour que les particules virales soient infectieuses, le F0 doit être clivé en deux polypeptides: F1 et F2. Ceci est provoqué par l'action d'enzymes spécifiques (protéases) contenus dans les cellules et les tissus de poulet. Le virus infectieux est produit uniquement lorsque des cellules contenant ces enzymes sont infectées.

Le clivage de la glycoprotéine F0 est directement lié à la virulence des virus *in vivo* (Rott 1979). Il a été postulé que les glycoprotéines F0 de virus virulents de la MN peuvent être clivées par des protéases qui existent dans de nombreux tissus et organes. L'infection par le virus entraîne la propagation des virus dans les poulets ou les embryons, endommageant de nombreux tissus et organes. En revanche, les virus de la MN de faible virulence sont uniquement sensibles aux protéases similaires à la trypsine, ce qui limite l'infection à certains types de cellules chez les poulets ou les embryons.

Le génome du virus du lot de semence primaire du vaccin I-2 de la MN a été entièrement séquencé (Kattenbelt et al. 2006). L'information sur cette séquence est accessible sur GenBank – numéro d'accèsion: AY935499 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

La virulence du virus de la MN est liée à la séquence d'acides aminés du site de clivage du gène F, qui détermine l'aptitude de clivage de la protéine F0. L'OIE (2011b) ne classe un vaccin de la MN comme virulent que s'il a au moins trois acides aminés basiques (Arginine, R ou Lysine K) dans les positions des résidus 113 à 116 et la phénylalanine (F) en position 117. Ainsi, la plupart des virus virulents ont la séquence suivante (↓ indique la position du site de clivage):

$$^{113}\text{R-Q-(R or K)-R-}\downarrow\text{-F-I-G}^{119}$$

La plupart des virus avirulents ont la séquence suivante:

$$^{113}\text{(R or K)-Q-G-R-}\downarrow\text{-L-I-G}^{119}$$

Le virus I-2 de la MN a la séquence: $^{113}\text{K-Q-G-R-}\downarrow\text{-L-I-G}^{119}$ (Kattenbelt et al. 2006; Wambura et al. 2007) indiquant que c'est un virus avirulent.

1.5 Qualité du vaccin

Le vaccin I-2 contre la MN a été développé pour répondre aux besoins particuliers des éleveurs de poulets villageois dans les pays en développement. Afin de répondre à ces besoins, les producteurs de vaccins ont une responsabilité de produire un vaccin qui est:

- inoffensif – ne provoquera pas de réactions locales ou généralisées lorsqu'il est utilisé tel que le recommande le fabricant
- actif – il contient suffisamment de virus pour provoquer une réponse immunitaire protectrice
- efficace – protégera les poulets contre la forme virulente de la MN
- pur – sans micro-organismes ou matériaux étrangers
- facile à utiliser
- à prix abordable.

Ces caractéristiques définissent la qualité du vaccin (Soulebot et al. 1997) qui est considéré comme «le facteur décisif dans la réussite ou l'échec de la vaccination» (Mariner 1997).

Pour assurer une production cohérente et de bonne qualité du vaccin I-2, le producteur doit mettre en place des normes et des contrôles couvrant tous les aspects de la fabrication et de la manutention. Ces normes et ces contrôles qui «définissent le risque ou la possibilité de produire et de répartir un produit sans valeur protectrice, contaminé, dangereux ou nuisible» (OIE 2011c) doivent être adaptés aux conditions dans lesquelles les vaccins sont produits et, si possible, doivent se conformer aux bonnes pratiques de fabrication. Les normes et les contrôles ne devraient pas être onéreux au point d'empêcher les agriculteurs d'acheter le vaccin pour protéger leurs élevages.

Les principes d'assurance qualité (AQ), de bonnes pratiques de fabrication (BPF), et de contrôle qualité (CQ) définissent les normes et les contrôles qui assurent la production d'un vaccin de bonne qualité, et qui sont à la base d'une bonne production de vaccins.

L'AQ comprend toutes les mesures prises pour assurer que la qualité du vaccin produit est satisfaisante pour l'usage auquel il est destiné, et dans le cas du vaccin I-2 de la MN, la vaccination des poulets villageois. Tous les aspects de la production de vaccin et les tests associés (tels que les installations, le personnel, les procédures, les dossiers, les matières premières, le contrôle de produits, l'étiquetage, l'emballage et la distribution) sont pris en compte. L'AQ assure que le processus de production des vaccins est uniforme et cohérent dans toutes les procédures de production et dans le contrôle des produits. L'AQ veille à ce que le processus de production de vaccin soit conçu, documenté, mis en œuvre et conduit avec le personnel, l'équipement et toutes les ressources nécessaires.

Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) forment la partie de l'AQ qui garantit que le produit est fabriqué dans un environnement sécuritaire et propre, par des méthodes spécifiées, sous une supervision adéquate, et avec des procédures de contrôle de qualité efficaces.

Le CQ est la partie des BPF concernant la prise et l'analyse d'échantillons à chaque étape du processus de production pour assurer la sécurité, la pureté, l'activité, l'efficacité et la stabilité du vaccin. Le CQ assure également que le vaccin ne sorte pas de l'unité de fabrication jusqu'à ce qu'il passe tous ces tests. Le CQ à lui seul n'est pas suffisant pour garantir la qualité du vaccin; il est préférable et plus économique de prévenir les problèmes de qualité de vaccins grâce à des bonnes AQ et BPF que d'attendre les résultats de contrôle du produit final!

Les procédures et les protocoles décrits dans ce manuel représentent le minimum requis pour assurer la production d'un vaccin I-2 de bonne qualité, adéquat pour une utilisation chez les poulets villageois. Les protocoles de production et de contrôle de vaccin devraient être révisés régulièrement, et le personnel devrait être encouragé à affiner et améliorer les procédures afin que les normes décrites dans le *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE 2011b, c, e), ou dans d'autres publications tel que la *European pharmacopoeia* (EDQM, 2010) ou le *Manual of ASEAN standards for animal vaccines* (1998) soient atteintes.

2.0

Gestion et entretien du laboratoire

2.1 Laboratoire de production de vaccin

Bien que le vaccin I-2 de la MN puisse être produit dans un laboratoire relativement simple en utilisant un matériel simple, certaines exigences élémentaires doivent être remplies pour assurer la production d'un vaccin de bonne qualité. La demande pour le vaccin I-2, c'est à dire le nombre de doses annuelles nécessaires, influencera également l'équipement et les installations nécessaires.

2.1.1 Exigences élémentaires pour le laboratoire

Équipements et installations

Des installations et des équipements devraient être dédiés uniquement à la production de vaccins. Dans certains cas, le personnel de production de vaccin aura à partager les installations et les équipements avec les sections de diagnostic ou de recherche de virologie. Ceci n'est pas recommandé et augmente le risque de contamination du vaccin I-2 avec d'autres micro-organismes. Si une séparation stricte des bâtiments de production de vaccin et des activités de recherche et de diagnostic n'est pas possible, il devrait être tout de même possible de séparer physiquement les zones de travail et le personnel de manière à produire un vaccin de bonne qualité.

L'équipement de base nécessaire à la production du vaccin I-2 comprend:

1. des incubateurs à œufs – deux de préférence (pour incuber les œufs avant et après inoculation)
2. une lampe pour le mirage des œufs
3. une salle propre, sans courant d'air (ou enceinte de sécurité biologique), avec approvisionnement en gaz et un bec Bunsen
4. une balance (électronique, à précision de 0,001 g) pour la pesée des antibiotiques et autres réactifs
5. un pH-mètre
6. un réfrigérateur ou une chambre froide (4°C) pour le stockage des consommables, antibiotiques, suspension de globules rouges) et du vaccin
7. un congélateur pour le stockage des lots de semence (la meilleure température est -70°C)
8. des installations de lavage et une unité de stérilisation – autoclave ou autocuiseur; four (doit atteindre 160°C)
9. une centrifugeuse
10. un distributeur de vaccin (qui pourrait être une seringue automatique)
11. des flacons pour vaccin –prouvé inoffensif au virus
12. de la verrerie générale de laboratoire et consommables (voir Annexe 2)
13. un lyophilisateur (et bouteilles appropriées, bouchons, joints) si un vaccin lyophilisé est produit.

L'eau distillée est nécessaire dans la production de vaccin I-2 pour préparer une solution saline de phosphate tamponné (PBS) utilisé pour la dilution de la semence de travail et pour la préparation de l'inoculum et des suspensions de globules rouges, et pour le rinçage final de la verrerie. Elle est aussi nécessaire pour la préparation des solutions utilisées pour la dilution du vaccin liquide. L'eau bi-distillée continue à être le système le plus fiable et durable de production d'eau convenable pour utilisation dans la production de vaccins et en culture cellulaire (Worrall, 1997). Les unités de distillation doivent être régulièrement nettoyées et détartrées.

L'électricité est nécessaire pour alimenter les équipements tels que les incubateurs à œufs, les réfrigérateurs et les congélateurs, ainsi que les lampes pour le mirage des œufs, les balances, les pH-mètres, les distillateurs et les fours. Tous les équipements délicats doivent être connectés à des stabilisateurs de tension, et les équipements indispensables tels que les incubateurs d'œufs, les congélateurs et les réfrigérateurs doivent être, dans la mesure du possible, connectés à un générateur de secours.

Les réactifs et les consommables doivent être achetés auprès d'une compagnie de bonne réputation et doivent être de pureté chimique requise. En général RA (réactif d'analyse) reflète un bon équilibre entre la qualité requise pour la production de vaccins et le prix. Les produits chimiques doivent être entreposés à la température adéquate et être utilisés avant la 'date limite d'utilisation' ou 'la date de péremption'.

Le *personnel* travaillant dans la production de vaccins doit recevoir une formation adéquate en matière de techniques et de procédures, et des cours réguliers de recyclage. Le personnel devrait être employé uniquement dans la production de vaccins. S'il travaille aussi dans une section de diagnostic ou de recherche, ces fonctions ne devraient pas être effectuées lorsque la production de vaccins est en cours. Un organigramme et une description précise de chaque fonction devraient être disponibles, indiquant qui est responsable de quoi et qui rend compte à qui.

2.2 Sécurité au laboratoire

Certains produits chimiques, réactifs, micro-organismes ou équipements utilisés dans le laboratoire peuvent être dangereux pour le personnel de laboratoire. Afin de minimiser les risques pour le personnel, il est important d'identifier les dangers potentiels. Des procédures peuvent alors être mises en place pour garantir un travail effectué de manière sûre et efficace. Le personnel de laboratoire devrait être mis au courant de ces dangers et des méthodes pour y remédier.

Produits chimiques et réactifs

- Demander aux fournisseurs une copie de la fiche technique de sécurité du matériel (MSDS) pour chaque produit chimique commandé. La MSDS donne des informations sur les dangers associés à l'utilisation du produit chimique y compris le risque d'incendie et d'explosion, toutes précautions particulières nécessaires à prendre lors de l'utilisation du produit chimique, comment faire en cas d'accidents et renversements accidentels et les premiers soins. La MSDS doit être placée dans un fichier et être conservée dans le laboratoire pour servir de référence disponible immédiatement.
- Stocker les produits chimiques correctement. Lire les instructions d'utilisation et de stockage sur l'étiquette.
- Étiqueter toutes les solutions stockées avec le nom de la solution ou du produit chimique, la concentration, la date de préparation, le nom ou les initiales de la personne qui a préparé la solution et les dangers associés.

Verrerie et objets tranchants (lames de bistouri, aiguilles, etc.)

- Ne pas utiliser de verrerie ébréchée ou fissurée.
- Toujours porter les grandes bouteilles ou flacons dans un panier approprié, ou les porter à deux mains: l'une pour tenir le goulot de la bouteille et l'autre dessous pour la soutenir.
- Faire attention lors de la fixation d'un tube de caoutchouc à un tube en verre ou lors de l'insertion d'un tube en verre dans un bouchon en caoutchouc. Les tubes en verre se brisent facilement.
- Éliminer les débris de verre, les lames de scalpels et les aiguilles usagées avec précaution. L'utilisation de récipients appropriés est recommandée pour les objets tranchants.

Dangers électriques

- Faire inspecter les équipements électriques régulièrement.
- Ne pas utiliser des appareils ou accessoires avec des fils conducteurs nus, mal isolés ou usés, dans le laboratoire.

Becs Bunsen, autoclaves et fours

- Faire attention en travaillant avec un bec Bunsen. Travailler autour, et non pas au-dessus du brûleur, de façon à ce que les manches ne prennent pas feu.
- Éteindre le bec Bunsen quand il n'est plus utilisé.
- Ne pas utiliser de becs Bunsen à proximité de réactifs inflammables.
- Laisser la verrerie et les autres articles refroidir avant de les retirer du four ou d'un autoclave, ou bien utiliser des mitaines d'isolation lors du retrait d'objets chauds du four.

Lampes à ultraviolets (UV)

- Veiller à ce que les lampes UV soient éteintes avant d'entrer dans des locaux équipés de lampes UV ou d'utiliser une enceinte de sécurité biologique. L'exposition à la lumière UV peut provoquer des dommages aux yeux et à la peau.

Fumigènes

- S'assurer que le personnel de laboratoire effectuant la fumigation connaît les procédures correctes et qu'il est pourvu d'équipement de sécurité approprié.
- Veiller à ce que les chambres soient verrouillées et que des signes d'avertissement soient placés sur les portes lors de la fumigation.
- Veiller à ce que deux personnes soient présentes lors de la préparation de la fumigation afin que de l'aide soit disponible en cas de problème.

Dangers biologiques

- Prendre soin lors de la manutention du virus de la MN, et se laver minutieusement les mains après avoir manipulé des matériaux ou des échantillons du virus. Des cas de conjonctivite, d'œdème des paupières et des signes généralisés bénins tels que fièvre, frissons et maux de tête ont été signalés dans les infections humaines par le virus de la MN (Alexander 2000).

2.3 Technique d'asepsie

Les micro-organismes tels que les bactéries, champignons et levures existent partout – dans l'air, sur les surfaces de travail, dans les réactifs et les solutions mal stérilisés, sur la verrerie, l'équipement et sur les techniciens eux-mêmes. Pendant la production, le vaccin I-2 de la MN peut être contaminé par ces micro-organismes.

De simples techniques peuvent être utilisées pour réduire les risques de contamination du vaccin.

- La production de vaccin devrait être effectuée dans une zone où il y a peu ou pas de mouvement humain et où aucune autre activité n'est menée.
- Seules les personnes indispensables à la production de vaccin doivent être présentes lors de l'inoculation des œufs et de la récolte du liquide allantoïdien.
- Les personnes impliquées dans la production de vaccin doivent se laver les mains et les avant-bras avec du savon immédiatement avant d'entrer dans la zone de production de vaccins. Les bagues, montres, etc. doivent être enlevées, et les mains, les ongles et les avant-bras doivent être frottés avec une brosse.
- Des bonnets, robes et masques propres (de préférence stériles) doivent être portés de façon adéquate, avec tous les cheveux, le nez et la bouche couverts. Les blouses doivent être lavées régulièrement.
- Des chaussures ou couvre-chaussures prévus pour la salle de production de vaccin devraient être portés uniquement dans la salle de production de vaccin.
- Des gants chirurgicaux stériles doivent être portés et fréquemment essuyés avec de l'alcool à 70% au cours des procédures.
- Les conversations devraient être réduites au minimum lors de la production de vaccin.
- La surface de travail doit être libre de tout matériel inutile et doit être essuyée avec de l'alcool à 70% avant et pendant la production des vaccins.

Santé et sécurité dans le laboratoire

1. Toujours porter des vêtements de protection adéquats dans le laboratoire y compris des lunettes de sécurité ou une visière si nécessaire. Enlever les vêtements de protection au moment de quitter le laboratoire.
 2. Se laver les mains avant et après avoir travaillé dans le laboratoire, et avant de manger ou de fumer.
 3. Ne pas fumer, ni manger, ni boire dans le laboratoire et ne pas garder des aliments dans les réfrigérateurs ou les congélateurs du laboratoire.
 4. Planifier son travail et travailler de manière ordonnée et logique.
 5. Toujours utiliser une propipette ou une poire à pipeter. Ne jamais pipeter à la bouche.
 6. Etre prudent lors du maniement de verrerie.
 7. Connaître les dangers associés à certaines substances chimiques et utiliser ces substances avec précaution. Traiter tous les produits chimiques et réactifs comme potentiellement dangereux. S'assurer que la fiche signalétique est disponible pour chaque produit chimique utilisé.
 8. Nettoyer tous les produits chimiques et les solutions renversés en utilisant un neutralisant adéquat ou un désinfectant.
 9. Etiqueter toutes les solutions stockées avec le nom de la solution ou du produit chimique, la concentration, la date de préparation, le nom ou les initiales de la personne qui a préparé la solution et les risques éventuels.
 10. Placer toute la verrerie de laboratoire contaminée dans une solution désinfectante immédiatement après usage.
 11. Les déchets de laboratoire doivent être autoclavés, incinérés ou rendus inoffensifs d'une manière ou d'une autre avant d'être éliminés.
 12. Les paillasses et les surfaces de travail doivent être nettoyées et désinfectées avant et après utilisation.
 13. Savoir quoi faire en cas d'incendie: Où sont les sorties? Où doit-on aller une fois sorti de l'immeuble? Comment peut-on donner l'alarme? Où est l'extincteur le plus proche ou la couverture anti-feu?
 14. Savoir à qui s'adresser en cas d'accidents ou de situations d'urgence, et savoir où est située la trousse de premiers soins. Tous les accidents doivent être signalés à l'agent de sécurité.
- Toute la verrerie et le matériel nécessaires pour l'inoculation ou la récolte devraient être placés dans la salle ou la zone de production de vaccins avant le début du travail de la journée.
 - Toutes les bouteilles, autres articles de verrerie, boîtes à pipettes, etc. placés sur la surface de travail devraient être nettoyés avec de l'alcool à 70%.
 - Les équipements et autres appareils utilisés doivent être disposés de manière à être facilement accessibles. Le travail doit être organisé de manière à ne pas avoir besoin de passer les mains par-dessus des matériaux qui pourraient être contaminés.
 - Le pipetage à la bouche n'est pas autorisé; des pipetmans ou poire à pipeter doivent être utilisés. Un tampon de coton doit être inséré dans la partie supérieure de la pipette avant la stérilisation pour maintenir la stérilité de la pipette pendant l'utilisation. Jeter la pipette si le coton est mouillé.

- Si la salle de production est climatisée, s'assurer que le filtre est nettoyé régulièrement et que le climatiseur est entretenu correctement.

Il est important de se rappeler que l'on est la source la plus importante de contamination dans la production de vaccin. Durant une activité normale un adulte perd 10 000 écailles de peau par minute, dont la majorité est contaminée par la microflore cutanée.

2.3.1 Utilisation d'un bec Bunsen

- Régler le régulateur du bec Bunsen de sorte qu'une flamme bleue apparaisse. Il s'agit de la flamme douce utilisée pour le chauffage, mais elle peut être difficile à voir dans une lumière forte. Par conséquent, le bec Bunsen doit être éteint quand il n'est plus utilisé.
- Travailler à proximité du bec Bunsen pour réduire les contaminations par aérosol. Le courant d'air créé par l'air chaud ascendant du bec Bunsen réduit la possibilité de particules tombant de l'air dans un récipient ouvert.
- Lors du retrait d'une pipette de la boîte de pipettes, incliner un peu la boîte avant de retirer le couvercle, de sorte que les pipettes soient proches de l'ouverture de la boîte. Retirer le couvercle et flamber l'extrémité ouverte de la boîte. Secouer la boîte de sorte qu'une pipette dépasse et la retirer. Flamber à nouveau l'extrémité ouverte de la boîte avant de remettre le couvercle. Ceci permettra de minimiser la contamination des pipettes restantes.
- Lors de l'ouverture d'un flacon stérile, d'une bouteille ou d'un tube, flamber rapidement l'ouverture du récipient. Ceci détruira les micro-organismes présents sur la surface extérieure de l'ouverture du récipient. Ceci chauffera également l'air dans le col du récipient, établissant ainsi une circulation d'air dirigé vers l'extérieur et permettra de réduire la probabilité de contamination microbienne.
- Flamber l'ouverture de chaque flacon immédiatement après ouverture et juste avant de replacer le bouchon.
- Les capuchons, couvercles ou bouchons de bouteilles enlevés ne doivent pas être placés sur la paillasse lors du flamage et le prélèvement de liquide. Ils devraient être enlevés et tenus avec le petit doigt d'une main. Cela permettra de minimiser le risque de contamination.

2.3.2 Utilisation d'une enceinte de sécurité biologique

Le virus de la MN est classifié comme un agent pathogène du Groupe 2 et doit être manipulé en utilisant des procédures et pratiques de biosécurité adéquates (OIE 2011d). Une enceinte de sécurité biologique de Classe I, II ou III est recommandée quand il y a un risque de production d'aérosols lors du traitement de grandes quantités de culture ou s'il y a un réel besoin de protéger le produit biologique.

Il existe trois types d'enceintes de sécurité biologique:

- Les enceintes de Classe I sont conçues spécifiquement pour protéger l'opérateur et l'environnement extérieur et ne protègent pas le matériel manipulé.
- Les enceintes de Classe II sont conçues pour protéger l'opérateur, le matériel manipulé et l'environnement.
- Les enceintes de Classe III fournissent le niveau de confinement le plus élevé par la séparation complète du travail et des travailleurs.

Dans une enceinte de sécurité biologique, la surface de travail et l'environnement immédiat sont protégés contre la poussière et la contamination par un flux constant et stable d'air filtré. Les enceintes de sécurité biologique doivent toujours être utilisées en conjonction avec une technique d'asepsie rigoureuse.

Les enceintes de sécurité biologique ne sont pas des hottes et ne doivent pas être utilisées pour manipuler des produits chimiques volatiles ou explosifs.

Les enceintes de sécurité biologique sont équipées d'une lampe UV qui devrait être mise en marche environ 10–20 minutes avant l'utilisation de l'enceinte. Ceci permet de stériliser toutes les surfaces exposées dans l'enceinte. Pour s'assurer que les fissures dans l'enceinte sont stérilisées, il est nécessaire de nettoyer la surface de travail avec de l'alcool ou un autre agent de stérilisation avant et après chaque utilisation. Ne pas mettre les mains ou le visage près de la hotte lorsque la lampe UV est allumée, car l'exposition à la lumière UV peut endommager la peau et les yeux.

- L'enceinte doit être placée dans une zone libre de courants d'air et où le mouvement humain est minimal.
- Si l'enceinte doit être utilisée à plusieurs reprises pendant la journée, il est préférable de lui permettre de fonctionner de façon continue pour s'assurer que la zone de travail reste propre.
- S'assurer que la lampe UV est éteinte avant de commencer le travail dans l'enceinte.
- Ne pas interposer les mains ou autre objet entre un récipient ouvert ou une pipette stérile et le filtre à air.
- Minimiser l'utilisation de flammes nues ou de becs Bunsen dans l'enceinte de sécurité biologique. La chaleur générée par la flamme produit des courants d'air qui peuvent perturber le flux laminaire de l'air.

2.4 Utilisation et entretien de l'équipement de laboratoire

Le matériel de laboratoire est coûteux et doit être entretenu correctement pour s'assurer qu'il fonctionne bien et qu'il dure longtemps.

- Les modes d'emploi devraient être disponibles pour tous les équipements et le personnel du laboratoire devrait suivre une formation sur l'utilisation correcte de l'équipement.
- Des stabilisateurs de tension doivent être montés sur tous les équipements électriques sensibles, par exemple les incubateurs à œufs ou les congélateurs. Ceci aidera à les protéger contre les variations dans l'approvisionnement en électricité.
- Vérifier que tous les équipements sensibles, par exemple les balances électroniques, sont situés dans un endroit approprié (à l'abri du soleil et des courants d'air) et sur une paillasse stable et à niveau.
- Un livre de bord devrait être disponible pour enregistrer «l'historique» de tous les équipements lourds. Les informations telles que l'entretien effectué et les problèmes rencontrés doivent être notées. Une maintenance préventive régulière de l'équipement coûte moins chère qu'un dépannage ou une réparation. Suivre les instructions du fabricant pour le nettoyage et l'entretien.
- Les processus qui dépendent d'équipements tels que les autoclaves, les distributeurs de vaccins et les balances doivent être validés – c'est-à-dire testés pour montrer que l'équipement fonctionne correctement.

- La température des chambres froides ou des grands congélateurs devrait être régulièrement contrôlée et enregistrée, et des procédures doivent être mises en place afin que toute défaillance ou panne soit identifiée, signalée et corrigée sans délai.
- Les équipements tels que les pipettes et les balances électroniques doivent être régulièrement nettoyés et calibrés pour assurer des performances optimales.
- Si un climatiseur est installé dans l'unité de production de vaccin, le filtre doit être nettoyé régulièrement. Le mode d'emploi donnera des instructions sur la façon de démonter et de nettoyer le filtre, et des recommandations sur la fréquence à laquelle cela doit être fait.

2.4.1 Centrifugeuses

Lire le manuel avec les instructions spécifiques au fonctionnement de la centrifugeuse utilisée. En général:

- Toujours utiliser des tubes ou des récipients de taille et de matériau adéquats dans la centrifugeuse. Si nécessaire, utiliser des porte-échantillons ou des coussins dans les 'pots' de la centrifugeuse pour faire en sorte que les tubes soient bien ajustés.
- Utiliser des tubes ou des récipients identiques.
- Ne pas trop remplir les tubes ou les récipients, sinon l'échantillon pourrait déborder lors de la centrifugation.
- Equilibrer chaque paire de tubes ou de récipients. Pour une centrifugation à faible vitesse avec des petits volumes d'échantillons, un pipetage précis peut être suffisant. Pour des volumes plus importants, utiliser une balance pour s'assurer que les tubes ou les récipients qui sont diagonalement opposés ont le même poids.
- Placer les tubes ou les récipients dans la centrifugeuse de sorte que les paires de même poids soient placées les unes en face des autres. Ceci permettra au rotor de la centrifugeuse de tourner uniformément.
- Eteindre la centrifugeuse à tout moment si elle vibre pendant l'utilisation et corriger le problème.

La vitesse de la centrifugeuse (la vitesse de rotation du rotor) est mesurée en tours par minute (r.p.m.). Cependant, une mesure plus correcte de la fonction de la centrifugeuse est la force centrifuge relative (FCR), la force exercée sur le matériel centrifugé. La FCR dépend de la vitesse du rotor et du rayon de rotation, et elle est exprimée par $\times g$, un multiple de l'accélération due à la pesanteur. Pour convertir facilement les r.p.m. à la FCR (ou la FCR aux r.p.m.), utiliser l'échelle de conversion (appelée nomogramme) à l'Annexe 5.

2.4.2 pH mètre

- Le pH-mètre doit être calibré chaque fois qu'il est utilisé, ou bien chaque matin s'il est utilisé toute la journée avec un tampon standard (de pH connu), de préférence d'un pH proche du pH final souhaité. S'il est possible de calibrer le pH-mètre avec deux tampons, le choix du deuxième tampon dépend du pH final souhaité. Par exemple, si le pH final souhaité est de 8.5, les tampons standards utilisés pour l'étalonnage doivent être de 7 et de 10. Si le pH final souhaité est de 5.5, les tampons standards utilisés doivent être de 4 et de 7.
- S'assurer que la solution, dont le pH est mesuré, est à la température ambiante, car le pH peut changer avec un changement de température.

2.4.3 Pipetmans

Les pipetmans sont utilisés pour délivrer des volumes précis de liquide à chaque usage. Les pipetmans peuvent être monocanaux ou multicanaux. Toujours lire les instructions du fabricant avant d'utiliser un pipetman pour la première fois. L'Annexe 4 présente un guide étape par étape sur l'utilisation de pipetmans multicanaux. En général:

- Sélectionner une pipette de la gamme appropriée de volumes.
- Veiller à ce que le cône s'adapte bien à l'embout du pipetman.
- Appuyer fermement sur les cônes en utilisant un léger mouvement de torsion pour s'assurer que les cônes sont bien ajustés.
- **Ne jamais utiliser un pipetman sans cône.**
- Calibrer et nettoyer les pipetmans régulièrement.
- Lors de l'utilisation d'un pipetman multicanaux pour délivrer des liquides, vérifier que les niveaux des liquides sont identiques dans chaque cône.

2.5 Nettoyage, décontamination et disposition des déchets

La connaissance de la sensibilité du virus de la MN à divers produits chimiques et conditions physiques permet l'utilisation de procédures correctes pour le nettoyage et la décontamination des laboratoires, la disposition des déchets et le transport d'échantillons du terrain au laboratoire. Le virus de la MN est facilement détruit par une exposition au formol, à l'alcool, au merthiolate, aux solvants de lipides, à la lumière ultraviolette et au lysol (Allan, Lancaster et Toth 1978). Le virus est très sensible à la plupart des désinfectants (Geering, Forman et Nunn 1995) et il est également inactivé par un pH inférieur à 2 ou supérieur à 11. La chaleur, par exemple 56°C pendant 3 heures ou 60°C pendant 30 minutes, inactivera les souches sauvages du virus de la MN.

2.5.1 Laboratoire

Il est recommandé que la production de vaccin soit effectuée dans des locaux réservés à cet effet. Si toutefois, certaines sections du laboratoire doivent être utilisées à des fins autres que la production du vaccin I-2, par exemple pour le diagnostic, la recherche ou pour la production d'autres vaccins, le laboratoire et tous les équipements doivent être nettoyés et décontaminés avant et après la production de vaccin, en utilisant des procédures validées. Une 'période de repos' devrait être observée entre les cycles de production de différents vaccins.

2.5.2 Equipement et consommables

La verrerie sale ne devrait pas sécher avant d'être nettoyée. Il est recommandé de la faire tremper dans une solution adéquate de stérilisation, par exemple un composé chloré pendant au moins une demi-heure. Une nuit de trempage est préférable. Puis laver la verrerie dans un détergent facile à rincer et non-toxique. Rincer abondamment à l'eau du robinet et à l'eau déionisée ou distillée. Sécher en position inversée (pour permettre l'écoulement d'eau), envelopper de manière adéquate et stériliser.

La méthode de stérilisation dépend du matériel à stériliser. La stérilisation par chaleur sèche est adéquate pour les boîtes de Pétri en verre, les flacons, les pipettes et les objets métalliques. Tous les matériels doivent être enveloppés dans une feuille d'aluminium ou du papier pour assurer le maintien de la stérilité après la stérilisation. Il est important d'espacer les objets à stériliser dans le four de stérilisation pour permettre une bonne circulation d'air. L'air est un bon

conducteur de chaleur et les objets entassés risquent de ne pas être stérilisés correctement. Une fois que le four a atteint la température de stérilisation (160°C), il faut une à deux heures pour une stérilisation complète. La stérilisation commencera une fois que le four aura atteint la température de stérilisation. Il faut toujours permettre une période de refroidissement allant jusqu'à deux heures avant d'ouvrir la porte du four.

La stérilisation par chaleur humide, dans un autoclave ou un autocuiseur (cocotte minute) est plus efficace que la stérilisation par chaleur sèche. Avant l'autoclavage, toute verrerie et matériel divers doivent être enveloppés dans un emballage robuste imperméable à la poussière et aux micro-organismes, mais permettant la pénétration de la vapeur. Le papier d'aluminium, le papier brun ou le papier spécial pour autoclave sont des matériaux d'emballage adéquats. Tous les micro-organismes vivants, y compris les spores bactériennes et fongiques, meurent s'ils sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes (Versleeg 1985).

Dans de nombreux laboratoires, les autocuiseurs sont utilisés pour stériliser le petit matériel et les solutions. Seuls les matériaux pouvant être pénétrés par la vapeur peuvent être stérilisés de cette façon. Il faut toujours s'assurer qu'il y a suffisamment d'eau à l'intérieur de l'autocuiseur et que les matériaux à stériliser sont placés dans un panier maintenu au-dessus de l'eau par un support. Lire les instructions du fabricant pour s'assurer du bon fonctionnement de l'autocuiseur.

De nombreux laboratoires 'recyclent' les objets jetables en plastique tels que les plaques de microtitration. Dans la plupart des cas, il ne sera pas possible de stériliser ces matériaux par la chaleur. Ils doivent être soigneusement décontaminés, nettoyés et séchés. Si une stérilisation est nécessaire, les plaques nettoyées et séchées doivent être stérilisées dans de l'alcool à 70% pendant 30 minutes, puis séchées sous lumière UV. Les compte-gouttes en plastique ou les bouteilles déjà utilisées pour le vaccin doivent être nettoyés, séchés et stérilisés dans de l'alcool à 70% pendant 30 minutes ensuite séchés, puis rincés avec de l'eau distillée stérile ou une solution saline immédiatement avant remplissage.

Des rubans témoins d'autoclavage sensibles à la chaleur sont souvent utilisés pour vérifier que les matériaux stérilisés par autoclave ou par la chaleur sèche ont atteint la température souhaitée. Ces indicateurs ne doivent pas être considérés comme indicateurs de stérilité dans les autoclaves, car ils ne montrent ni la durée pendant laquelle la température a été maintenue au niveau requis, ni si la pression requise a été atteinte. Des intégrateurs émulateurs de stérilité (testés par rapport à des indicateurs biologiques) permettent de surveiller la température, le temps et la qualité de la vapeur et sont très utiles pour la surveillance au jour le jour des processus de stérilisation. Des indicateurs biologiques (bandes ou tubes contenant des spores bactériennes) ou des indicateurs enzymatiques devraient être utilisés pour valider tous les procédés de stérilisation.

De plus amples informations sur les procédés de stérilisation sont disponibles dans Versleeg (1985) et Freshney (1994).

2.5.3 Nettoyage des incubateurs à œufs

Les incubateurs à œufs doivent être nettoyés entre les lots d'œufs pour prévenir les contaminations. Les petits incubateurs d'œufs sont facilement nettoyés et désinfectés à l'aide d'alcool ou d'un désinfectant à large spectre d'activité.

Équipement et matériels

Compresse de gaze ou serviettes

Utiliser un désinfectant, par exemple l'alcool à 70% ou un désinfectant commercial à large spectre d'activité.

Procédure

1. Retirer tous les déchets solides à l'intérieur de l'incubateur et sur les étagères avec un chiffon humide ou de la gaze.
2. Essuyer toutes les surfaces avec un désinfectant ou de l'alcool à 70%.
3. Laisser l'incubateur sécher avant d'y placer des œufs.

2.5.4 Fumigation des incubateurs à œufs et des salles de production du vaccin

Les grands incubateurs à œufs et les pièces utilisés pour la production du vaccin doivent être nettoyés et fumigés régulièrement. Le formaldéhyde gazeux peut être utilisé car c'est un désinfectant peu coûteux, puissant et non corrosif. Il est virucide, bactéricide et fongicide et il est plus efficace sur les surfaces mouillées. Il est vendu sous forme de solution aqueuse à 40% appelée formol. Lorsque le formol est mélangé avec du permanganate de potassium, du formaldéhyde gazeux est libéré. Comme il y a un dégagement de chaleur au cours de cette réaction les produits chimiques doivent être mélangés dans un récipient métallique (et non pas en verre ou en plastique). Le récipient doit être profond et doit mesurer au moins cinq fois le volume du liquide car la réaction provoque de l'ébullition et des éclaboussures (Bermudez 2003).

La fumigation à l'aide de formaldéhyde doit être effectuée sous supervision étroite et uniquement par un personnel expérimenté. Il faut faire preuve de prudence lors de l'utilisation du formaldéhyde. Il est toxique s'il est inhalé, irritant pour les yeux, la peau et le système respiratoire et il peut être cancérigène. Pour une fumigation efficace la zone à fumer devrait pouvoir être scellée.

Consignes de sécurité

Porter des gants lors du maniement et du mélange des produits chimiques.

Porter un respirateur approprié ou un masque.

Placer un signe sur toutes les portes avertissant de l'utilisation de formaldéhyde gazeux.

Travailler toujours avec une deuxième personne pour que de l'aide soit disponible si des problèmes surviennent.

Ajouter toujours le formol au permanganate (et non le permanganate au formol) pour éviter les éclaboussures.

A cause de la chaleur générée lors de la réaction, le récipient de mélange doit être à 2 mètres minimum de matériaux combustibles.

Une fois la fumigation terminée, attendre que les vapeurs se dispersent avant d'entrer dans la salle.

Équipement et matériels

Solution à 40% de formaldéhyde	— 30 ml par mètre cube
Permanganate de potassium (KMnO ₄)	— 20 g par mètre cube
Eau	— 30 ml par mètre cube
Un récipient métallique	— au moins cinq fois le volume de liquide

Procédure

1. Mesurer la longueur et la largeur de la pièce ou de l'incubateur à fumer et estimer la hauteur (en mètres). Laisser la porte de sortie ouverte lors de la préparation et du mélange des produits chimiques.

2. Calculer le volume à fumiger en multipliant la longueur par la largeur par la hauteur. Cela donnera le volume de la pièce ou de l'incubateur en mètres cubes.
3. Calculer le poids de permanganate de potassium et les volumes d'eau et de formol nécessaires en utilisant le tableau ci-dessous:

Volume (m ³)	Formol (ml)	Permanganate de potassium (g)	Eau (ml)
0,5	15	10	15
1,0	30	20	30
2,0	60	40	60
3,0	90	60	90
5,0	150	100	150

4. Peser la quantité de permanganate de potassium requise dans un grand récipient métallique profond, d'au moins cinq fois le volume du liquide nécessaire.
5. Mesurer les volumes nécessaires d'eau et de formol dans un récipient et mélanger. Utiliser un récipient avec un grand bec pour verser rapidement le contenu.
6. Fermer toutes les fenêtres.
7. Verser rapidement, mais en douceur, le formol dilué sur le permanganate de potassium.
8. Quitter rapidement la zone en fermant toutes les portes.
9. Placer un signe d'avertissement sur la porte de sortie et la laisser fermée pendant 24 à 48 heures.

2.5.5 Élimination des déchets

Des poubelles différentes doivent être disponibles pour les différents types de déchets de laboratoire – par exemple le papier, les déchets généraux de laboratoire, le matériel biologique et les objets tranchants. Ces poubelles doivent être clairement étiquetées et la mention «danger» affichée en cas de nécessité. Ensuite le contenu des poubelles doit être éliminé de façon adéquate.

En général, tous les matériaux biologiques tels que les œufs, les cultures bactériennes, le sang et les matériaux contaminés doivent être autoclavés avant leur élimination. Si un autoclave n'est pas disponible, les œufs infectés par le virus I-2 de la MN peuvent être incinérés.

Les seringues, les aiguilles usagées et le verre brisé doivent être placés dans un récipient spécial pour objets tranchants et éliminés en toute sécurité.

2.6 Suivi des stocks, réactifs et consommables

Une bonne planification réduira le gaspillage de ressources précieuses et permettra que les stocks soient disponibles en cas de besoin. Ne pas attendre que le dernier produit ou composante du produit soit utilisé avant de le commander à nouveau sinon la production de vaccin pourrait être retardée.

Tenir à jour la liste de tous les réactifs et les consommables, équipements et les noms des fournisseurs. Inclure la marque et le numéro de catalogue, le certificat d'analyse, la MSDS, l'information sur les conditions de stockage et la qualité requise (par exemple, RA – réactif d'analyse – ou pour culture cellulaire). Cela rendra les commandes plus faciles.

Estimer le nombre de doses de vaccin à produire chaque année ainsi que le format (nombre de doses par flacon) afin que les consommables puissent être commandés et que le vaccin puisse être produit et testé en temps voulu pour répondre à la demande.

Faire régulièrement un inventaire des vaccins en stock (tous les trois à six mois, par exemple). Toutes les informations sur chaque lot de vaccin doivent être inscrites dans un registre des vaccins et le registre doit être rempli chaque fois que le vaccin est préparé ou distribué. Un registre des lots de semence primaire et des stocks de lots de semence de travail devrait également être tenu.

2.7 Tenue des registres

De bons registres sont un élément clé pour une bonne gestion du laboratoire. Ils fournissent une preuve écrite que chaque étape du processus de la production ou de l'expérimentation a été correctement planifiée, suivie et réalisée. Des dossiers bien tenus peuvent aussi aider en cas de problèmes, car ils permettront que l'ensemble du processus soit examiné et la faute identifiée.

Un cahier de laboratoire est la façon la plus simple de tenir un registre des activités du laboratoire au jour le jour. Cela devrait être un cahier à couverture rigide (de préférence A4). Avant de commencer à utiliser le cahier, les numéros de page doivent être écrits de façon lisible sur chaque page (par exemple, dans le coin en haut à droite) et les deux ou trois premières pages devraient être tabulées et utilisées comme indice. Ce cahier de laboratoire doit être rempli chaque fois qu'une activité est terminée. Les normes et informations fréquemment utilisées doivent être écrites dans un endroit bien visible, par exemple à l'intérieur de la couverture au début ou à la fin du cahier. Ces informations peuvent inclure:

- le titre minimum du vaccin I-2 de la MN rendu sur le terrain (10^6 DIE₅₀ par dose: voir 'Titres minimums' à la Section 4.4)
- le titre minimum de production du vaccin I-2 de la MN (10^7 DIE₅₀ par dose: voir 'Titres minimums' à la Section 4.4)

Il est utile également d'ajouter des «pense-bêtes» au cahier de laboratoire. Par exemple, une table des volumes de stabilisant à ajouter au liquide allantoïdien pour stabiliser le vaccin pour la lyophilisation peut être rédigée et consultée chaque fois que le vaccin est préparé.

Toutes les procédures doivent être normalisées et documentées. Lorsque la même technique est utilisée chaque fois que le vaccin est préparé ou qu'un test est effectué, on peut être sûr que le produit sera le même et les résultats pourront être comparés.

- Les procédures devraient être écrites sous la forme de procédure opératoires normalisée (PON). Cela donne, étape par étape, les instructions pour chaque partie de production et contrôle de vaccins et pour toutes les procédures associées (voir annexe 3).
- Il faut lire la PON complètement avant de faire le test, surtout s'il y a un certain temps depuis que le test ou la procédure a été effectué. Ne pas compter sur sa mémoire.
- Tous les calculs et les résultats doivent être enregistrés.
- Des contrôles doivent être inclus dans les tests pour s'assurer que les tests fonctionnent bien.

Des documents et des registres seront probablement aussi exigés par l'autorité d'enregistrement nationale chargée de réglementer la distribution et l'utilisation des médicaments et des vaccins vétérinaires. Ces registres doivent être classés et stockés pour un accès facile. Cela inclut:

- les procédures opératoires normalisées
- le cahier de paillasse – les registres des activités au jour le jour, y compris les données brutes, les calculs et toutes les modifications apportées aux procédures habituelles
- le registre du lot de fabrication – toutes les informations inscrites dans le cahier de paillasse utiles pour un lot particulier du vaccin
- les formulaires pour la mise en circulation des lots – un document de synthèse donnant les détails sur le numéro du lot, la date de production et de la mise en circulation, le nombre de flacons préparés et les résultats des tests pour chaque lot de vaccin, ainsi que la signature du superviseur de la production du vaccin, approuvant la mise en circulation du lot.

Les dossiers de tous les vaccins distribués et des plaintes reçues concernant l'utilisation du vaccin doivent être conservés. Toutes les plaintes devraient être examinées et toutes les mesures prises pour traiter le problème devraient être enregistrées. Un système de rappel des lots de vaccin qui s'avèrent défectueux après leur mise en circulation devrait aussi être mis en place.

3.0

Production du vaccin I-2 de la MN

3.1 Vue d'ensemble de la production du vaccin I-2

Les techniques impliquées dans la production de vaccin I-2 sont relativement simples. Le virus I-2 de la MN est inoculé dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés de poulet à 9 ou 10 jours d'incubation. Le virus infecte les cellules tapissant les parois de la cavité et s'y développe et le liquide allantoïdien est récolté 96 heures après inoculation, lorsque le titre d'infectivité du virus est élevé. Le liquide est ensuite traité pour produire le vaccin I-2. Des tests pour confirmer la sûreté et l'activité du vaccin sont effectués tout au long du processus de production. Un diagramme de la production des vaccins I-2 est illustré à la Figure 3. La Figure 4 reprend le diagramme et montre où chaque procédure peut être trouvée dans ce manuel.

Le vaccin I-2 peut être produit sous forme liquide ou lyophilisée, en fonction de l'équipement et du personnel disponibles. Le vaccin liquide est plus économique à produire que le vaccin lyophilisé, car il ne nécessite pas de matériel coûteux et spécialisé, ni de personnel d'entretien qualifié. En revanche, le vaccin lyophilisé a une durée de vie nettement plus longue. Le Tableau 3 compare les caractéristiques importantes de la production, du stockage et du traitement du vaccin I-2 liquide et lyophilisé.

Tableau 3 Comparaison de la production du vaccin I-2 de la MN liquide et lyophilisé

	Vaccin I-2 liquide	Vaccin I-2 lyophilisé
Formation du personnel	Formation en production à petite échelle du vaccin I-2 et en contrôle de qualité du vaccin recommandée ^a	Formation en production à petite échelle du vaccin I-2 et de contrôle de qualité recommandée ^a ; personnel qualifié nécessaire pour l'utilisation et l'entretien du lyophilisateur
Équipement	Economique à produire – aucun équipement spécialisé nécessaire	Équipement coûteux nécessaire pour lyophiliser le vaccin
Récipients pour le vaccin	Une gamme de récipients sans effet nocif pour le virus peut être utilisée, y compris des récipients en verre et en plastique	Flacons en verre, bouchons et joints sont coûteux et limitent la rentabilité de la production de vaccin à petite échelle
Espace de stockage	Exige un plus grand espace de stockage	Moins d'espace de stockage nécessaire
Temps de stockage à 4°C	Peut être conservé pendant 8 semaines seulement à 4°C sans baisse significative du titre ^b	Peut être conservé pendant plus de 12 mois à 4°C sans baisse significative du titre
Chaîne de froid	Chaîne de froid plus rigoureuse et de grande envergure nécessaire – le vaccin liquide ne peut être stocké que 2 semaines à 28°C ^b au maximum	Chaîne de froid moins rigoureuse et de moindre envergure – le vaccin lyophilisé peut être conservé jusqu'à 8 semaines à 28°C sans baisse significative du titre ^c
Facilité d'utilisation	Prêt à l'emploi – pas de dilution nécessaire sur le terrain	Dilution nécessaire sur le terrain

^a Voir Annexe 13 pour obtenir les coordonnées.

^b Dépend de la dilution et du stabilisateur.

^c Dépend du stabilisateur.

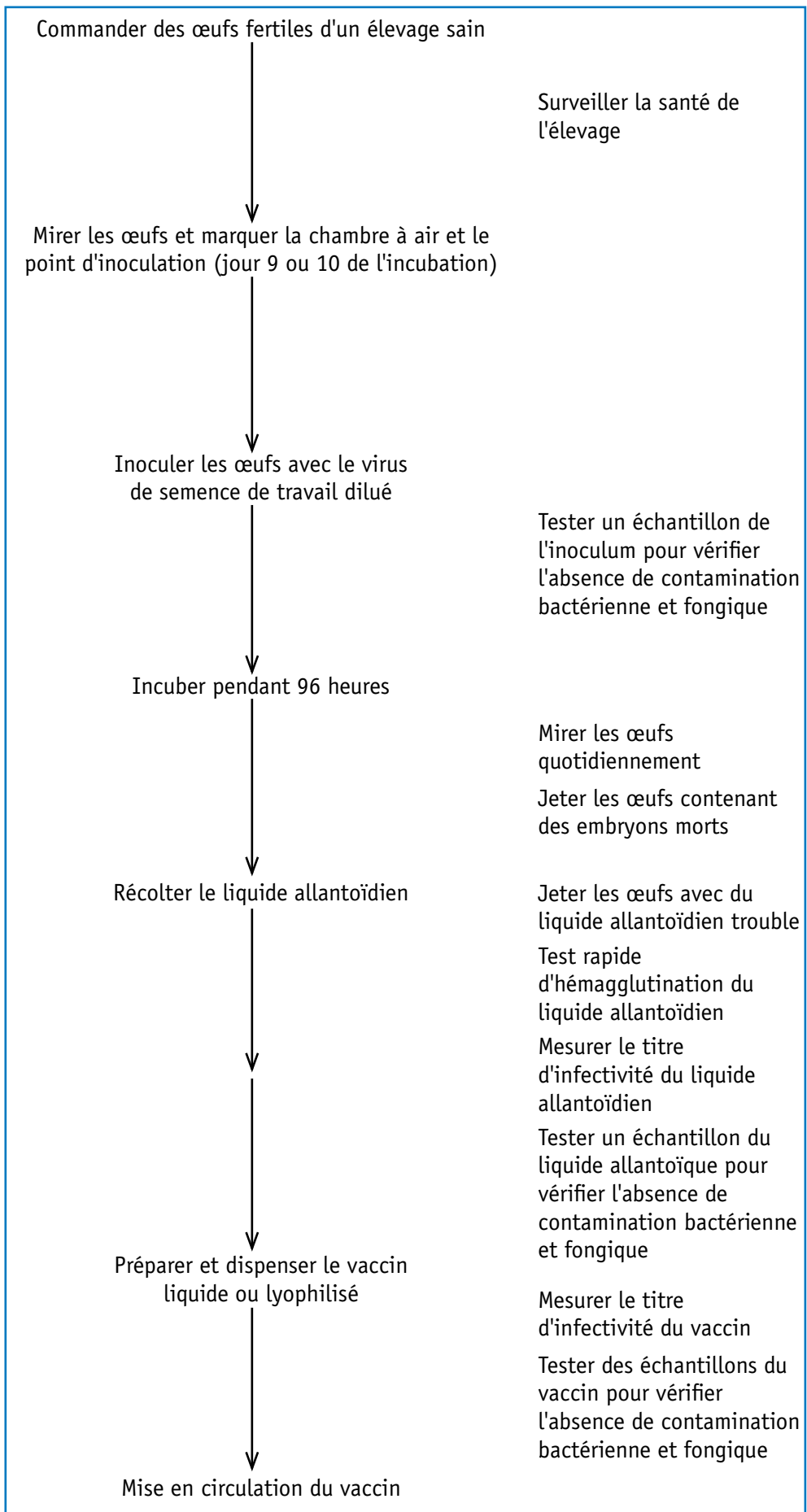


Figure 3: Diagramme de production du vaccin I-2.

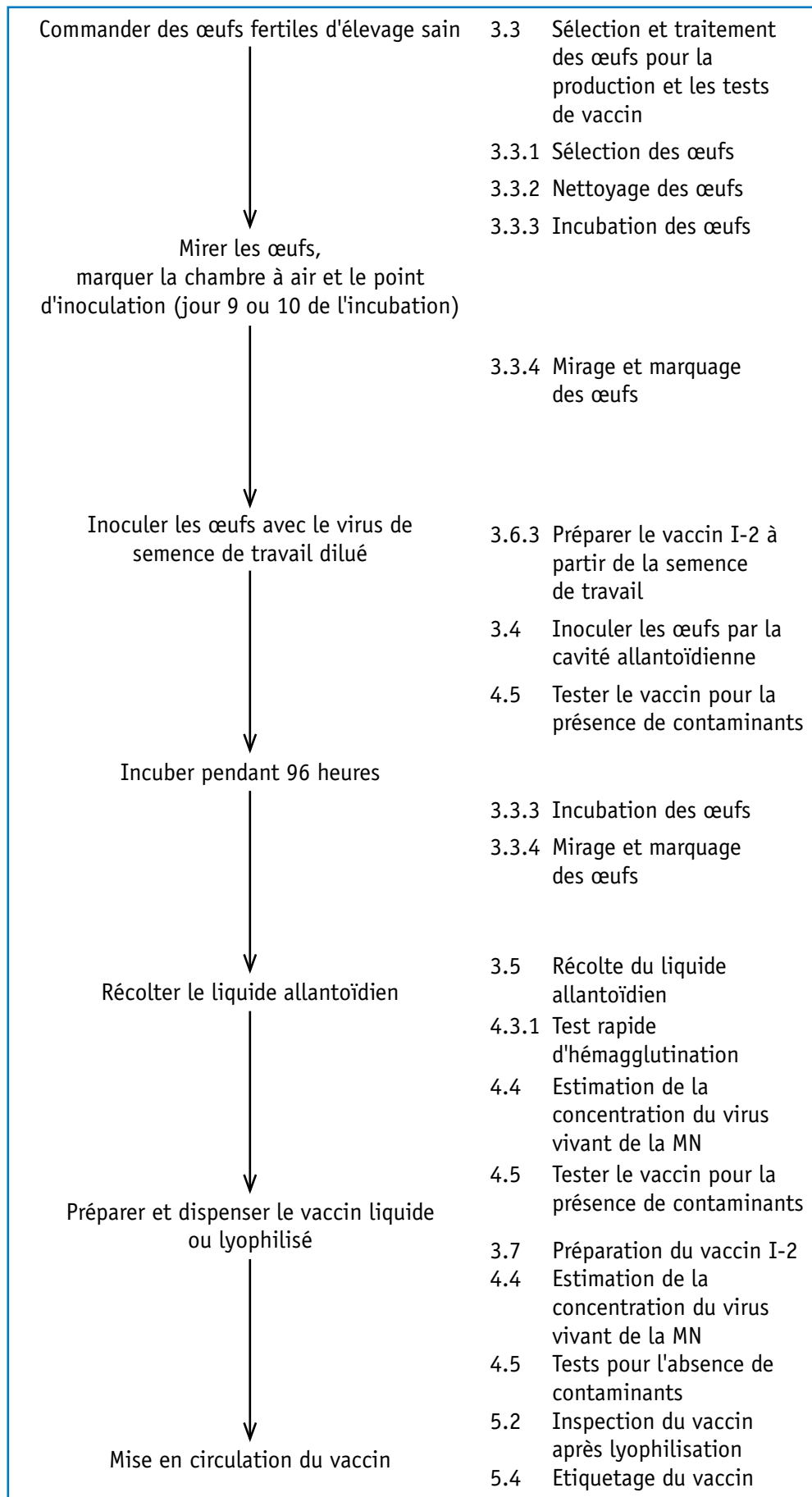


Figure 4: Diagramme de production du vaccin I-2 montrant la place de chaque procédure dans ce manuel.

3.2 Structure de l'œuf embryonné de poule

Les œufs embryonnés de poule ont été utilisés comme des 'usines' de production de vaccins et des systèmes de culture pour l'isolement et la propagation de virus pendant de nombreuses années. L'environnement propice et stérile ainsi que la diversité des types de cellules présentes dans l'embryon et les membranes de soutien le rendent idéal pour la production de vaccin. Le terme 'embryonné' est utilisé pour identifier tout œuf dans lequel un embryon se développe. Les œufs fécondés sont généralement décrits comme des œufs âgés de 9–10 jours. Il s'agit de la durée du temps d'incubation d'un œuf fécondé et non pas du temps écoulé depuis la ponte.

La structure d'un œuf embryonné de 9 à 10 jours d'âge est montrée dans la Figure 5. L'embryon qui se développe est séparé de l'environnement extérieur par la coquille. Les pores de la coquille permettent l'échange d'air et d'humidité entre l'œuf et l'extérieur. Il est important de laisser incuber les œufs dans un environnement humide sinon ils perdent de l'humidité et l'embryon finit par mourir.

La **membrane coquillière** est la fine membrane blanche enveloppant la surface interne de la coquille et qui lui est étroitement attachée. Elle sert de barrière contre les agents pathogènes et permet la diffusion des gaz. Elle forme une chambre à air au bout arrondi de l'œuf.

La **chambre à air** qui se trouve normalement au bout arrondi de l'œuf joue un rôle important dans la respiration et dans les ajustements de la pression à l'intérieur de l'œuf.

La **membrane chorio-allantoïdienne** est la membrane qui se trouve juste à l'intérieur de la membrane coquillière. Elle est attachée à l'embryon et l'entoure ainsi que toutes les autres membranes extra-embryonnaires. Elle est formée entre le quatrième et le dixième jour d'incubation environ par la fusion d'une couche de l'allantoïde et une couche adjacente du chorion. Elle est fortement vascularisée et sert d'organe respiratoire pour l'embryon. Cette membrane renferme une grande cavité: la cavité allantoïdienne.

La **membrane allantoïdienne** est impliquée dans le métabolisme des protéines, et la **cavité allantoïdienne** sert de réservoir pour le stockage des déchets azotés et permet les échanges gazeux entre l'embryon et le milieu environnant. Au jour 7, elle contient environ 1 ml de liquide, augmentant jusqu'à 5–10 ml au jour 13. Le liquide allantoïdien est essentiellement une solution de sel physiologique. Dans les premiers stades de développement, l'embryon excrète de l'urée et dans les étapes ultérieures, de l'acide urique, de sorte qu'à partir d'environ 12 jours, le liquide allantoïdien peut paraître légèrement laiteux à cause de la présence d'urates. Du jour 7 au jour 10, le pH du liquide allantoïdien est de 8,0 et il est de 5,0–6,0 du jour 18 au jour 19.

La **membrane amniotique** renferme l'embryon dans un sac contenant 1–2 ml de liquide amniotique. Elle sécrète et absorbe le liquide amniotique et protège l'embryon contre les dommages physiques. Le liquide amniotique commence à s'accumuler à partir du jour 5 du développement embryonnaire et c'est initialement une solution diluée de sels inorganiques. Il atteint son plus grand volume de 3–4 ml aux alentours du jour 13 quand son contenu en protéines est élevé.

Le rôle principal du **sac vitellin** est de fournir des éléments nutritifs pour le développement de l'embryon. Il a une fonction secondaire importante dans la formation des premiers vaisseaux sanguins et des cellules sanguines. Des anticorps sont présents dans le jaune d'œufs pondus par des poules immunisées et sont absorbés par l'embryon aux alentours du 15^{ème} jour d'incubation (Senne, 1998).

L'**albumen** est riche en protéines et il est essentiel à la croissance de l'embryon. Il est entouré d'un sac et diminuera en volume pendant qu'il augmentera en viscosité au cours du développement de l'embryon grâce au passage de l'eau et de solutés dans le jaune d'œuf.

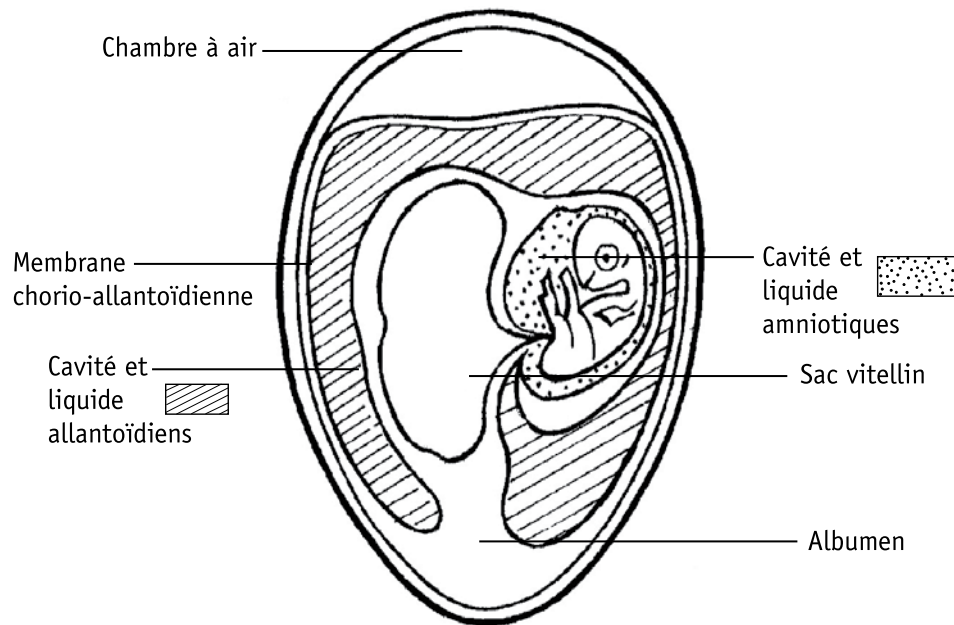


Figure 5: Structure de l'œuf embryonné à 9–10 jours d'incubation.

3.3 Sélection et traitement des œufs pour la production et le contrôle de vaccins

Des œufs fertiles utilisés pour produire le vaccin I-2 doivent être obtenus d'élevages sains.

Lorsqu'il n'y a pas de limites financières, il est préférable d'utiliser des œufs sans agents pathogènes spécifiques (SPF). Ce sont des œufs produits par des élevages gardés dans des conditions de biosécurité strictes et pour lesquels une surveillance microbiologique et sérologique rigoureuse a montré qu'ils sont exempts de tout agent infectieux d'origine aviaire. Toutefois, les œufs SPF sont coûteux à produire ou à acheter, ils sont rarement disponibles et des problèmes de viabilité d'embryons ont été signalés (Allan, Lancaster et Toth 1978).

Dans de nombreux pays les coûts de production de vaccin I-2 seront pris en charge par les utilisateurs du vaccin, c'est à dire les propriétaires de petits élevages de poulets villageois vivant dans les régions rurales. Dans ces cas, il est possible de produire un vaccin de la MN de qualité acceptable dans des œufs provenant d'élevages qui ne sont pas SPF. Alders et al. (2002), Buza et Mwamuhehe (2001), Dias et al. (2001) et Tu (2001) rapportent la production et l'utilisation du vaccin I-2 de la MN à partir d'œufs de haute qualité provenant d'élevages sains, exposés à un minimum de contamination et qui sont régulièrement testés pour les principales maladies de volailles pouvant être transmises par les œufs.

Pour les producteurs locaux de vaccins il est important de comparer les avantages de la vaccination (avec un vaccin de qualité correcte et à coût abordable produit dans des œufs provenant d'élevage exposé à un minimum de contamination), aux risques encourus en cas de foyers de la MN (si les poulets ne sont pas vaccinés à cause du coût prohibitif du vaccin produit sur œufs SPF).

Il est vivement recommandé que les responsables du contrôle de qualité de vaccin, supervisant la fabrication du vaccin I-2 de la MN dans les installations de production à petite échelle, adoptent une démarche de BPF qui inclut une analyse des risques. Ceci facilitera une prise de décision adéquate, basée sur l'identification de problèmes potentiels concernant la qualité des vaccins,

et la mise en place de mesures de contrôle adéquates assurant la production d'un vaccin d'activité acceptable (Young et al. 2009).

Les œufs utilisés pour produire le vaccin devraient provenir d'un seul élevage pour assurer l'uniformité de production et de gestion de l'élevage (cependant une source secondaire d'œufs fertiles de bonne qualité devrait également être identifiée au cas où il y aurait un problème sanitaire ou un problème de production d'œufs chez le fournisseur principal). Il faut tenir des registres contenant l'historique de la vaccination de l'élevage, y compris les vaccins utilisés et leur date d'administration, l'historique de la santé de l'élevage et la production d'œufs de l'élevage, y compris le nombre d'œufs produits et leur taux d'éclosion. Ces registres fournissent des informations sur la 'qualité' des œufs produits.

Pour minimiser le risque de transmission verticale des principaux agents pathogènes aviaires à partir de l'élevage des pondeuses il faut:

- Utiliser des œufs de poules cliniquement saines ayant une ponte normale.
- Faire des tests sérologiques réguliers pour *Mycoplasma* spp. et *Salmonella* spp. (afin de confirmer un titre protecteur si l'élevage est vacciné, ou pour confirmer l'absence de l'agent pathogène dans un élevage non vacciné).
- Un programme de vaccination adéquat doit être en vigueur pour minimiser les risques d'infections dues à *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp., aux virus du syndrome de chute de ponte et de la bronchite infectieuse durant toute la période d'élevage et de ponte.

Les œufs provenant d'élevages vaccinés contre la MN peuvent être utilisés pour la production du vaccin I-2. Les anticorps dirigés contre la MN seront présents dans les jaunes d'œufs provenant de poules immunisées et seront absorbés par l'embryon après le quinzième jour d'incubation (Senne, 1998). Cependant, les anticorps ne seront pas présents dans les liquides allantoïdiens, et le virus I-2 de la MN inoculé dans la cavité allantoïque de ces œufs, au jour 9 ou 10 d'incubation, va croître et atteindre un titre suffisant pour être récolté pour la production du vaccin au 13^{ème} ou 14^{ème} jour. Cependant la présence d'anticorps dans le jaune, affectera la détermination du temps moyen de l'effet létal (MDT). Cette question est examinée plus loin à la Section 6.2.

Il est possible de stocker des œufs fraîchement pondus et fertiles jusqu'à une semaine avant que l'incubation ne soit commencée. L'embryon est en dormance à des températures inférieures à 25°C. Il est préférable de stocker les œufs dans un local frais à 10–16°C avec une humidité relative de 70–80%. Si un local maintenu à cette température n'est pas disponible, les œufs peuvent être stockés dans une salle climatisée ou, à défaut, à température ambiante. Toutefois, certains embryons ne survivront pas dans ces conditions. Ne pas stocker à 4°C.

3.3.1 Choix des œufs

Procédure

1. Inspecter et mirer les œufs.
2. Supprimer les œufs:
 - fissurés ou cassés
 - malformés
 - fortement contaminés par des matières fécales ou de la saleté
 - avec des coquilles fragiles
 - infertiles
 - avec des chambres à air mal placées.

Les œufs qui sont malformés ou qui ont des coquilles rugueuses ou fines sont produits par des poules en mauvaise santé. Ces œufs sont généralement de fécondité plus faible et se cassent facilement.

Procédures Opératoires Normalisées (PON) pour la production et le contrôle de vaccin

La demande en vaccin, les installations et le personnel en place et le choix de production du vaccin liquide ou lyophilisé détermineront la quantité du vaccin I-2 de la MN à produire, l'équipement et le matériel nécessaires. Par conséquent, aucune tentative n'a été faite pour donner une liste détaillée des équipements et du matériel pour chaque procédure décrite dans ce manuel.

Une liste générale des équipements, de la verrerie et des consommables nécessaires pour la production et le contrôle du vaccin I-2 est donnée à l'Annexe 2. En se servant de cette liste, le personnel de chaque unité de production de vaccin doit rédiger des procédures opérationnelles standardisées (PON) adaptées aux besoins de l'unité de production. Par conséquent:

- Lire la procédure.
- Estimer les besoins en verrerie, équipement et consommables.
- Préparer une liste de la verrerie, des équipements et des consommables adaptée aux besoins de l'unité.
- Préparer une PON pour chaque étape de la production et du contrôle de qualité du vaccin.
- Examiner et réviser la PON, une fois que le personnel s'est familiarisé avec la production de vaccin.

3.3.2 Nettoyage des œufs

Il est important de nettoyer les œufs avant de les placer dans l'incubateur car les coquilles peuvent être contaminées par des matières fécales, des plumes ou de la poussière. Ces contaminants peuvent transporter des micro-organismes qui pourraient contaminer le vaccin et être pathogènes pour les poulets.

Essuyer les œufs avec de la gaze imbibée d'alcool à 70%. Les œufs peuvent aussi être trempés dans une solution antiseptique telle que 0,1% de chloramine B (Tu, comm. pers.) ou encore être fumigés.

3.3.3 Incubation des œufs

Le développement de l'embryon de poulet dépend de son environnement. Dans le laboratoire, le technicien peut contrôler l'environnement de l'embryon en régulant la température, l'humidité, la fréquence avec laquelle l'œuf est tourné, l'orientation de l'œuf et l'environnement gazeux. Parmi ces facteurs, le plus critique est la température.

La température optimale pour l'incubation des œufs de poule est de 37,5°C (99°F) de température sèche ou 31,5°C (88°F) de température humide. Les embryons peuvent tolérer des températures plus basses, mais le développement embryonnaire sera plus lent. En revanche, le développement de l'embryon est très sensible aux températures élevées. Les embryons de 1-5 jours d'incubation sont très sensibles à la chaleur et ne survivront pas une exposition à des températures de 40 à 43°C. Les embryons âgés de cinq jours seront tués par des températures de 45-47°C.

Procédure

1. Allumer l'incubateur et le laisser se réchauffer avant l'usage. Les œufs en attente d'inoculation doivent être stockés dans un incubateur clairement marqué et séparés des œufs inoculés.
2. Placer les œufs avec soin sur les étagères de l'incubateur avec le bout arrondi vers le haut. La chambre à air est située à l'extrémité du bout arrondi.
3. Disposer les œufs en rangées, en utilisant, si nécessaire, des morceaux de polystyrène ou du papier pour combler l'écart entre les rangées. Caler les œufs sur les étagères afin qu'ils ne puissent pas rouler pendant l'incubation.
4. Installer les étagères dans l'incubateur.
5. S'assurer que la température de l'incubateur est de 37,5°C et que l'humidité est de 60–65%. Dans certains incubateurs, l'humidité est régulée en plaçant un récipient d'eau au fond de l'incubateur, ou au sommet de l'incubateur à côté de la lampe et du ventilateur. Si les ventilateurs sont installés à l'intérieur de l'incubateur, vérifier qu'ils fonctionnent. Si le chauffage est fourni par des ampoules, vérifier également que celles-ci fonctionnent.
6. Tourner les œufs de 90° aussi souvent que possible (ou toutes les heures si l'incubateur fait tourner les œufs automatiquement). Essayer de tourner les œufs un nombre impair de fois par jour afin qu'ils reposent sur des côtés différents chaque soir. Une fois que les œufs ont été inoculés il n'est plus nécessaire de les tourner.
7. Vérifier chaque jour la température de l'incubateur et son bon fonctionnement.

NOTE:

- Ne pas tourner les œufs une fois qu'ils ont été inoculés.
- Si l'approvisionnement en électricité est interrompu pendant l'incubation et que les embryons se refroidissent, le développement embryonnaire sera affecté.

3.3.4 Mirage et marquage des œufs

Les œufs sont mirés pour vérifier leur fertilité, le développement normal des embryons et leur viabilité. Au cours du mirage une forte lumière, tenue au-dessus ou en-dessous de l'œuf, traverse la coquille et permet de voir son contenu. Le mirage est plus facile dans les œufs dont la coquille est blanche et au bout de 8 ou 9 jours d'incubation.

Pour la production et le contrôle de vaccin, les œufs sont mirés avant l'inoculation, pendant l'incubation et avant la récolte du liquide allantoïdien. Avant l'inoculation, les œufs sont mirés pour s'assurer que les embryons sont vivants et pour que les points de repère, qui agissent comme guide du site d'inoculation de la cavité allantoïdienne, puissent être observés et marqués. Au cours de l'incubation des œufs inoculés, le mirage est fait pour contrôler le développement embryonnaire et la survie.

Il est préférable d'effectuer le mirage dans une pièce chaude et sombre. Une simple lampe de mirage peut être improvisée à partir d'une torche (ou lampe de poche). Dans notre expérience, la méthode décrite ci-dessous a donné les meilleurs résultats:

Procédure

1. Allumer la lampe de mirage.
2. Tenir le bout arrondi de l'œuf contre le bulbe de la lampe de mirage.
3. Tourner l'œuf pour localiser:
 - l'embryon
 - la chambre à air
 - les vaisseaux sanguins
 - le sac vitellin.

Vérifier que l'embryon est de taille adéquate pour la phase d'incubation et qu'il est en bonne santé (un embryon sain se déplace en réponse à la chaleur de la lampe de mirage).

4. Jeter les œufs contenant des embryons morts ou faibles.
5. Choisir un endroit clair loin des principaux vaisseaux sanguins, du sac vitellin et de l'embryon. Marquer le bord de la chambre à air sur la coquille à l'aide d'un crayon.
6. Marquer le site d'inoculation à 2–3 mm au-dessus du bord de la chambre à air.
7. Replacer les œufs dans leurs supports, avec les chambres à air en haut et les retourner dans l'incubateur.
8. Noter le nombre d'embryons vivants chaque fois que les œufs embryonnés sont examinés.

NOTE:

- La lampe de mirage peut être tenue à la main ou fixée sur un statif de laboratoire avec un clip.
- Les œufs à coquilles blanches sont plus faciles à mirer que les œufs à coquilles foncées.
- Si un grand nombre d'œufs doit être miré, ne pas les emmener tous de l'incubateur à la zone de mirage, car ils se refroidiront hors de l'incubateur. En général, les œufs embryonnés de 9 jours d'incubation peuvent tolérer jusqu'à une heure hors de l'incubateur, sans aucun effet sur leur viabilité.
- Les œufs contenant des embryons sains ont une couleur jaune-orangée en raison de la présence de vaisseaux sanguins et de sang. Les vaisseaux sanguins seront facilement visibles et l'embryon doit se déplacer en réponse à la chaleur de la lampe de mirage.
- Dans les œufs contenant des embryons morts, les vaisseaux sanguins seront plus minces ou absents et donc moins faciles à voir.
- Les débutants dans la pratique de mirage pourraient préférer marquer d'autres repères sur la coquille (par exemple, la position des vaisseaux).

3.4 Inoculation des œufs par la cavité allantoïdienne

L'œuf de poulet embryonné fournit un environnement idéal pour le développement de virus. Les souches lentogènes du virus de la MN et les souches non virulentes telles que l'I-2 se développent facilement dans les cellules endodermiques, qui tapissent la cavité allantoïdienne (Nagai et al. 1979). L'inoculation dans la cavité allantoïdienne est assez facile et il est préférable de la faire entre les jours 9 et 12 d'incubation. Après inoculation des œufs embryonnés avec un volume de 0,1 à 0,2 ml et incubation, il est possible de récolter de larges volumes de liquide contenant

le virus. Les œufs sont inoculés par cette voie pour la production du lot de semence de travail du virus I-2 de la MN à partir de la semence primaire, pour la production du vaccin, pour mesurer le titre infectieux du virus et pour l'isolement et la caractérisation du virus de la MN. Pour la production du vaccin I-2, l'inoculation est généralement réalisée à 9 ou 10 jours d'incubation.

L'inoculation doit être effectuée en utilisant une technique aseptique.

Procédure

1. Retirer les œufs de l'incubateur; les installer dans des bacs avec le bout arrondi (chambre à air) vers le haut. Si un grand nombre d'œufs doit être inoculé, ne pas tous les déplacer de l'incubateur à la zone de mirage.
2. Transférer les œufs vers le lieu de mirage. Les garder au chaud (37°C), lorsqu'ils sont hors de l'incubateur.
3. Mirer les œufs pour déterminer leur viabilité et marquer le point d'inoculation à l'aide d'un crayon (voir la Section 3.3.4).
4. Préparer l'inoculum. Pour la production de vaccin, utiliser le lot de semence de travail (voir la Section 3.6.3); pour la préparation de la semence de travail, se servir du lot de semence primaire (voir la Section 3.6.2).
5. Essuyer la surface de l'œuf au point d'inoculation avec un désinfectant. Laisser sécher.
6. Désinfecter l'instrument de perçage avec de l'alcool à 70%.
7. Percer ou poinçonner un petit trou dans la coquille à l'endroit marqué pour l'inoculation. Veiller à ne pas rompre la membrane coquillière.
8. Fixer une aiguille de 25 G × 16 mm sur une seringue de 1 ml et remplir la seringue avec l'inoculum (chaque aiguille et seringue ne doivent être utilisées que pour inoculer 30–60 œufs).
9. Insérer l'aiguille dans le trou percé dans la coquille en penchant la seringue et l'aiguille comme indiqué à la Figure 6. Si une aiguille de 16 mm est utilisée, insérer l'aiguille sur toute sa profondeur. Si une aiguille plus longue est utilisée, insérer seulement 14–16 mm de l'aiguille.
10. Injecter 0,1 ml d'inoculum dans chaque œuf.
11. Sceller le site de l'injection sur la coquille (voir ci-dessous les diverses options).
12. Placer les œufs inoculés dans l'incubateur et incuber entre 37°C et 37,5°C et 60% et 65% d'humidité pendant 96 heures. L'incubateur doit être clairement marqué 'œufs inoculés I-2' et séparé de l'incubateur utilisé pour les œufs avant inoculation (si un seul incubateur est disponible, il doit être nettoyé avec un désinfectant, frotté avec de l'alcool et séché avant d'y placer des œufs inoculés pour incubation).
13. Vérifier que l'inoculum restant ne contient aucun contaminant bactérien et fongique.
14. Mirer les œufs toutes les 24 heures et examiner la viabilité de l'embryon. Jeter les œufs contenant des embryons morts dans les premières 24 heures. Si la mortalité embryonnaire a lieu après 24 heures dans les œufs inoculés avec le virus I-2 de la MN, les œufs doivent être testés pour une contamination bactérienne.
15. Enregistrer le nombre d'embryons viables à chaque examen.

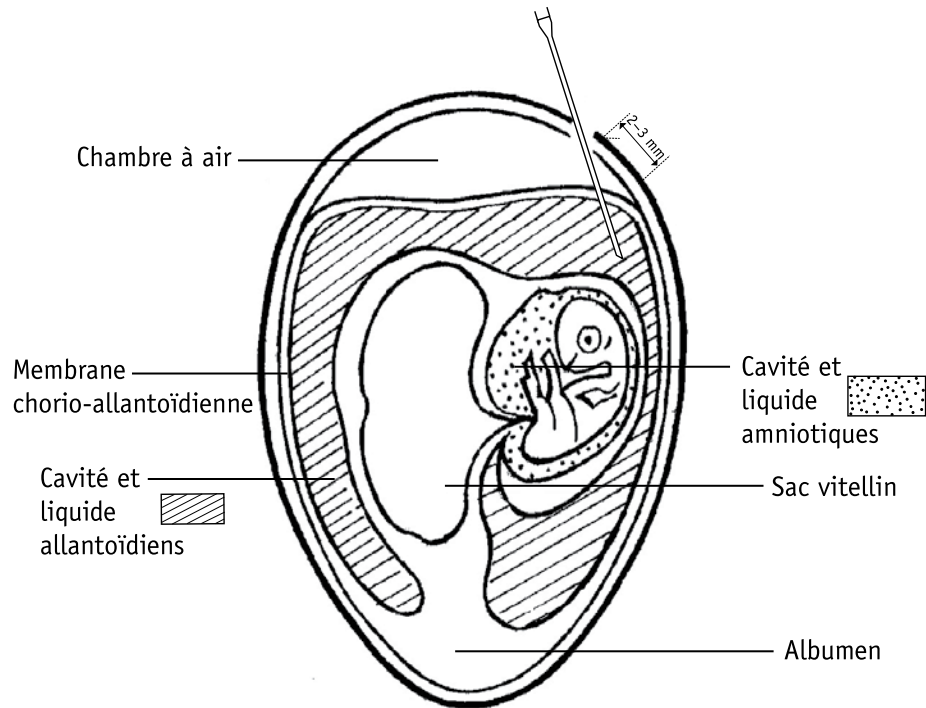


Figure 6: œuf embryonné de 9 jours, montrant la position de l'aiguille lors de l'inoculation dans la cavité allantoïdienne.

NOTE:

- Pour faire un trou dans la coquille on peut utiliser une aiguille montée sur un bouchon en caoutchouc, en laissant environ 1 mm du bout de l'aiguille exposé, un morceau de cuivre courbé pour épouser la forme d'un œuf avec une pointe centrale dépassant d'un mm, une fraise de dentiste ou un foret aiguisé.
- Pour l'inoculation, les aiguilles stériles jetables de 25 G x 16 mm (5/8") sont préférables. Se servir de la même seringue avec la même aiguille pour 30-60 œufs.
- Les œufs peuvent être scellés avec une bande adhésive, de la cire à bougie fondue, du collodion flexible (BDH No. de catalogue 33041), ou un mélange constitué de deux volumes de paraffine solide (point de fusion environ 54°C) et un volume de gelée de pétrole (vaseline). Manipuler avec soin le collodion flexible car il est extrêmement inflammable. Ne pas respirer les vapeurs. Si un mélange de paraffine/vaseline est utilisé, le garder fondu sur une plaque chauffante électrique (60°C) et l'appliquer sur les œufs à l'aide d'une courte pipette en verre avec une poire de prélèvement en caoutchouc ou un coton-tige.
- Jeter les embryons qui meurent dans les premières 24 heures. Il s'agit généralement de mortalités non-spécifiques causées par des blessures. Dans les œufs inoculés par un opérateur expérimenté, jusqu'à 2% de mortalité est considéré comme normal.
- Les causes les plus courantes de mortalité embryonnaire incluent (1) les embryons de faible viabilité, (2) une hémorragie due à une mauvaise technique de mirage et d'inoculation et (3) la contamination bactérienne.
- Si plus de 2% des embryons inoculés avec le virus I-2 de la MN sont morts, surtout après les premières 24 heures suivant l'inoculation, tester pour rechercher la contamination bactérienne et fongique.

- Jusqu'à un maximum de 148 heures, le virus I-2 de la MN inoculé dans la cavité allantoïdienne n'a pas d'effet nocif sur les embryons – ce qui est un temps bien supérieur aux 96 heures requises pour la production de vaccins.

3.5 Récolte du liquide allantoïdien

Pour la production de vaccin, le liquide allantoïdien d'œufs infectés avec le virus I-2 de la MN est récolté 96 heures après inoculation lorsque le titre infectieux du virus est élevé. D'habitude 6 à 10 ml de liquide allantoïdien peuvent être alors récoltés à partir de chaque œuf (Senne, 1998). Le liquide allantoïdien destiné à la production de vaccin doit être récolté uniquement à partir d'œufs avec présence d'hémagglutinine, détectable par le test d'hémagglutination. Ne pas récolter à partir d'œufs contenant du liquide allantoïdien décoloré ou des embryons morts.

Le liquide allantoïdien est aussi prélevé et testé pour la présence du virus de la MN lors des tentatives d'isolement du virus ou lorsque le vaccin, ou un échantillon du virus est titré.

La récolte doit être effectuée en utilisant une technique aseptique.

Procédure

1. Retirer les œufs de l'incubateur. Mirer pour déterminer la viabilité des embryons.
2. Si le liquide allantoïdien est destiné à la production du vaccin I-2 de la MN, jeter les œufs contenant des embryons morts.
3. Placer les œufs dans le réfrigérateur à 4°C pendant au moins 4 heures. Cela tuera les embryons et détachera les membranes de la coquille. Cela coagulera également le sang. La présence de globules rouges dans les liquides allantoïdiens peut réduire le titre du virus de manière importante (Senne 1998).
4. Retirer les œufs du réfrigérateur.
5. Tamponner la surface des œufs autour du site d'inoculation avec du désinfectant. Laisser sécher.
6. Couper et casser la coquille autour du site d'inoculation pour exposer les membranes coquillières. Utiliser un emporte-pièce, un cautère ou des ciseaux chirurgicaux. La coquille doit être enlevée jusqu'à 5 ou 10 mm de la base de la chambre à air.
7. Retirer la coquille à l'aide de pinces stériles et exposer les membranes. Placer la pince dans de l'alcool et la flamber entre chaque utilisation.
8. Inspecter chaque œuf avant de récolter le liquide allantoïdien. Jeter les œufs qui ont des contenus sombres et décolorés, ou un liquide allantoïdien décoloré.
9. Retirer une seule goutte de liquide allantoïdien de chaque œuf à travers un petit trou percé dans la membrane. Pour chaque œuf, utiliser une nouvelle pipette stérile en verre ou en plastique.
10. Effectuer le test d'hémagglutination pour confirmer la présence du virus de la MN (voir Section 4.3).
11. Jeter les œufs avec absence d'hémagglutination.

NOTE:

- Si la récolte des liquides allantoïdiens est faite pour la production de vaccin, laisser les œufs atteindre la température ambiante. La condensation qui se forme sur la coquille d'œufs sortant du réfrigérateur peut être une cause de contamination pour le liquide allantoïdien qui va être récolté.

- Le liquide allantoïdien de certains œufs normaux peut paraître légèrement laiteux. Cela est dû à la présence d'urates qui s'accumulent autour du 12^{ème} jour d'incubation. Il est important de distinguer les liquides laiteux normaux des liquides décolorés à cause d'une contamination bactérienne.

3.6 Lots de semence de vaccin

Le virus I-2 de la MN de semence primaire a été préparé à partir de la souche I-2, une souche avirulente d'origine australienne (voir section 1.4). La sélection du virus I-2 de la MN comme lot de semence primaire approprié a comporté un certain nombre d'étapes:

1. des tests sur 45 isolats pour leur antigénicité, leur sécurité et leur capacité à se propager
2. des tests sur 18 isolats sélectionnés pour leur thermotolérance
3. le traitement thermique de la souche virale I-2
4. la culture de la souche thermotolérante du virus I-2 dans des œufs provenant d'un élevage exposé à un minimum de contamination
5. des tests de sécurité et d'absence de contamination bactérienne, virale et fongique
6. la préparation de la semence de travail
7. la préparation et le contrôle du vaccin produit à partir de la semence de travail.

Les lots de semence primaire d'ACIAR I-2 de la MN contenant le virus thermotolérant, avirulent, antigénique de I-2 de la MN sont fournis sous forme lyophilisée, dans une ampoule en verre, aux laboratoires souhaitant produire le vaccin I-2. Afin de préserver l'infektivité de la semence primaire, il est préférable de la conserver à -70°C. Si possible stocker la semence primaire dans plusieurs congélateurs afin que les stocks ne soient pas perdus en cas de panne d'équipement ou en cas de coupure d'électricité. Dans la mesure du possible, ces congélateurs doivent avoir des sources d'électricité différentes et des générateurs de secours distincts.

Le vaccin I-2 de la MN est produit à partir du lot parental de semence primaire I-2 de la MN en utilisant le système de lot de semences. Ce processus est schématisé à la Figure 7. Le lot de semence primaire I-2 de la MN est reconstitué dans du PBS et une petite quantité de la suspension du lot de semence primaire I-2 de la MN est inoculée dans des œufs embryonnés. Le liquide allantoïdien de ces œufs est récolté après 96 heures d'incubation, et est utilisé pour préparer le lot de semence de travail I-2 de la MN. Un grand nombre d'aliqots du lot de semence de travail peut être produit à partir d'une ampoule du lot de semence primaire. Lors de la préparation d'un lot de vaccin, un aliqot du lot de semence de travail du virus I-2 de la MN est dilué et une petite quantité de la suspension est inoculée dans des œufs embryonnés. Le liquide allantoïdien de ces œufs est récolté pour produire le vaccin I-2 de la MN. Ainsi à partir d'un seul aliqot du lot de semence de travail du virus I-2 de la MN, un seul lot de vaccin I-2 de la MN, lui-même composé de doses multiples, est produit.

En utilisant le système de lots de semences, le nombre de passages sur œufs, depuis le lot de semence primaire parental du virus I-2 de la MN jusqu'à la production du vaccin du virus I-2, est réduit à un minimum. Cela préserve une uniformité et une cohérence dans la production (OIE 2011c) et diminue la possibilité de modifications génétiques du virus I-2 qui pourraient conduire à des changements dans la thermotolérance, la virulence, l'antigénicité et le rendement

des vaccins. Lorsque le vaccin est préparé de la manière décrite ci-dessus, il est seulement à deux passages du lot de semence primaire du stock parental du virus I-2 de la MN.

Le lot de semence primaire du virus I-2 de la MN doit être accompagné d'une fiche donnant des informations sur la semence primaire, le titre infectieux au moment de l'expédition, et les instructions d'utilisation basées sur les procédures décrites dans les sections 3.6.1 et 3.6.2. Le lot de semence primaire est une ressource précieuse, et le personnel de laboratoire pourra modifier ces procédures pour maximiser l'utilisation de la semence du virus I-2 de la MN une fois qu'il aura acquis plus d'expérience dans les techniques de production de vaccin.

Système de lot de semences

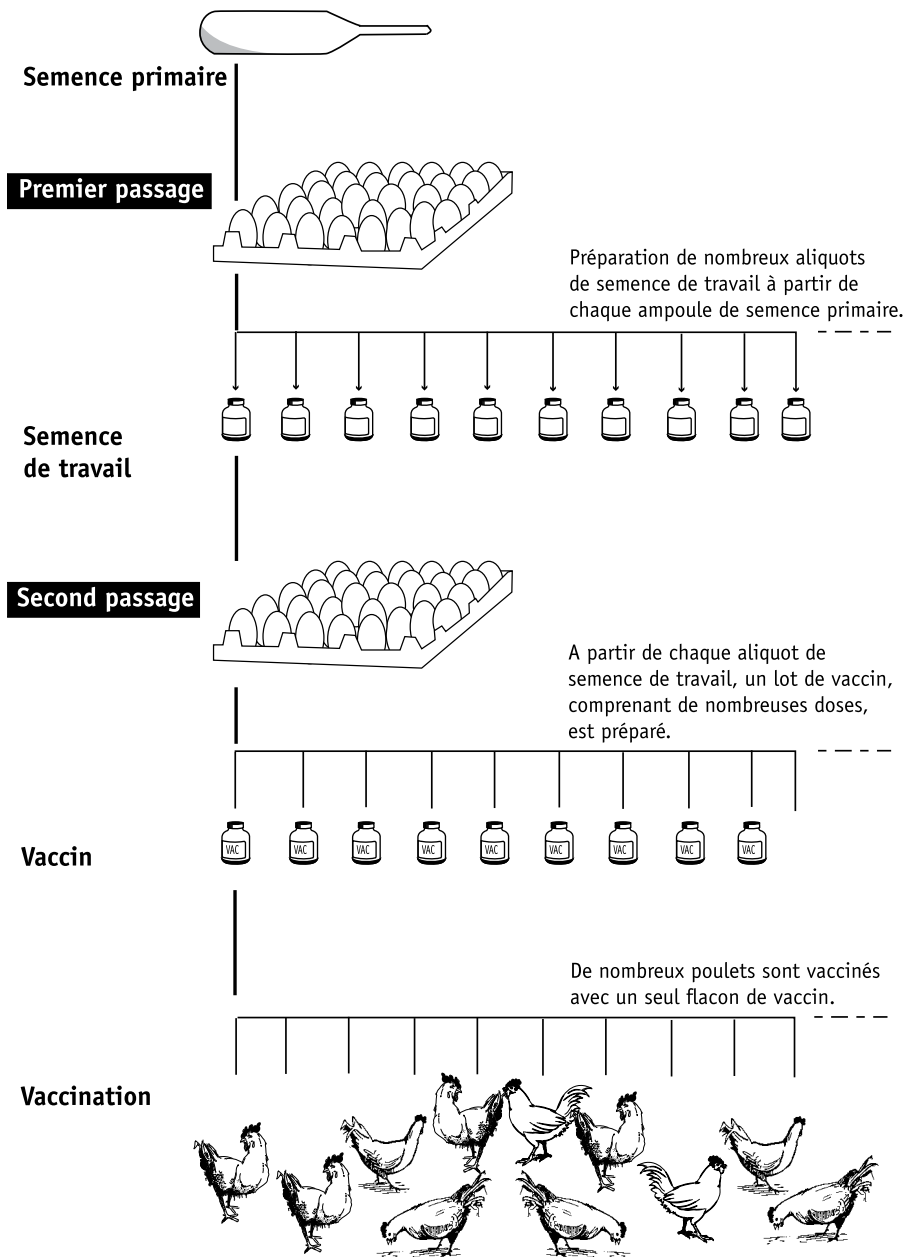


Figure 7: Système de lot de semence du vaccin.

3.6.1 Dilution du lot de semence primaire du vaccin I-2

Toutes les procédures doivent être effectuées en utilisant une technique aseptique.

Procédure

1. Tamponner l'extérieur de l'ampoule du lot de semence primaire du virus I-2 de la MN avec de l'alcool à 70%.
2. Ouvrir l'ampoule avec précaution et ajouter 1 ml d'eau distillée stérile au contenu. Bien mélanger.
3. Aspirer le contenu de l'ampoule et le placer dans un tube stérile ou un petit erlenmeyer. Ajouter 19 ml de PBS stérile. Bien mélanger.
4. Faire des aliquots de 1 ou 2 ml à partir du lot de semence primaire dilué dans des bouteilles ou des cryotubes stériles, avec des bouchons à vis. Sceller et étiqueter chaque aliquot.
5. Placer les aliquots en position verticale dans une boîte étiquetée ou autre récipient et conserver dans un congélateur à -70 ° C.
6. Titrer un aliquot du lot de semence primaire du virus I-2 de la MN (voir la Section 4.4). Récolter les liquides à partir d'œufs positifs au test d'hémagglutination, aliquoter et stocker sous forme de lot de semence de travail du vaccin I-2 de la MN.
7. Étiqueter les aliquots avec la date de production du lot de semence de travail et en inscrivant 'semence de travail du vaccin I-2 de la MN' sur l'étiquette.

NOTE:

- Le titre du lot de semence primaire du virus I-2 de la MN doit être mesuré peu après son arrivée au laboratoire pour confirmer que le lot de semence primaire a été gardé dans des conditions satisfaisantes durant le transport et le stockage. Cette information doit être enregistrée dans le fichier des semences primaires de I-2 de la MN, ainsi que toutes les autres informations, telles que la date de réception, les conditions de stockage, l'historique des passages et la date et résultats de la production de semence de travail I-2 de la MN. Cette information sera requise par l'autorité d'enregistrement nationale.
- A titre de précaution contre les pannes d'équipement ou les pannes d'électricité, stocker quelques aliquots du lot de semence primaire et du lot de semence de travail dans le congélateur d'une autre institution (par exemple le laboratoire de recherche médicale). S'assurer que ce congélateur est connecté à un groupe électrogène ou un générateur de secours en bon état de marche.
- Les cycles fréquents et lents de congélation/décongélation sont nuisibles aux suspensions virales. Décongeler les aliquots rapidement et ne pas recongeler les aliquots inutilisés.
- Les stocks de semences virales peuvent être codés par des couleurs afin de faciliter leur identification. Par exemple, le lot de semence primaire I-2 de la MN pourrait être identifié par une étiquette bleue, et le lot de semence de travail I-2 pourrait être identifié par une étiquette verte.

3.6.2 Préparation de la semence de travail du vaccin I-2

Toutes les procédures doivent être effectuées en utilisant une technique aseptique.

Procédure

1. Décongeler un aliquot de la semence primaire du vaccin I-2 de la MN. Tamponner l'extérieur du flacon avec de l'alcool à 70%.

2. Calculer le volume d'inoculum nécessaire. Par exemple:
30 œufs × 0,1 ml par œuf = 3 ml d'inoculum
3. Diluer le lot de semence primaire du vaccin I-2 de la MN dans le volume calculé de PBS. Bien mélanger.
4. Inoculer 0,1 ml du lot de semence primaire du vaccin I-2 de la MN dilué dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés de 9–10 jours d'âge.
5. Mirer les œufs chaque jour. Jeter les œufs contenant des embryons morts.
6. Récolter le liquide allantoïdien 96 heures plus tard. Tester le liquide allantoïdien de chaque œuf en utilisant le test d'hémagglutination pour déterminer la présence de virus (voir la Section 4.3 pour la procédure).
7. Mélanger tous les liquides allantoïdiens récoltés et les aliquoter. Étiqueter tous les aliquots et les placer dans une boîte étiquetée ou tout autre récipient. Congeler à -70°C si possible. Ces aliquots sont le lot de semence de travail du vaccin I-2 de la MN.

NOTE:

Des antibiotiques peuvent être ajoutés au PBS utilisé pour diluer le lot de semence primaire du vaccin I-2 de la MN une fois décongelé.

Chaque laboratoire doit déterminer le volume de l'aliquot de semence de travail à répartir. Les grandes unités, produisant le vaccin I-2 de la MN à grande échelle, pourraient répartir des aliquots de 1 ml, alors que les petites unités de production auront une préférence pour des aliquots de 0,5 ml.

Il est conseillé de produire la semence de travail dans des œufs SPF s'ils sont disponibles. Dans la mesure du possible, la semence de travail devrait également être confirmée exempte d'agents bactériens et fongiques, et de virus étrangers.

3.6.3 Préparation du vaccin I-2 à partir de la semence de travail

Toutes les procédures doivent être effectuées en utilisant une technique aseptique.

Procédure

1. Décongeler un aliquot de la semence de travail du virus I-2 de la MN. Tamponner l'extérieur du flacon avec de l'alcool à 70%.
2. Préparer des dilutions de 10^{-1} et de 10^{-2} de la semence de travail du virus dans du PBS stérile.
3. Calculer le volume d'inoculum nécessaire. Par exemple:
300 œufs × 0,1 ml par œuf = 30 ml d'inoculum
4. Diluer au dixième la dilution 10^{-2} du lot de semence de travail de façon à obtenir une dilution finale de 10^{-3} . Par exemple, pour 300 œufs, ajouter 3 ml d'une dilution de 10^{-2} de semence de travail dans 27 ml de PBS stérile contenant des antibiotiques.
5. Inoculer 0,1 ml de la semence de travail diluée à 10^{-3} dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés.
6. Mirer les œufs chaque jour et jeter ceux contenant des embryons morts.
7. Récolter le liquide allantoïdien 96 heures plus tard. Tester le liquide allantoïdien par le test rapide d'hémagglutination pour déterminer la présence du virus.

NOTE:

- Des antibiotiques peuvent être ajoutés au PBS utilisé pour diluer le lot de semence de travail décongelé.

- Si un nombre limité d'œufs est utilisé pour la production de vaccin, ou lorsque les techniciens sont en cours de formation, ou lorsque des contrôles sur les techniques de l'opérateur sont nécessaires, les liquides allantoïdiens de tous les œufs doivent être testés à l'étape 7.
- Les opérateurs expérimentés qui traitent un grand nombre d'œufs pour la production de vaccins peuvent préférer prendre un échantillon aléatoire d'œufs de chaque plateau (10% est recommandé) pour des tests du liquide allantoïdien. Cela permettra d'économiser du temps et de minimiser la durée pendant laquelle les œufs sont exposés à l'environnement avant la récolte du liquide allantoïdien.

Dose optimale des cultures de semence du vaccin de la MN

Le lot de semence du virus I-2 de la MN est une ressource précieuse et des moyens doivent être trouvés pour maximiser son utilisation. Pour déterminer la dose minimale de semence de travail du vaccin I-2 de la MN qui doit être inoculée dans les œufs pour produire un vaccin de titre acceptable, des essais ont été entrepris au Laboratoire de Virologie John Francis, à l'Université du Queensland. Des dilutions au 10^{ème} du lot de semence de travail ont été faites et des doses de virus de 10¹ à 10⁵ DIE₅₀ ont été inoculées dans des œufs embryonnés de poule. Le liquide allantoïdien a été récolté et le titre infectieux de chaque dilution a été déterminé. Ce travail a montré qu'il est possible d'inoculer des œufs avec 10¹ DIE₅₀ du lot de semence de travail du virus et d'obtenir un vaccin de titre acceptable. Toutefois, pour s'assurer que chaque œuf inoculé produit du virus, une dose plus élevée de 10³ DIE₅₀ par œuf (10⁴ DIE₅₀/ml) est recommandée.

3.7 Préparation du vaccin I-2

Le vaccin I-2 de la MN peut être produit sous forme liquide ou lyophilisée. Un élément essentiel pour les deux formes du vaccin est le stabilisateur ajouté pour préserver l'infectivité pendant le stockage. De nombreux stabilisants ont été testés et les deux les plus efficaces sont la gélatine (à une concentration finale de 0,5% à 1% dans le vaccin liquide) et le lait écrémé (à une concentration finale de 5 à 10% dans le vaccin lyophilisé) (Allan, Lancaster et Toth 1978; Bensink et Spradbrow 1999). Un certain nombre de publications récentes décrivent les recherches sur les stabilisants de remplacement et les méthodes de formulation du vaccin I-2 de la MN (Wambura 2009a, 2009b, 2011).

Toutes les procédures doivent être effectuées en utilisant une technique aseptique.

A. Vaccin lyophilisé

Procédure

1. Récolter le liquide allantoïdien des œufs en utilisant une seringue de 20 ml et une aiguille (longueur de 13–16 G) ou une pompe à vide et une aiguille (ou une pipette Pasteur stérile en verre). On peut utiliser une spatule stérile, une petite cuillère ou une pince pour abaisser l'embryon et le sac vitellin pendant l'aspiration du liquide allantoïdien.
2. Verser le liquide allantoïdien dans des bouteilles stériles ou des tubes à centrifuger adéquats qui ont été refroidis pendant plusieurs heures à -20°C dans un congélateur domestique.

3. Placer les bouteilles ou les tubes dans des pots à centrifuger et équilibrer les pots. Placer les pots à centrifuger dans une centrifugeuse (de préférence réfrigérée à 4°C) et centrifuger à 1000–1500 × *g* pendant 15 minutes pour éliminer les cellules et autres solides.
4. Retirer les bouteilles ou les tubes de la centrifugeuse. Verser le surnageant dans une éprouvette graduée propre et stérile ou des tubes à centrifuger stériles. Mesurer et noter le volume de liquide allantoïdien récolté (si un grand volume de liquide allantoïdien a été récolté, verser le liquide dans des bouteilles stériles avec des bouchons à vis).
5. Prélever des échantillons du vaccin pour le titrage de l'infectivité (voir la Section 4.4) et les tests des contaminants bactériens et fongiques (voir Section 4.5).
6. Placer le liquide allantoïdien dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à ce que les résultats des tests préliminaires aient été reçus. Préparer le stabilisateur.
7. Ajouter le stabilisateur (si du lait écrémé est utilisé, passer à l'étape 6.1 de la page 45).
8. Répartir le vaccin dans des flacons de vaccin stériles en verre en utilisant une seringue automatique ou un distributeur. Dans notre expérience, la dose de 2,5 ml est idéale pour les flacons à 250 doses.
9. En utilisant des pinces stériles, mettre les bouchons en caoutchouc sur les flacons sans trop les enfoncer pour permettre l'évacuation de l'humidité pendant la lyophilisation. Ne pas insérer à fond les bouchons dans les flacons.
10. Après la lyophilisation, recueillir un certain nombre de flacons pour les tests de stérilité et pour le titrage d'infectivité. Ce nombre est déterminé par le nombre de flacons de vaccin produit (voir section 4.5).

Si du lait écrémé dilué dans du PBS est utilisé comme stabilisateur:

- 6.1 Calculer le volume de lait écrémé stérile nécessaire.
- 6.2 Mesurer le lait écrémé stérile dans un flacon stérile en verre.
- 6.3 Sortir le flacon contenant le liquide allantoïdien du réfrigérateur et le placer dans un plateau en métal stérile. Mettre de la glace autour du flacon et placer le plateau sur un agitateur magnétique. Placer un barreau agitateur magnétique stérile délicatement dans le flacon.
- 6.4 Ajouter délicatement le lait écrémé au liquide allantoïdien.
- 6.5 Allumer l'agitateur magnétique et remuer doucement pendant 30 minutes.
- 6.6 Continuer à l'étape 8 de la page 44.

NOTE:

- Toujours vérifier la stérilité de la solution de stabilisation avant qu'elle ne soit ajoutée au liquide allantoïdien.
- En règle générale, un volume de liquide allantoïdien est mélangé avec un volume de la solution stérile de stabilisation.

Les antibiotiques dans la production de vaccin

Les antibiotiques ne doivent pas être utilisés régulièrement pour compenser une technique aseptique médiocre lors de la production de vaccin. Ils sont chers, parfois difficiles à obtenir et s'ajoutent au coût de la production du vaccin. En plus, de nombreuses autorités d'enregistrement encouragent la réduction de l'utilisation d'antibiotiques comme agents de conservation dans les vaccins, n'approuvant l'addition au diluant du vaccin que des antibiotiques spécifiques à des concentrations bien déterminées pour les protéger contre la contamination lors de leur utilisation.

Puisque le vaccin lyophilisé peut être dilué sur le terrain à l'aide d'eau potable non-stérile et qu'il est parfois utilisé pendant deux jours, des antibiotiques peuvent être ajoutés pour empêcher la contamination durant son utilisation. Le vaccin liquide bénéficiera également de l'inclusion de concentrations adéquates d'antibiotiques spécifiques.

Une information complémentaire est présentée à l'Annexe 6.

B. Vaccin liquide

Pour préparer le vaccin liquide I-2 de la MN, une dilution avec 1–2% de gélatine ou 4% de lait écrémé dans du PBS est recommandée. Un volume de liquide allantoïdien mélangé avec un volume de diluant stérile (pour donner une concentration finale de 0,5 à 1% de gélatine ou de 2% de lait écrémé) donne de bons résultats.

Procédure

Suivre la procédure de la production du vaccin lyophilisé décrite de l'étape 1 à l'étape 7.

8. Répartir le vaccin dans des flacons stériles – par exemple, des compte-gouttes en plastique à usage unique avec un sceau inviolable.
9. Prélever un nombre suffisant de conteneurs pour les tests de stérilité et pour le titrage d'injectivité.

NOTE:

- Le liquide allantoïdien qui a été recueilli et centrifugé peut également être filtré. En utilisant un entonnoir stérile en acier inoxydable, filtrer le liquide allantoïdien à travers quatre couches de gaze stérile, dans une grande éprouvette graduée.
- Le titre prévu du liquide allantoïdien, immédiatement après la récolte, est d'environ $10^{9,5}$ DIE₅₀/ml. Le but est de produire un vaccin avec un titre minimum de production de 10^7 DIE₅₀ par dose (voir Section 4.4) pour compenser la réduction du titre lors du stockage, du transport et de l'utilisation du vaccin sur le terrain.
- Le liquide amniotique peut être collecté avec le liquide allantoïdien même si le sac amniotique est accidentellement ouvert pendant la récolte. Le virus I-2 de la MN n'entre pas dans la cavité amniotique après l'inoculation dans la cavité allantoïdienne, donc le liquide amniotique ne fera que diluer le liquide allantoïque infecté.
- Bien que les données des tests de vaccin I-2 de la MN produit dans un autre laboratoire puissent servir de guide, chaque fabricant doit tester la stabilité du vaccin produit dans son propre laboratoire. Ceci est particulièrement important si différents stabilisants ou diluants sont utilisés, si la concentration du diluant est modifiée ou si la dilution est différente. Les tests de stabilité des vaccins sont abordés à la section 5.3.

3.7.1 Exemples pratiques

Exemple 1

Le liquide allantoïdien recueilli à partir d'œufs est dilué à parties égales (1 à 1) avec de la gélatine à 1% dans du PBS pour créer un vaccin I-2 de la MN liquide. Le titre du vaccin est de 10^9 DIE₅₀ par 0,1 ml. Des compte-gouttes en plastique qui offrent 40 gouttes par ml sont remplis avec le vaccin au laboratoire pour la livraison du vaccin sur le terrain. Une dose est administrée en une seule goutte de vaccin.

- (a) Quel est le titre par ml du vaccin liquide? Par dose?
 (b) Est-ce que ceci atteindra le titre minimum de production (voir la Section 4.4)?

Réponse

- (a) 1 ml = 0,1 ml x 10

$$\begin{aligned} \text{Titre du vaccin par ml} &= 10^9 \text{ DIE}_{50} \times 10 \\ &= 10^9 \text{ DIE}_{50} \times 10^1 \\ &= 10^{9+1} \\ &= 10^{10} \text{ DIE}_{50} \text{ par ml} \end{aligned}$$

Les compte-gouttes livrent 40 gouttes par ml. Donc:

$$\begin{aligned} \text{Titre du vaccin liquide par dose} &= \frac{10^{10} \text{ EID}_{50}/\text{ml}}{40 \text{ goutte/ml}} = \frac{10^{10} \text{ EID}_{50}/\text{ml}}{10^{1.6} \text{ goutte/ml}} \\ &= 10^{10} \div 10^{1.6} \text{ DIE}_{50}/\text{goutte} \\ &= 10^{10-1.6} \text{ DIE}_{50}/\text{goutte} \\ &= 10^{8.4} \text{ DIE}_{50}/\text{dose} \end{aligned}$$

- (b) Ceci est supérieur au titre minimum de production (à savoir 10^7 DIE₅₀ par dose) et le lot peut être distribué si tous les autres résultats des tests de contrôle de qualité sont satisfaisants. Il faut se rappeler que les vaccins avirulents contre la MN tel que I-2 sont sécuritaires même à doses élevées, bien que ce ne soit pas le cas pour d'autres types de vaccins vivants de la MN.

Exemple 2

Si on récolte 5 ml de liquide allantoïdien à partir de chaque œuf, combien d'œufs faut-il inoculer pour produire 10,000 doses du vaccin? Supposons que tous les œufs inoculés avec le lot de semence de travail I-2 de la MN sont positifs dans le test de HA et qu'ils sont récoltés.

Réponse

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml} &= 40 \text{ gouttes (doses)} \\ 1 \text{ dose} &= \frac{1.0 \text{ mL}}{40} = 0.025 \text{ ml} \\ \text{Volume du vaccin I-2 de la MN liquide} &= 10,000 \text{ doses} \times 0.025 \text{ ml} \\ &= 250 \text{ ml} \end{aligned}$$

Le vaccin est préparé en mélangeant 1 volume de liquide allantoïdien avec 1 volume de gélatine à 1% dans du PBS.

$$\begin{aligned} \text{Volume du liquide allantoïdien} &= 0,5 \times 250 \\ \text{dans 250 ml de vaccin I-2 de la MN liquide} &= 125 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Nombre d'œufs nécessaires} &= \frac{125 \text{ ml fluide allantoïdien}}{5 \text{ ml par œuf}} \\ &= 25 \text{ œufs} \end{aligned}$$

Pour produire 10,000 doses de vaccin, 25 œufs doivent être inoculés. Toutefois, en pratique, il faudra toujours incuber et inoculer plus d'œufs car il y a toujours des pertes dues à des mortalités non spécifiques de l'embryon et aux erreurs d'inoculation.

3.7.2 Exercices

1. Du liquide allantoïdien récolté à partir d'œufs est dilué à parties égales (1 à 1) avec 1% de gélatine dans du PBS pour obtenir le vaccin I-2 de la MN liquide. Le titre du vaccin est mesuré à 10^9 DIE₅₀ par 0,1 ml. Le vaccin est stocké à 22°C et des échantillons sont prélevés pour le titrage après 2, 4, 6, 8 et 10 semaines de stockage. Le volume d'une dose est de 30 µL.

Titre du vaccin après stockage						
	Jour 0	2 semaines	4 semaines	6 semaines	8 semaines	10 semaines
DIE ₅₀ par 0.1 ml	9	7.8	6.8	6.8	6.5	5.8
DIE ₅₀ par ml						
DIE ₅₀ par dose						

- (a) Quel est le titre du vaccin liquide par ml aux différents temps indiqués? Par dose?
 - (b) Est-ce que ce vaccin est adéquat pour l'utilisation sur le terrain (voir la Section 4.4)?
 - (c) Combien d'œufs doivent être inoculés pour produire 25,000 doses de vaccin en admettant que tous les œufs inoculés avec la semence de travail du virus I-2 de la MN ont réagi positivement au test de HA et qu'ils sont récoltés.
2. Le liquide allantoïdien récolté à partir d'œufs est dilué à parties égales (1 à 1) avec 1% de lait écrémé dans du PBS pour obtenir le vaccin liquide I-2 de la MN. Le titre du vaccin est mesuré à $10^{8.8}$ DIE₅₀ par 0,1 ml. Des compte-gouttes en plastique qui distribuent 25 gouttes par ml sont remplis avec le vaccin au laboratoire pour être livrés sur le terrain. Une dose est administrée en une seule goutte de vaccin. Le vaccin est stocké à 22°C et des échantillons sont prélevés pour le titrage après 2, 4, 6, 8 et 10 semaines de stockage.

Titre du vaccin après stockage						
	Jour 0	2 semaines	4 semaines	6 semaines	8 semaines	10 semaines
DIE ₅₀ par ml	8,8	7,7	7,3	6,5	6,2	5,2
DIE ₅₀ par dose						
DIE ₅₀ par dose						

- (a) Quel est le titre du vaccin liquide par ml aux différents temps indiqués? Par dose?
- (b) Est-ce que ce vaccin est adéquat pour l'utilisation sur le terrain (voir la Section 4.4)?
- (c) Combien d'œufs doivent être inoculés pour produire 80,000 doses de vaccin en admettant que tous les œufs inoculés avec la semence de travail du virus I-2 de la MN sont positifs dans le test de HA et qu'ils sont récoltés.

Les réponses aux exercices sont données à l'Annexe 11.

4.0

Contrôle de la souche vaccinale I-2 de la MN

4.1 Collecte de sang à la veine de l'aile des poulets

Cette technique est utilisée pour prélever du sang pour la préparation de suspensions de globules rouges (utilisées dans les tests d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination) et du sérum pour les tests d'anticorps. Si le sang est destiné à la préparation de suspensions de globules rouges, la collecte de sang est faite dans un tube contenant un anticoagulant tel que la solution d'Alsever ou de l'acide citrate dextrose (ACD).

Équipement et matériels

Une aiguille de 25 G (0,50 x 16 mm) pour les poulets de moins de 4 semaines ou de 23 G (0,65 x 32 mm) pour les poulets plus âgés

Des seringues en plastique de 1,0 ou 2,5 ml si le sang est pris pour du sérum ou des seringues de 3 ml (jusqu'à 10 ml) si le sang est pris pour la préparation de suspensions de globules rouges.

Procédure

Avant de commencer, s'assurer que l'aiguille est fermement attachée à la seringue, que le capuchon de l'aiguille est lâche et facile à enlever et que le piston se déplace facilement dans la seringue.

Avec un assistant	Travaillant seul
1. Demander à l'assistant de tenir le poulet horizontalement contre lui avec la tête du poulet à sa droite.	1. S'asseoir avec le poulet tenu horizontalement entre les cuisses, la tête loin de soi, à moitié couché sur le dos et à moitié sur son côté droit. Tenir les pattes avec le coude gauche (si on est droitier) et le cou avec l'avant-bras gauche. Avec la main gauche, étaler l'aile gauche, avec la main droite, saisir l'aile droite (certaines personnes préfèrent tenir les oiseaux avec la tête vers eux, si possible apprendre à prélever du sang en utilisant les deux positions, pour pouvoir choisir l'une des deux veines)
2. Tirer l'aile droite vers soi. Si nécessaire, arracher les petites plumes de la partie inférieure, recouvrant l'humérus et nettoyer avec de l'alcool à 70%. La veine de l'aile, nommée dans divers manuels veine brachiale, cubitale ou veine ulnaire cutanée, est clairement visible entre les muscles du biceps et du triceps.	
3. Insérer l'aiguille sous le tendon du muscle pronateur, dans le triangle formé par la bifurcation de la veine d'aile (Figure 8), en pointant l'aiguille de manière proximale – c'est-à-dire, dans la direction de l'écoulement du sang veineux. Ne pas aller trop profond ou l'aiguille frotera l'humérus et le poulet se débattrait. Éviter le nerf cubital. Avec un peu d'exploration il devrait être facile d'entrer dans la veine. Cette approche par en dessous le tendon, rend l'accès à la veine plus facile comparé à l'insertion directe dans la veine, et cela tend également à stabiliser l'aiguille si l'oiseau bouge.	
4. Pour la collecte de sérum, retirer 0,5–1,0 ml de sang par aspiration douce dans une seringue de 2 ml. Prendre des précautions, car les veines de poulets s'affaissent facilement.	
5. Après avoir retiré l'aiguille presser sur la veine pendant quelques secondes pour éviter les saignements.	

Si le sang est destiné à la préparation de suspensions de globules rouges:

Prélever le sang dans une seringue contenant un anticoagulant. Mélanger doucement le sang dans la seringue, retirer l'aiguille et transférer le sang dans un récipient avec un bouchon à vis. Si le sang est éjecté à travers l'aiguille, une partie des globules rouges peut se lyser (être détruits).

Si le sang est destiné à l'obtention de sérum:

Ne pas utiliser d'anticoagulant dans la seringue. Immédiatement après le prélèvement du sang, tirer un peu le piston de la seringue pour laisser un espace d'air entre le sang et l'extrémité de la seringue. Étiqueter la seringue avec le numéro du poulet et la date de la collecte et placer la seringue sur une surface plane ou légèrement inclinée, avec la pointe de l'aiguille vers le haut. Cela permet à une plus grande surface de sang d'être exposée à l'air et aidera à la coagulation.

Placer les échantillons dans un endroit chaud et laisser le sérum se séparer du caillot. Laisser le sang à 37°C pendant au moins quatre heures ou à température ambiante pendant une nuit pour obtenir une bonne séparation du caillot.

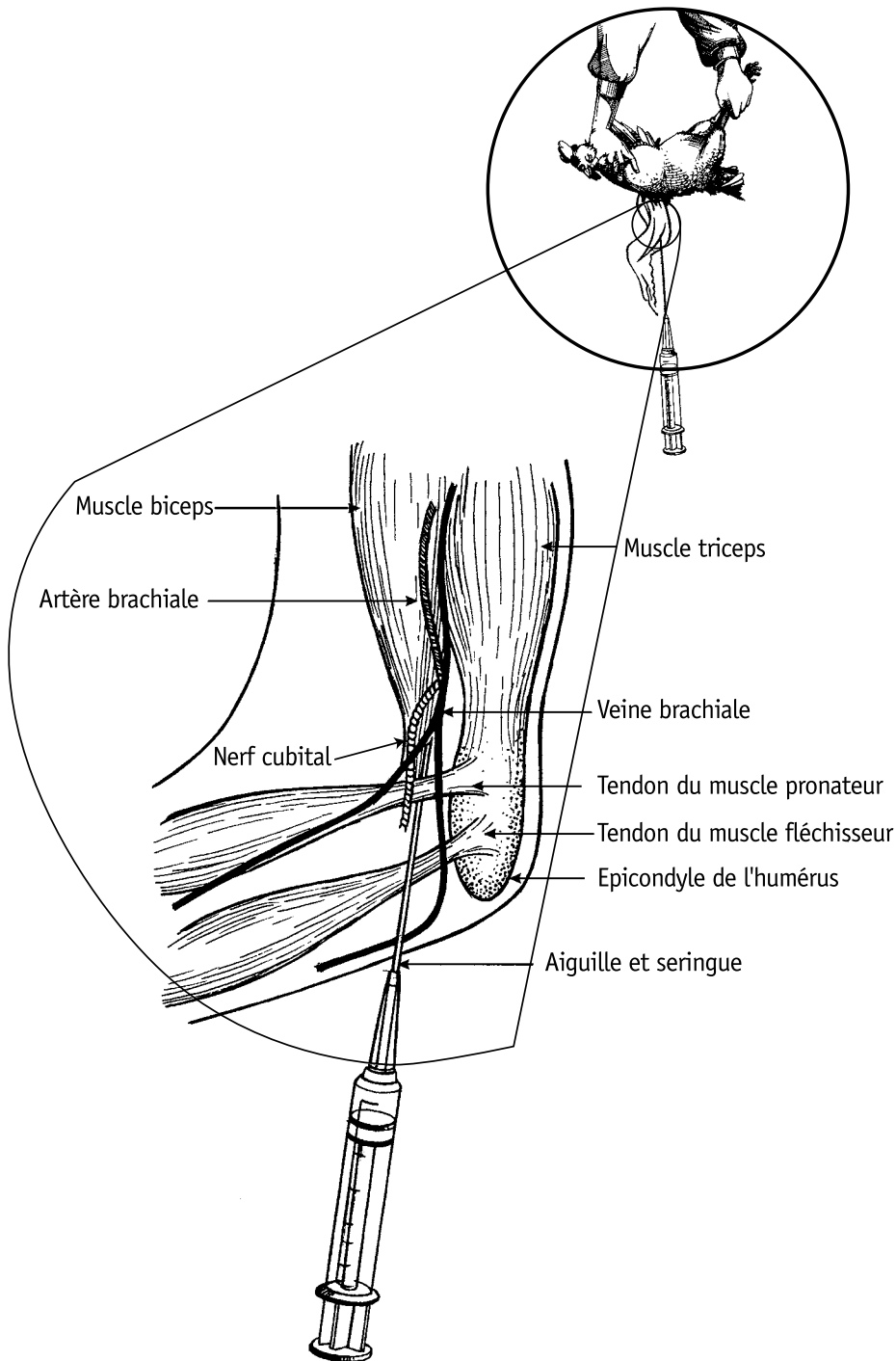


Figure 8: Récolte de sang à partir de la veine brachiale (de l'aile) d'un poulet.

4.2 Préparation d'une suspension de globules rouges après lavage

Les suspensions de globules rouges après lavage sont utilisées dans l'hémagglutination (HA) et les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IH). Des meilleurs résultats sont obtenus si le sang utilisé pour préparer la suspension est un mélange de sang recueilli à partir d'au moins trois poulets sans anticorps contre le virus de la MN (Thayer et Beard, 1998). Si cela n'est pas possible, on peut se servir de sang de poulets vaccinés contre le virus de la MN ou de poulets dont l'état d'anticorps est inconnu du moment que le lavage des globules rouges est minutieux (Thayer et Beard, 1998). Il devrait être possible de recueillir une fois par semaine un volume de sang équivalent à environ 1% du poids corporel à partir de la veine de l'aile de chaque poulet donneur adulte.

Si le personnel de production de vaccin a accès à une centrifugeuse hématocrite et un lecteur, ceux-ci peuvent être utilisés pour normaliser la suspension à 10% de globules rouges. Si une centrifugeuse hématocrite et un lecteur ne sont pas disponibles, on peut utiliser des tubes à centrifuger coniques gradués.

Le volume sanguin des poulets

Le volume sanguin d'un poulet est d'environ 7% de son poids corporel. Une règle de base pratique est de récolter, à chaque saignée, un volume de sang équivalent au maximum à 1% du poids corporel du poulet (à savoir 1 ml pour un poussin de 100 g). Les oiseaux sont plus tolérants à une perte de sang que les mammifères puisque le sang perdu est remplacé rapidement grâce à la résorption de liquides contenus dans les tissus.

Bounous et Stedman (2000)

Équipement et matériels

Bouteille en verre stérile avec bouchon à vis (20 à 30 ml) ou un tube à centrifugation anticoagulant – par exemple de la solution d'Alsever ou l'ACD

Centrifugeuse

Solution de stockage pour globules rouges – par exemple du VGD ou du PBS

Procédure

A. Utilisation d'un tube de centrifugation calibré

1. Mesurer le volume d'anticoagulant requis dans un flacon stérile avec un bouchon à vis ou un tube à centrifugation. Utiliser un volume d'ACD pour trois volumes de sang, ou des volumes égaux de solution d'Alsever et de sang.
2. Aspirer l'anticoagulant (solution d'Alsever ou ACD) dans une seringue de 10 ml.
3. Prélever le sang d'un des poulets donneurs (voir la Section 4.1). Mélanger doucement le sang et l'anticoagulant dans la seringue.
4. Retirer l'aiguille et verser le sang dans le flacon ou dans le tube à centrifugation contenant l'anticoagulant. Faire tourner doucement le tube pour mélanger le sang.
5. Prélever le sang des autres poulets donneurs (répéter les étapes 3 et 4 pour chaque poulet).
6. Remplir le flacon avec du VGD ou du PBS et mélanger doucement.
7. Centrifuger à $500 \times g$ pendant 10 minutes pour sédimenter les globules rouges.

8. Aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur, et le jeter. Ne pas déranger le culot de globules rouges.
9. Remplir le flacon ou le tube à centrifugation avec du VGD ou du PBS.
10. Mélanger doucement pour remettre les cellules en suspension et centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 500 x *g*. Un mélange brusque peut provoquer une hémolyse des globules rouges.
11. Aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur, et le jeter.
12. Remplir la bouteille ou le tube à centrifugation de VGD ou de PBS.
13. Mélanger doucement pour remettre les cellules en suspension.
14. Verser le sang dans des tubes de centrifugation calibrés de 10 ml et centrifuger à nouveau pendant 10 minutes à 500 x *g*.
15. Aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur, et le jeter.
16. Mesurer le volume du culot de globules rouges à l'aide des graduations sur la paroi du tube à centrifugation.
17. Ajouter du VGD ou du PBS au culot de globules rouges pour obtenir une suspension finale de globules rouges de 10%. Par exemple, si le volume du culot de globules rouges est de 1 ml, rajouter 9 ml de VGD ou de PBS pour obtenir un volume total de 10 ml.
18. Mélanger doucement pour remettre les globules en suspension, transférer la suspension de globules rouges dans une bouteille avec bouchon à vis, l'étiqueter et la stocker à 4°C.

B. Utilisation d'une centrifugeuse hématocrite

Suivre la procédure A. étapes 1 à 11, *en utilisant un tube de centrifugation calibré.*

12. Ajouter 10 ml de VGD ou de PBS au culot de globules rouges et mélanger doucement pour remettre les globules rouges en suspension.
13. Remplir deux tubes hématocrites avec le sang resuspendu. Sceller l'extrémité sèche des tubes avec de la pâte à modeler.
14. Placer les tubes hématocrites dans la centrifugeuse hématocrite avec les extrémités scellées, dirigées vers l'extérieur de la centrifugeuse. Allumer la centrifugeuse et la laisser tourner pendant trois minutes.
15. Retirer les tubes hématocrites et lire le volume globulaire (PCV) de la suspension de globules rouges sur le lecteur microhématocrite.
16. Centrifuger le tube contenant la suspension de globules rouges à nouveau pendant 10 minutes à 500 x *g*.
17. Aspirer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur, et le jeter.
18. Ajouter du VGD ou du PBS au culot de globules rouges pour obtenir une suspension finale de 10%. Par exemple, si le PCV est de 12%, rajouter 12 ml de solution de stockage au culot de globules rouges. Etiqueter et stocker à 4°C.

NOTE:

- Manier le sang avec douceur. Les mélanges brusques ou l'éjection du sang à travers une aiguille peuvent causer une lyse des globules rouges.
- Ne pas utiliser des suspensions de globules rouges qui présentent des signes d'hémolyse (quand le liquide clair au-dessus des globules rouges est un peu rouge).

Solutions de stockage pour suspensions de globules rouges

Les suspensions de globules rouges à 10% peuvent être stockées dans du VGD, de la solution d'Alsever ou du PBS pendant plusieurs jours à 4°C si aucune hémolyse n'est observée (Rovozzo et Burke 1973; Allan, Lancaster et Toth 1978; Thayer et Beard 1998). Des essais au Laboratoire de Virologie John Francis, à l'Université de Queensland, ont montré que les globules rouges stockés dans du VGD ont conservé leur intégrité et leur fonction (mesurée par PCV et par densité optique, et le test HA respectivement) pendant plus longtemps que les globules rouges stockés dans du PBS ou de la solution d'Alsever. Les suspensions de globules rouges préparées à partir de jeunes poulets (âgés d'environ 7 mois) étaient meilleures que les suspensions préparées à partir de poudeuses plus âgées (âgés d'environ 14 mois).

4.3 Test pour la présence du virus (test d'hémagglutination)

Toutes les souches du virus de la MN, certains autres virus aviaires et certaines bactéries possèdent des molécules (hémagglutinines) sur leurs enveloppes qui se fixent à des sites particuliers (appelés récepteurs) sur la surface des globules rouges, les amenant à s'agglutiner (Thayer et Beard 1998). Ce processus s'appelle l'hémagglutination et il est représenté à la Figure 9. Ces agglutinats de globules rouges se déposent de façon spécifique sur des lames de verre ou des plaques d'agglutination, ou dans les puits des plaques de microtitration en plastique. Dans notre expérience les plaques de microtitration en plastique de 96 puits à fond en V donnent les meilleurs résultats (voir la Section 4.3.2).

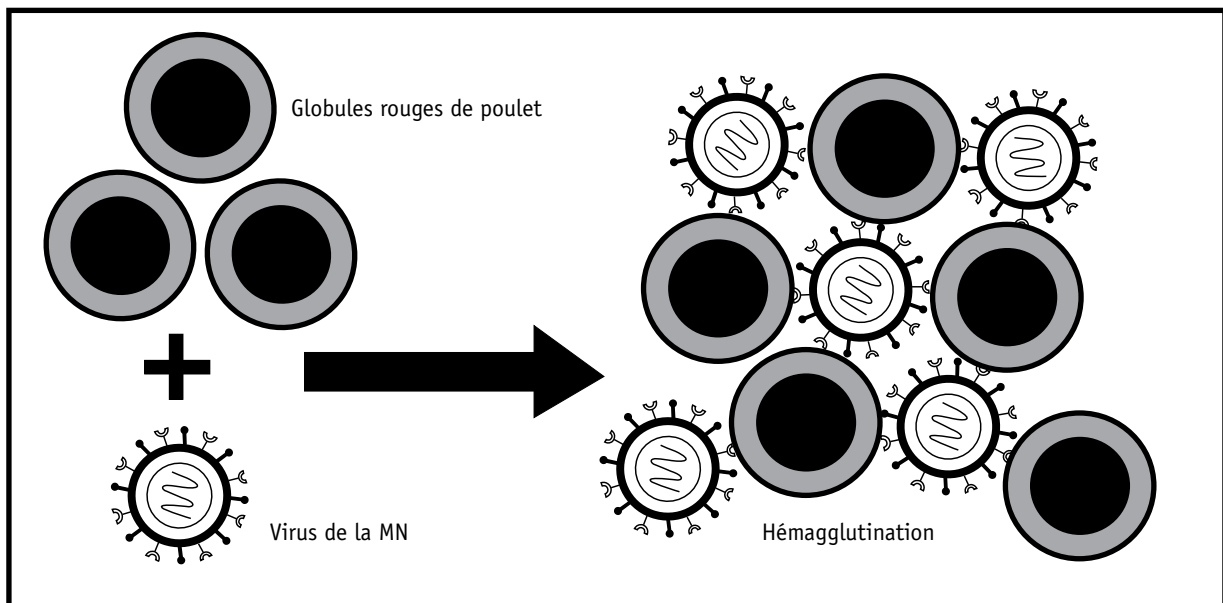


Figure 9: Principe d'hémagglutination.

Le test d'hémagglutination (HA) est utilisé pour déterminer la présence d'hémagglutinine virale dans un échantillon. Il peut aussi être utilisé pour mesurer la quantité d'hémagglutinine présente. Par conséquent, le test HA est utilisé pour confirmer la présence du virus de la MN dans le liquide allantoïdien d'œufs inoculés avec le virus I-2 de la MN pour la production de vaccin ou pour le titrage d'un échantillon, pour déterminer la quantité de virus dans le vaccin et pour normaliser le montant d'hémagglutinine utilisée comme antigène dans le test d'inhibition de l'hémagglutination (IH).

NOTE:

- Le test HA donne une indication de la 'quantité' des virus dans l'échantillon, mais n'indique pas si le virus est viable (vivant). Pour déterminer si le virus est viable, l'infectivité du virus doit être mesurée par le titrage sur œufs embryonnés.
- D'autres virus aviaires, y compris les virus de la grippe et le virus du syndrome de la chute de ponte ainsi que plusieurs espèces de *Mycoplasma* spp. peuvent aussi agglutiner les globules rouges. Pour prouver que le virus de la MN est bien l'agent responsable de l'hémagglutination, il est nécessaire d'inhiber l'activité hémagglutinante avec du sérum spécifique positif de la MN (Thayer et Beard 1998).

4.3.1 Test rapide d'hémagglutination*Équipement et matériels*

Suspension de 10% de globules rouges

PBS

Pipettes Pasteur stériles en verre

Plaques d'agglutination, lames de microscope ou tuiles blanches

Procédure

1. Retirer une goutte de liquide allantoïdien de chaque œuf à travers un petit trou dans la membrane coquillière. Utiliser une nouvelle pipette en verre stérile pour chaque œuf.
2. Placer le liquide allantoïdien dans les puits d'une plaque d'agglutination ou sur des tuiles ou des lames de microscope. Placer les gouttes dans l'ordre correspondant à la position des œufs sur le plateau.
3. Ajouter 1 goutte de suspension fraîche de 10% de globules rouges pour chaque goutte de liquide allantoïdien et mélanger doucement à l'aide d'un mouvement orbital.
4. Après 1 minute, vérifier si l'agglutination a eu lieu dans les puits. Les agglutinats seront facilement visibles.
5. Enregistrer les résultats.

Positif: agglutination de globules rouges – indique la présence de l'hémagglutinine (+)

Négatif: pas d'agglutination de globules rouges – indique l'absence de l'hémagglutinine (-)

4.3.2 Test d'hémagglutination*Équipement et matériels*

Suspension de 10% de globules rouges

PBS

Pipetman et cônes stériles

Plaques de microtitration de 96 puits à fond en V

Procédure

1. Préparer une suspension à 1% de globules rouges à partir de la suspension de 10% en mélangeant un volume (1 ml) de la suspension avec neuf volumes (9 ml) de PBS.
2. À l'aide du Pipetman et des cônes en plastique stériles, retirer 50 µL de liquide allantoïdien de chaque œuf à travers un petit trou dans la membrane ou en utilisant le trou fait lors de l'injection. Utiliser un nouveau cône stérile pour chaque œuf. Placer une goutte par puits dans la plaque de microtitration.

3. Ajouter une goutte de la suspension à 1% de globules rouges (25 µL) à chaque goutte de liquide allantoïdien. Mélanger doucement.
4. Après 45 minutes, examiner et enregistrer le motif d'hémagglutination.

Positif: un mince film de globules rouges – indique la présence d'hémagglutinine (+)

Négatif: un bouton bien défini de globules rouges – indique l'absence d'hémagglutinine (-)

Lorsque les globules rouges se déposent dans les puits d'une plaque de microtitration, les cellules se déposent et roulent au fond du puits, formant un petit bouton bien défini. Les agglutinats se déposent aussi mais ne roulent pas au fond des puits. Le fond du puits est recouvert d'une couche mince de globules rouges. Ceci est illustré à la Figure 10.

NOTE:

- Pour le titrage d'une suspension virale, il est recommandé de faire le test HA dans des plaques de microtitration à fond en V. Bien que le test doive reposer pendant 45 minutes avant la lecture, les résultats sont faciles à lire pour un débutant. De plus, le test n'utilise que peu de globules rouges et les plaques peuvent être désinfectées, lavées et réutilisées plusieurs fois.
- Il faut toujours inclure des contrôles positifs et négatifs dans les tests d'hémagglutination.

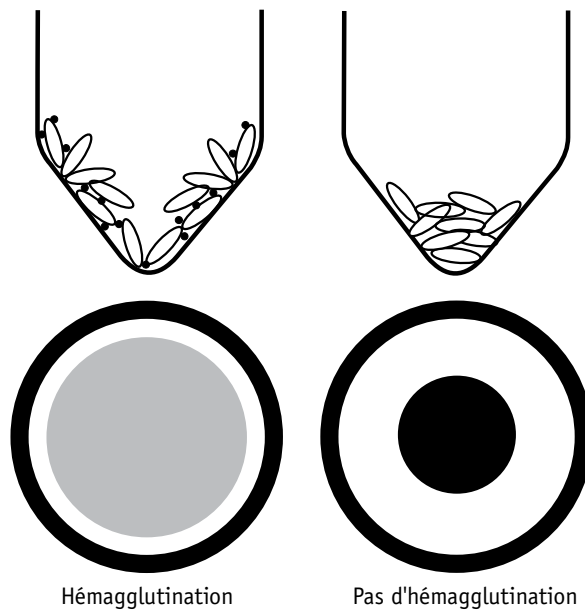


Figure 10: Motif d'hémagglutination des globules rouges agglutinés et non agglutinés dans des plaques de microtitration à fond en V.

4.3.3 Titrage de l'hémagglutinine en utilisant le test quantitatif d'hémagglutination

Le test quantitatif d'hémagglutination mesure, par titrage, la quantité de virus dans un échantillon (par exemple, du vaccin ou du liquide allantoïdien). Lors du titrage, la puissance d'une suspension virale est mesurée par la plus forte dilution à laquelle elle peut être diluée avant qu'elle ne montre plus de signes d'activité du virus (dans ce test, l'hémagglutination). Le test quantitatif d'hémagglutination est aussi utilisé pour mesurer et pour standardiser la quantité d'hémagglutinine utilisée comme antigène dans le test IH. L'échantillon est dilué en série de deux en deux (voir Annexe 8) pour déterminer le nombre d'unités hémagglutinantes contenues dans l'échantillon. Les étapes de cette technique sont présentées à la Figure 11.

Équipement et matériels

Suspension de 10% de globules rouges

PBS

Pipettes Pasteur stériles en verre

Pipetman multicanaux et cônes (pour mesurer 25 µL)

Plaques de microtitration de 96 puits à fond en V

Procédure

1. Préparer une suspension de 1% de globules rouges à partir de la suspension de 10% en mélangeant un volume (1 ml) de la suspension et neuf volumes (9 ml) de PBS.
2. En utilisant la pipette multicanaux, distribuer 25 µL de PBS dans chaque puits de deux (échantillon testé en double) ou trois (échantillon testé en triple) rangées de la plaque de microtitration.
3. Placer 25 µL de la suspension virale (par exemple du liquide allantoïdien) dans le premier puits de chaque rangée (il s'agit d'une dilution 1:2).
4. Bien mélanger et faire des dilutions de deux en deux de la suspension le long de la rangée en transférant 25 µL de liquide d'un puits à l'autre. Jeter 25 µL du dernier puits de chaque rangée de telle sorte que les volumes dans chaque puits restent les mêmes (voir Annexe 8).
5. Distribuer 25 µL de PBS dans chaque puits dans la rangée de contrôle. Cette rangée illustrera les motifs normaux d'hémagglutination et la durée de temps pendant laquelle les globules rouges restent en suspension.
6. Ajouter 25 µL de PBS à chaque puits (y compris les puits de contrôle).
7. Ajouter 25 µL de suspension de 1% de globules rouges à chaque puits.
8. Mélanger doucement et laisser reposer à température ambiante pendant 45 minutes. Couvrir la plaque pour éviter la déshydratation.
9. Lire les résultats et les enregistrer.

Positif: un mince film de globules rouges – indique la présence d'hémagglutinine (+)

Négatif: un bouton bien défini de globules rouges – indique l'absence d'hémagglutinine (-)

Le dernier puits montrant une hémagglutination complète est dit contenir une unité d'hémagglutinante (HA). A partir de ceci, on peut calculer le titre de l'échantillon original non dilué. Par exemple, si le sixième puits est le dernier à montrer de l'hémagglutination (1:64), cela signifie que le matériel d'origine contenait 64 (2⁶) unités d'HA.

Une unité d'HA est définie comme la dilution la plus forte de l'antigène qui agglutinera complètement 25 µL de suspension de globules rouges à 1% utilisés dans le test dans des conditions standardisées de température et de temps d'incubation.

NOTE:

- Des puits de contrôle de globules rouges doivent toujours être inclus dans ce test. Ces puits contiennent 50 µL de PBS et 25 µL de globules rouges à 1%, mais pas de virus. A la fin du temps de réaction, ces puits ne devraient pas présenter d'hémagglutination – c'est-à-dire qu'il devrait y avoir un bouton de globules rouges au fond du puits. Ces puits montrent les motifs normaux d'hémagglutination et le temps durant lequel les globules rouges restent en suspension.
- Il est important de lire les résultats des tests le plus tôt possible après les 45 minutes d'incubation. Après un certain temps, il y a élution du virus – c'est-à-dire que les cellules agglutinées se dissocient (se séparent) et les globules rouges vont rouler au fond des puits. Ainsi, un échantillon positif peut ne pas montrer d'hémagglutination et paraître négatif. Il faut se rappeler que les différentes souches du virus de la MN montrent différents degrés d'élution et que l'élution du virus se produit plus rapidement à des températures plus élevées.

4.4 Estimation de la concentration de virus vivant de la MN

Bien que le test HA mesure la capacité d'agglutination des globules rouges d'une suspension virale, il n'indique pas si le virus est vivant, inactif ou sous forme de sous-unités virales. Par conséquent, le test ne donne pas d'estimation fiable sur la quantité de virus viable dans un échantillon. Pour confirmer la présence, et pour mesurer la quantité de virus de la MN vivant dans une suspension, il faut utiliser le test d'infectivité du virus (réalisé par l'inoculation d'œufs ou de la culture cellulaire). Si cette suspension est un échantillon du vaccin I-2 de la MN, le titrage d'infectivité est une mesure de l'activité du vaccin.

L'infectivité d'une suspension du virus de la MN est mesurée par la détermination de la plus forte dilution à laquelle le virus peut encore être détecté dans le liquide allantoïdien par le test d'hémagglutination après incubation d'œufs inoculés avec des dilutions en série (normalement au 10ème) de la suspension virale.

Comme unité d'infectivité, on utilise la dose infectieuse moyenne (50%) pour l'embryon (DIE_{50}) – c'est-à-dire la quantité de virus capable d'infecter 50% des œufs inoculés. Pour les souches du virus de la MN qui tuent les embryons, on peut calculer la dose létale moyenne pour l'embryon (DLE_{50}). C'est le titre de la suspension virale et ceci est exprimé en nombre d'unités infectieuses par unité de volume (par exemple, par ml de solution ou par dose de vaccin).

Le point final du titrage est la plus forte dilution de virus qui produit un effet détectable (dans ce cas, l'hémagglutination) dans 50% des œufs inoculés. Ceci est déterminé mathématiquement par la méthode de Reed et Muench (Villegas 1998).

Test d'hémagglutination

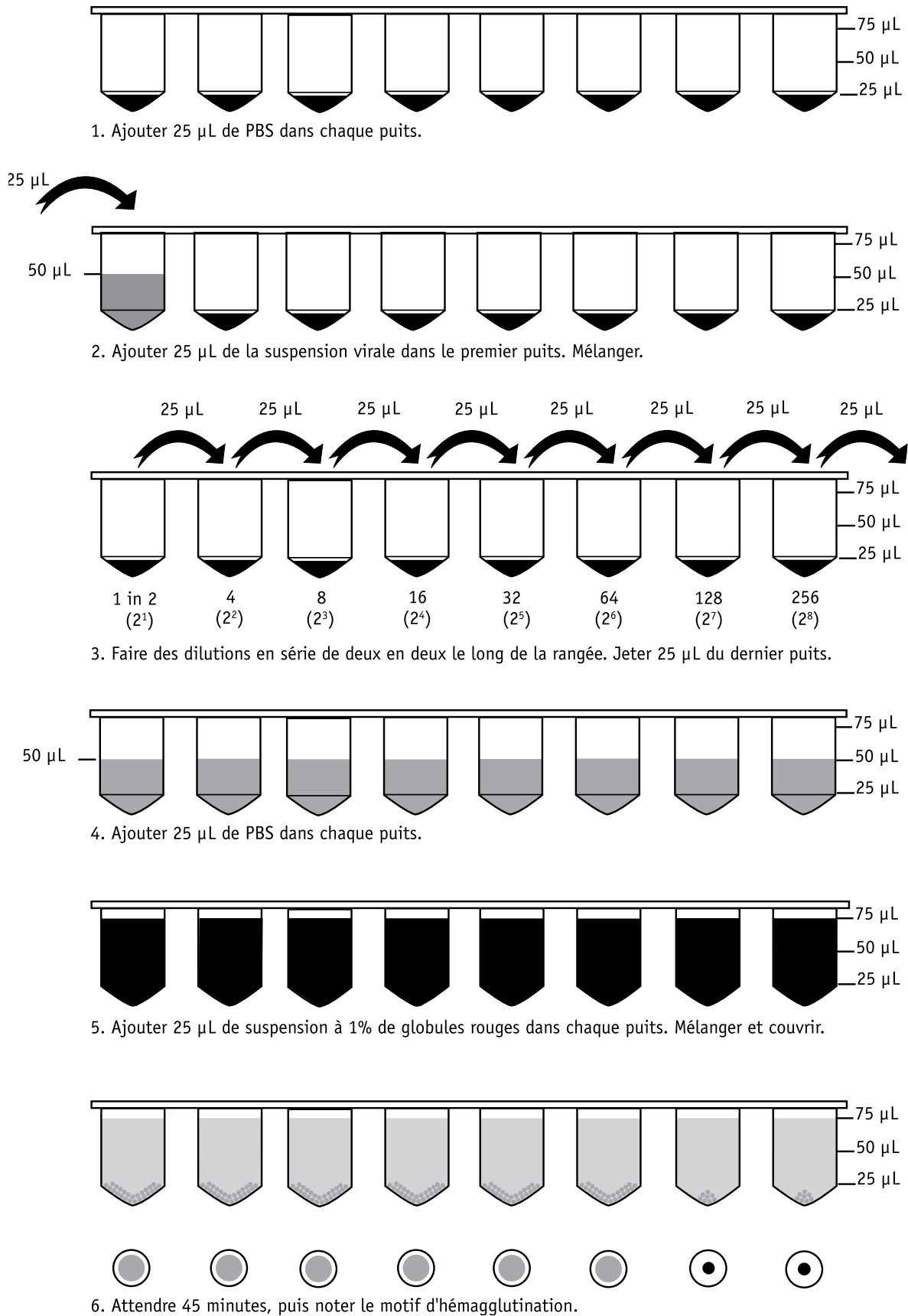


Figure 11: Test d'hémagglutination réalisé en combinant une suspension de globules rouges après lavage et le virus de la MN. La glycoprotéine HN du virus de la MN s'attache à des récepteurs sur les globules rouges provoquant l'agglutination.

Équipement et matériels

PBS

Tubes en verre stériles

Pipettes en verre (1 et 10 ml) ou Pipetmans (200–1000 µL et 10–200 µL) et cônes

Seringue

Aiguilles

Désinfectant pour les coquilles d'œufs – par exemple, de l'alcool à 70% ou de l'iode dans de l'alcool

Collodion, ruban adhésif ou un mélange de paraffine/vaseline pour sceller le site d'inoculation

*Procédure***Les inoculations doivent être effectuées en utilisant une technique aseptique.**

1. Étiqueter les tubes en verre stériles en série, en allant de la dilution de suspension virale à tester la plus faible à la plus forte (par exemple 10^{-1} , 10^{-2} à 10^{-10}).
2. Pipeter 0,9 ml de PBS dans chaque tube.
3. Préparer une série de dilutions au $10^{\text{ème}}$ de la suspension virale, à l'aide d'une pipette propre et stérile ou d'un Pipetman avec un cône stérile, pour transférer 0,1 ml de suspension virale d'un tube à l'autre (voir Annexe 8).
4. Sélectionner cinq œufs fertiles pour chaque dilution. Préparer les œufs pour l'inoculation (mirer et marquer le site d'inoculation). Écrire au crayon, sur la coquille de chaque œuf, la date de l'inoculation et la dilution de la suspension virale. Si plusieurs titrages sont faits en même temps, il faut aussi identifier chaque plateau avec un numéro de lot, un numéro de diagnostic ou les initiales du technicien.
5. Désinfecter le site d'inoculation et percer un trou à l'emplacement marqué.
6. Inoculer les œufs. La même seringue et la même aiguille peuvent être utilisées pour inoculer tous les œufs dans le titrage si la dilution la plus forte de la suspension virale (la moins concentrée: par exemple 10^{-10}) est inoculée en premier.
7. Sceller le site d'inoculation. Incuber les œufs pendant 4 jours, et mirer à 24 et à 72 heures. Enregistrer tous les décès qui surviennent au cours de la période d'incubation. Jeter les œufs contenant des embryons morts si le titrage est fait pour mesurer l'infectivité des vaccins I-2 de la MN ou d'autres souches non virulentes. S'il s'agit du titrage de souches virulentes, effectuer un test rapide HA des œufs contenant des embryons morts.
8. Après quatre jours d'incubation, réfrigérer les œufs à 4°C pendant 4 heures.
9. Essuyer les coquilles avec un désinfectant et ouvrir les œufs.
10. Recueillir une goutte de liquide allantoïdien de chaque œuf et effectuer le test d'hémagglutination (voir la Section 4.3.1 ou 4.3.2).
11. Enregistrer les résultats. Un exemple avec 10 rangées, chacune contenant cinq œufs, est montré ci-dessous.

Dilution	Résultats				
10 ⁻¹	+	+	+	+	+
10 ⁻²	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	+	+	-
10 ⁻⁷	+	+	+	-	-
10 ⁻⁸	+	+	-	-	-
10 ⁻⁹	-	-	-	-	-
10 ⁻¹⁰	-	-	-	-	-

Positif: un mince film de globules rouges – indique la présence d’hémagglutinine (+)

Négatif: un bouton bien défini de globules rouges – indique l’absence d’hémagglutinine (-)

NOTE:

- Le diluant utilisé doit être non toxique et doit préserver l’infectivité du virus. Le PBS est idéal. Des antibiotiques peuvent être ajoutés au PBS utilisé pour diluer la suspension virale.
- Des pipettes stériles ou des cônes de Pipetman différents doivent être utilisés pour la préparation et le mélange de chaque dilution. Une pipette déjà utilisée aura des particules virales sur sa surface extérieure, et si elle est réutilisée, ces particules seront transportées d’une dilution à l’autre. Les dilutions seront inexactes et après inoculation dans des œufs et incubation pendant 96 heures, ces particules virales se multiplieront, ce qui aboutira à une erreur assez importante.
- Les mortalités jusqu’à 24 heures après inoculation sont considérées comme non spécifiques et ne sont pas incluses dans les calculs.
- Le virus I-2 de la MN est inoffensif pour les embryons pendant au moins 148 heures après l’inoculation par la cavité allantoïdienne. Si des mortalités ont lieu après 24 heures, la cause des mortalités doit être recherchée (voir Section 5.10).
- Le titrage doit comprendre la gamme complète des résultats – c’est-à-dire de 100% d’œufs à 0% d’œufs infectés. Si cette condition n’est pas remplie, le titrage doit être répété. S’il est difficile d’obtenir des œufs, il est quand même possible de calculer le titre à partir des valeurs de chaque coté du point final de 50% dans la mesure où les résultats sont consistants.

Calcul du titre

Le titre de la suspension virale peut être calculé selon la formule mathématique mise au point par Reed et Muench (1938).

Procédure

1. Enregistrer les nombres d’œufs infectés (HA positifs) et non-infectés (HA négatif) dans le tableau ci-dessous.

Dilution	Nombre d'œufs infectés	Nombre d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10 ⁻²			↑	↓	
10 ⁻³			↑	↓	
10 ⁻⁴			↑	↓	
10 ⁻⁵			↑	↓	
10 ⁻⁶			↑	↓	
10 ⁻⁷			↑	↓	
10 ⁻⁸			↑	↓	
10 ⁻⁹			↑	↓	
10 ⁻¹⁰			↑	↓	

En général le nombre d’œufs infectés est de 0 à 5 par dilution (le total peut être inférieur à 5 si des embryons sont morts).

En général le nombre d’œufs non-infectés est de 0 à 5 par dilution (le total peut être inférieur à 5 si des embryons sont morts).

2. Additionner le nombre d’œufs infectés dans le sens des flèches en commençant par la dilution où zéro œufs sont infectés (voir l’exemple pratique à la Section 4.4.1).
3. Additionner le nombre d’œufs non-infectés dans le sens des flèches en commençant par la dilution où zéro œufs sont non infectés (voir l’exemple pratique à la Section 4.4.1).
4. Calculer la proportion et le pourcentage des œufs infectés à chaque dilution en utilisant les formules ci-dessous:

$$\text{Rapport} = \frac{\text{total accumulé des œufs infectés}}{(\text{total accumulé des œufs infectés} + \text{total accumulé des œufs non infectés})}$$

$$\text{Pourcentage} = \text{rapport} \times 100$$

5. Identifier les pourcentages d’œufs infectés les plus proches de 50%: une valeur supérieure et une valeur inférieure à 50%. Noter les dilutions qui correspondent à ces valeurs. La dilution avec un titre de 50% au point final se trouve entre ces dilutions.

6. Pour calculer la dilution exacte qui a produit l’infection dans 50% des œufs inoculés, utiliser la formule de Reed et Muench pour calculer l’indice (aussi appelé la distance proportionnelle dans certains manuels).

$$\text{Indice} = \frac{(\% \text{ des œufs infectés à la dilution immédiatement supérieure à } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ d'œufs infectés à la dilution immédiatement supérieure à } 50\%) - (\% \text{ d'œufs infectés à la dilution immédiatement inférieure à } 50\%)}$$

7. L'indice montre combien la dilution ayant produit une infection dans 50% des œufs inoculés est proche de la dilution ayant produit le pourcentage immédiatement au-dessus de 50% d'œufs infectés.

8. Calculer le point final 50% en utilisant la formule:

Log du point final 50% = (log de la dilution immédiatement supérieure à 50%)
– (indice × log du facteur de dilution^a)

^a Si les dilutions au 1/10èmes sont utilisées, le log du facteur de dilution est de 1,0.

9. Le titre est la valeur inverse (valeur positive) de la dilution qui a produit 50% d'infection (l'exponentielle négative de la dilution limite). Etant donné que le volume de l'inoculum était de 0,1 ml, le titre est exprimé en DIE₅₀ par 0,1 ml.

Certains travailleurs préfèrent utiliser la méthode de Spearman-Kärber (Villegas 1998) pour calculer le titre viral. En général, cette méthode ne comporte pas beaucoup de calculs, et les résultats sont aussi précis que ceux obtenus avec la formule Reed et Muench. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée que lorsque les résultats des dilutions testées couvrent la gamme complète de 0 à 100% d'infection. Des exemples pratiques utilisant cette méthode, sont présentés à l'Annexe 7.

Titres minimums

La dose minimale du vaccin I-2 nécessaire pour provoquer une réponse immunitaire protectrice dans la majorité des poulets est de 10⁶ DIE₅₀ (Alders et Spradbrow 2001). Cependant, pour s'assurer que la dose minimale est inoculée quand un poulet est vacciné sur le terrain, il est préférable de produire un vaccin avec au moins 10⁷ DIE₅₀ par dose. Ceci compensera les pertes de titre pouvant survenir pendant le stockage, le transport et l'utilisation du vaccin sur le terrain (Alexander 1991). Donc, pour la souche vaccinale I-2 de MN:

Le **titre minimum de production** est de 10⁷ DIE₅₀ par dose (aussi appelée la dose standard de laboratoire).

Le **titre minimum de terrain** est de 10⁶ DIE₅₀ par dose.

4.4.1 Exemple pratique

Un flacon de vaccin I-2 lyophilisé est reconstitué avec 2,5 ml de PBS stérile. Le volume de vaccin dans le flacon avant la lyophilisation était de 2,5 ml, ce qui est suffisant pour 250 doses.

Une dilution en série de ce vaccin est effectuée de 10⁻¹ à 10⁻¹⁰ et 0,1 ml de chaque dilution est inoculé dans la cavité allantoïdienne de cinq œufs embryonnés âgés de 9 à 11 jours. A la fin de 96 heures d'incubation, un échantillon de liquide allantoïdien de chaque œuf est testé par le test d'hémagglutination pour la présence d'hémagglutinine virale. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

1. Calculer le titre d'infectivité de ce vaccin. Exprimer le titre comme DIE₅₀ par 0,1 ml, par 1.0 ml, et par dose.
2. Le titre minimum de production de vaccin nécessaire pour le laboratoire est de 10⁷ DIE₅₀ par dose. Le titre de ce vaccin est-il acceptable?

Réponse 1

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10 ⁻¹	+++++	5	0	34 ↑	0	
10 ⁻²	+++++	5	0	29	0	
10 ⁻³	+++++	5	0	24	0	
10 ⁻⁴	+++++	5	0	19	0	
10 ⁻⁵	+++++	5	0	14	0	(14/14) 100
10 ⁻⁶	++++-	4	1	9	1	(9/10) 90
10 ⁻⁷	+++--	3	2	5	3	(5/8) 62.5*
10 ⁻⁸	++---	2	3	2	6	(2/8) 25
10 ⁻⁹	-----	0	5	0	11	(0/11) 0
10 ⁻¹⁰	-----	0	5	0 ↓	16	

+ Infecté.
- Non-infecté.

En utilisant la méthode de Reed et Muench:

1. Enregistrer le nombre d'œufs infectés et le nombre d'œufs non-infectés (colonnes 3 et 4).
2. Calculer les totaux cumulés d'œufs infectés et non-infectés (colonnes 5 et 6), comme indiqué sur la table ci-dessus.
3. Calculer le rapport entre le nombre d'œufs infectés et le nombre d'œufs non-infectés et les pourcentages (colonne 7). Le pourcentage représenté avec une * doit être arrondi (approximé) à 63.

A partir de ce tableau on constate que le point final 50% est entre 10⁻⁷ (62,5%) et 10⁻⁸ (25%).

4. Utiliser la formule ci-dessous pour calculer l'indice (ou la distance proportionnelle) entre 10⁻⁷ et 10⁻⁸.

$$\text{Indice} = \frac{(\% \text{ des œufs infectés à la dilution immédiatement supérieure à } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ d'œufs infectés à la dilution immédiatement supérieure à } 50\%) - (\% \text{ d'œufs infectés à la dilution immédiatement inférieure à } 50\%)}$$

$$\text{Indice} = \frac{63 - 50}{63 - 25} = \frac{13}{38} = 0,34$$

Le nombre 0,34 devrait être arrondi à 0,3.

5. Calculer le point final 50% en utilisant la formule:

$$\begin{aligned} \text{Log point final } 50\% &= (\log \text{ de la dilution immédiatement supérieure à } 50\%) - (\text{indice} \times \log \text{ du facteur de dilution}^a) \\ &= -7 - (0,3 \times 1,0) = -7,3 \end{aligned}$$

Donc, la dilution ayant produit une infection de 50% = 10^{-7,3}.

^a Puisque des dilutions au 10èmes ont été utilisées, le log du facteur de dilution est de 1,0.

6. Calculer le titre du vaccin (nombre d'unités infectieuses par unité de volume).

Par volume d'inoculum:

La dilution ayant produit une infection de 50% = $10^{-7,3}$. Le titre est la valeur inverse (valeur positive) de la dilution qui a produit l'infection de 50%.

Puisque le volume de l'inoculum était de 0,1 ml, chaque 0,1 ml contient $10^{7,3}$ DIE₅₀.

Par ml:

(1 ml = $10^1 \times 0,1$ ml)

Chaque ml contient $10^{7,3} \times 10^1$ DIE₅₀ = $10^{8,3}$ DIE₅₀

Par dose:

Le flacon contient suffisamment de virus pour 250 doses et a été reconstitué dans 2,5 ml de PBS stérile.

$$\text{Volume d'une dose} = \frac{2,5 \text{ mL}}{250 \text{ doses}} = 0,01 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Titre par dose} &= 10^{8,3} \text{ DIE}_{50} \text{ par ml} \times 0,01 \text{ ml} \\ &= 10^{8,3} \text{ DIE}_{50} \text{ par ml} \times 10^{-2,0} \text{ ml} \\ &= 10^{8,3-2,0} \text{ DIE}_{50} \text{ par ml} \\ &= 10^{6,3} \text{ DIE}_{50} \text{ par dose} \end{aligned}$$

Réponse 2

Le titre de ce vaccin est inférieur au titre minimum de production. Si ce vaccin vient d'être préparé et que les dossiers indiquent que les protocoles de production ont été suivis, il faut répéter le test. Si le même résultat est obtenu, il faut rejeter ce lot de vaccin. Si ce vaccin vient d'un lot de vaccins qui a été stocké pendant un certain temps, examiner les dossiers de production et de stockage et le titre au moment de la production.

Arrondir les titres

Lors du calcul des résultats d'un titrage, il est habituel 'd'arrondir' les décimales. Cela simplifiera les opérations mathématiques et aura peu d'effet sur la précision des résultats.

- Lors de l'arrondissement des pourcentages, tout chiffre avec une décimale de 0,5 ou plus doit être arrondi vers le haut au chiffre entier le plus proche et tout chiffre avec une décimale inférieure à 0,5 devrait être arrondi vers le bas.
- Lors de l'arrondissement de l'indice, tout chiffre avec une décimale de 0,05 ou plus doit être arrondi vers le haut à la décimale unique la plus proche et tout chiffre avec une décimale inférieure à 0,05 doit être arrondi vers le bas. Par exemple, 0,16 est arrondi à 0,2 et 0,14 est arrondi à 0,1.

4.4.2 Exercices

Une dilution en série du vaccin de 10^{-1} à 10^{-10} est préparée; 0,1 ml de chaque dilution est inoculé dans la cavité allantoïdienne de cinq œufs embryonnés âgés de 9 à 11 jours. A la fin des 96 heures d'incubation, un échantillon de liquide allantoïdien de chaque œuf est testé par le test d'hémagglutination pour la présence de l'hémagglutinine virale. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Ces exercices ne sont que des exemples et ne reflètent pas des résultats réels de titrages).

Les symboles +, - et 0 représentent les résultats du test d'hémagglutination, à savoir:

- + Infecté
- Non-infecté
- 0 Mort non-spécifique de l'embryon pendant l'incubation

Calculer le titre du vaccin (par 0,1 ml, par 1,0 ml et par dose de 30 µL).

Le titre minimum de production de vaccin nécessaire pour le laboratoire est de 10^7 DIE₅₀ par dose. Le titre de ce vaccin est-il acceptable?

Les réponses aux exercices sont données à l'Annexe 11.

Exercice 1

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10^{-1}	+++++					
10^{-2}	+++++					
10^{-3}	+++++					
10^{-4}	+++++					
10^{-5}	+++++					
10^{-6}	+++++					
10^{-7}	+++--					
10^{-8}	++---					
10^{-9}	+----					
10^{-10}	-----					

Exercice 2

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10^{-1}	+++++					
10^{-2}	+++++					
10^{-3}	+++++					
10^{-4}	+++++					
10^{-5}	+++++					
10^{-6}	+++++					
10^{-7}	+++++					
10^{-8}	+++--					
10^{-9}	+----					
10^{-10}	-----					

Exercice 3

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10 ⁻¹	+++++					
10 ⁻²	+++++					
10 ⁻³	+++++					
10 ⁻⁴	+++++					
10 ⁻⁵	+++++					
10 ⁻⁶	++++-					
10 ⁻⁷	+++--					
10 ⁻⁸	++---					
10 ⁻⁹	+----					
10 ⁻¹⁰	-----					

Exercice 4

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10 ⁻¹	+++++					
10 ⁻²	+++++					
10 ⁻³	+++++					
10 ⁻⁴	+++++					
10 ⁻⁵	+++++					
10 ⁻⁶	++---					
10 ⁻⁷	++---					
10 ⁻⁸	+----					
10 ⁻⁹	-----					
10 ⁻¹⁰	-----					

Exercice 5

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % d'œufs infectés sur total œufs inoculés (cumulé)
10 ⁻¹	+++++					
10 ⁻²	++++0					
10 ⁻³	+++00					
10 ⁻⁴	++++-					
10 ⁻⁵	+++00					
10 ⁻⁶	++--0					
10 ⁻⁷	++--0					
10 ⁻⁸	+----					
10 ⁻⁹	-----					
10 ⁻¹⁰	-----					

4.5 Test du vaccin pour la présence de contaminants

4.5.1 Vérification de l'absence de contamination bactérienne et fongique dans le vaccin

Chaque lot de vaccin I-2 de la MN doit être testé pour confirmer l'absence de contamination viable d'origine bactérienne ou fongique qui pourrait être nocive pour les poulets recevant le vaccin. Les autorités nationales d'enregistrement doivent fournir aux producteurs de vaccins ou aux distributeurs les détails sur les tests requis. Des tests appropriés sont aussi décrits dans le *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (2011) et le *Manual of ASEAN standards for animal vaccines* (1998) ainsi que des informations sur l'interprétation des résultats des tests. Etant donné qu'il n'y a pas de directives spécifiques pour les vaccins administrés par gouttes oculaires, les procédures pour tester les vaccins viraux vivants administrés dans l'eau de boisson, par vaporisation ou par scarification de la peau sont utilisées (OIE 2011e).

En général, deux méthodes sont recommandées pour détecter les contaminants d'origine bactérienne et fongique: les tests de stérilité par filtration sur membrane et par l'inoculation directe. La méthode de choix pour la plupart des laboratoires produisant le vaccin I-2 de la MN est le test de stérilité par inoculation directe. Dans ce test, une pipette stérile ou une seringue et une aiguille sont utilisées pour transférer un échantillon du vaccin directement dans des milieux liquides. Les milieux liquides sont préférés aux milieux solides car ils fournissent un meilleur environnement pour détecter un petit nombre de micro-organismes viables présents dans un échantillon. Les milieux liquides permettent également de quantifier le nombre d'organismes dans un échantillon et de diluer les substances inhibitrices, par exemple les antibiotiques.

Les milieux utilisés devraient supporter la croissance d'un large éventail de micro-organismes. Le milieu liquide au thioglycolate (FTM) et le milieu caséine-soja (SCDM, aussi appelé milieu trypticase soja) sont recommandés. Le FTM est utilisé

principalement pour la culture des bactéries anaérobies, mais il permet aussi de détecter les bactéries aérobies. Le SCDM est destiné à la culture de bactéries aérobies, mais il est également approprié pour les champignons. Il faut tester la stérilité de tous les milieux utilisés ainsi que leur capacité de supporter la croissance de micro-organismes avant de les utiliser pour tester les contaminants de vaccins.

La détection de la contamination d'un lot de vaccin avec certitude absolue impliquerait l'examen de chaque flacon du vaccin en utilisant une gamme de milieux, capables de supporter la croissance de tous les contaminants possibles. Cela est évidemment impossible. Par conséquent, il faut établir un protocole d'échantillonnage qui assure que des échantillons représentatifs de l'ensemble du lot sont testés et que suffisamment d'échantillons sont prélevés pour détecter les contaminants avec des niveaux de probabilité acceptables.

Lors du contrôle du vaccin I-2 de la MN pour les contaminations d'origine bactérienne et fongique, un protocole de test en deux étapes est recommandé. Des échantillons regroupés de liquide allantoïdien provenant de chaque récipient utilisé pour recueillir les liquides allantoïdiens et d'un nombre représentatif de flacons de vaccins – par exemple, les flacons de vaccins en verre, devraient être prélevés et analysés. Le nombre de flacons de vaccin à tester dans chaque lot est déterminé par le nombre de flacons utilisés dans le lot, et il est basé sur la probabilité de détecter un flacon contaminé dans un lot de cette taille.

- Si la taille du lot est inférieure à 100, 10% ou quatre flacons (prendre, de préférence, le nombre le plus élevé) doivent être testés.
- Si le lot contient entre 100 et 500 flacons, 10 flacons doivent être testés.
- Si le lot contient plus de 500 flacons, 2% ou 20 flacons (prendre, de préférence, le nombre le moins élevé) doivent être testés.

Il est également important de considérer le volume de chaque flacon.

- Si le volume de vaccin dans chaque flacon est inférieur à 1 ml, inoculer 0.5 ml dans chaque milieu.
- Si le volume dans chaque flacon est de 1 à 4 ml, inoculer la moitié du flacon dans chaque milieu.
- Si le volume est de 4 à 20 ml, inoculer 2ml dans chaque milieu.

Si l'échantillon contient des micro-organismes, le milieu peut paraître trouble ou un sédiment peut se former et il faut tester le lot de vaccin à nouveau. Si aucune croissance microbienne n'est détectée dans aucun des milieux inoculés avec le vaccin, le lot est conforme aux tests d'absence de contamination. Pour les vaccins administrés dans l'eau de boisson, par vaporisation ou par scarification de la peau, la contamination par «un nombre limité de bactéries et champignons non pathogènes peut être autorisée». Pour les vaccins aviaires, chaque flacon final du vaccin ne doit pas contenir plus d'une colonie bactérienne ou fongique par dose (OIE 2011e).

4.5.2 Vérification de l'absence d'agents viraux exogènes dans le vaccin

Certains laboratoires de petite taille peuvent éprouver des difficultés à tester le vaccin pour l'absence de virus exogènes. Si le vaccin est destiné à être utilisé chez les poulets de village, alors l'option la moins chère consiste à surveiller les pondeuses qui produisent les œufs destinés à la production de vaccin, afin de minimiser le risque de la présence de maladies virales transmises verticalement. Ceci est abordé à la Section 3.3.

Les vaccins destinés à être utilisés dans les élevages commerciaux sont au-delà de la portée de ce manuel.

Des protocoles appropriés sont disponibles pour tester l'absence de virus exogènes dans le vaccin.

NOTE:

L'effet de toute contamination du vaccin sur le poulet va dépendre:

- du type de contaminant
- du degré de contamination
- de la voie d'administration du vaccin
- de la résistance ou de la sensibilité de chaque oiseau.

4.6 Essais en laboratoire du vaccin I-2 de MN

Le vaccin I-2 de MN a été testé en laboratoire dans plusieurs pays et s'est avéré être protecteur contre les souches locales virulentes du virus de la MN (Amakye-Anim et al. 2000; Tu et al. 1998; Hlaing et al. 2000; Wambura, Kapaga et Hyera 2000). Les producteurs ou les distributeurs nationaux de vaccins devraient conduire des épreuves de vaccination dans leurs propres pays afin de prouver l'activité et l'efficacité du vaccin en conformité avec les exigences des autorités de régulation. En plus, les producteurs pourront aussi:

- comparer les niveaux de protection des différentes voies d'administration du vaccin et les différents programmes de vaccination.
- confirmer que la souche vaccinale I-2 de la MN assure une protection contre les souches locales virulentes du virus de la MN, et
- former le personnel de laboratoire et de terrain.

Tous les produits biologiques vétérinaires administrés aux animaux doivent être testés pour leur sécurité et, si possible, pour leur efficacité sur le terrain à l'aide de bonnes pratiques cliniques, avant d'être autorisés pour un usage général. Les études de terrain sont conçues pour démontrer l'efficacité dans des conditions de travail et pour détecter les réactions inattendues, y compris la mortalité, qui peuvent ne pas avoir été observées au cours du développement du produit. Dans les conditions réelles il y a beaucoup de variables incontrôlables qui rendent difficile l'obtention de bonnes données sur l'efficacité du vaccin, mais la démonstration de la sécurité est plus fiable.

Les tests devraient être effectués dans l'animal hôte, dans plusieurs lieux géographiques, en utilisant des nombres adéquats d'animaux sensibles. Les animaux inclus dans les tests doivent représenter tous les âges et les conditions d'élevage pour lesquels le produit est destiné; des contrôles non vaccinés doivent être inclus. Les produits testés doivent provenir d'un ou de plusieurs lots de production. Un protocole devrait être développé pour indiquer les méthodes d'observation et les méthodes d'enregistrement.

OIE (2011c)

Les épreuves sur le terrain offrent une excellente occasion non seulement de remplir les exigences réglementaires pour confirmer que le vaccin est sécuritaire et efficace dans les conditions réelles mais aussi pour concevoir, tester et évaluer du matériel de vulgarisation adapté aux conditions locales.

Alders et Spradbrow (2001) donnent une description détaillée de la conception, des matériels, méthodes et protocoles de laboratoire et des épreuves sur le terrain. Le Tableau 4 montre une chronologie possible pour épreuves en laboratoire. Les poulets SPF sont préférables, mais si ceux-ci ne sont pas disponibles, il est possible d'utiliser des poulets provenant d'un élevage commercial. Les poulets doivent être obtenus à l'âge de un jour (ou avoir éclos dans des conditions de contrôle dans un laboratoire) et doivent être gardés en isolement jusqu'à ce que les anticorps maternels aient diminué (c'est-à-dire à l'âge de trois semaines environ).

Tableau 4 Chronologie pour les épreuves en laboratoire

Jour 1	Placer les poussins dans une couveuse isolée.
Jour 21 (3 semaines)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Répartir les poussins au hasard dans des groupes expérimentaux (minimum 10 oiseaux par groupe), y compris un groupe de contrôle. 2. Placer les groupes dans une unité de la couveuse réservée aux expériences et mettre le groupe de contrôle (non vacciné) dans une unité d'isolement séparée et si possible avec un personnel soignant différent. 3. Mettre un clip (ou bague) à l'aile de chaque poussin et récolter un échantillon de sérum pour chacun. 4. Vacciner les poussins dans les groupes expérimentaux, en enregistrant le numéro de lot et la date d'expiration du vaccin. 5. Inclure des poussins non vaccinés 'de contact' dans chaque groupe (pour tester la propagation du virus entre les oiseaux). 6. Effectuer le test d'IH sur tous les échantillons de sérum.
Jour 35 (5 semaines)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prélever des échantillons de sérum chez tous les oiseaux. 2. Effectuer le test d'IH sur tous les échantillons de sérum.
Jour 49 (7 semaines)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prélever des échantillons de sérum chez tous les oiseaux. 2. <i>Si les poulets doivent être exposés au virus virulent de la MN, mettre en contact les poulets inoculés par voie intra nasale avec la souche virulente d'épreuve avec les groupes vaccinés et les groupes de contrôle. Observer tous les groupes tous les jours. Enregistrer les signes cliniques et les mortalités.</i> 3. Effectuer le test d'IH sur tous les échantillons de sérum.
Jour 63 (9 semaines)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prélever du sérum chez tous les poulets survivants. 2. Effectuer le test d'IH sur tous les échantillons de sérum.

NOTE:

- Il faut utiliser des poussins âgés de 3 semaines totalement sensibles, non vaccinés (ayant un titre IH de moins de 2¹), avec au moins 10 oiseaux par groupe. S'il y a une incertitude sur l'état d'anticorps des poussins, recueillir du sérum et effectuer un test IH sur tous les échantillons avant que les oiseaux ne soient inclus dans l'expérience. Seulement les poussins avec un titre IH de moins de 2¹ devraient être inclus dans l'expérience.
- Puisque des formes pathogènes du virus de la MN sont utilisées dans les expériences d'épreuves, les installations utilisées pour abriter les oiseaux doivent répondre aux exigences de l'OIE pour le confinement des agents pathogènes du Groupe 4 (OIE 2011d).
- Les oiseaux de contrôle doivent être placés dans une unité d'isolement séparée et une stricte biosécurité doit être en place pour prévenir la propagation du virus entre les groupes.
- La voie de vaccination doit être similaire à la voie habituelle utilisée sur le terrain.
- La voie d'inoculation pour l'épreuve d'activité du vaccin doit être similaire à la voie naturelle d'infection, par inhalation ou par ingestion du virus infectieux (Alexander 1998). Ces voies d'infection permettent de tester la protection conférée par l'immunité circulante (humorale ou cellulaire) et locale (mucosale).

Bien qu'il ne soit pas possible de connaître la dose d'épreuve par oiseau avec précision en utilisant ces voies, quand un oiseau meurt il est certain que la dose d'épreuve contient au moins une dose létale moyenne pour poulet (DL_{50}).

Bien que l'injection intramusculaire fournisse l'effet mortel le plus reproductible chez les oiseaux entièrement sensibles et qu'elle garantisse que la dose d'épreuve soit connue, il s'agit d'une voie d'infection non naturelle. De plus, seule la protection conférée par les anticorps circulants ou humoraux est testée.

- Les vaccins efficaces de type lentogène devraient fournir une protection complète avec une dose administrée par instillation oculaire sur le terrain.

4.7 Préparation du sérum

Équipement et matériels

Tubes Eppendorf de 2 ml ou Cryotubes à fond plat avec un bouchon à vis
Portoir ou boîte de stockage

Procédure

1. Prélever un échantillon de 0,5 à 1,0 ml de sang à partir de la veine de l'aile du poulet. Étiqueter la seringue avec le numéro du poulet.
2. Tirer sur le piston de la seringue de manière à laisser un espace d'air entre le sang et l'extrémité de la seringue. S'assurer qu'il n'y a pas de sang dans le cône de la seringue. Placer la seringue de manière oblique avec l'extrémité de l'aiguille orientée vers le haut (pour augmenter la surface de coagulation)
3. Placer les échantillons dans un endroit chaud et laisser le sérum se séparer du caillot. Une bonne séparation du caillot est obtenue si le sang est laissé à 37°C pendant au moins quatre heures ou à température ambiante pendant toute une nuit.
4. Retirer doucement l'aiguille de la seringue et maintenir la pointe de la seringue au-dessus d'un tube Eppendorf. Retirer le piston de la seringue. Le caillot doit rester attaché au piston et le sérum devrait s'écouler depuis la pointe de la seringue dans le tube.
5. Si le sérum ne s'écoule pas facilement hors de la seringue ou si le caillot ne reste pas attaché au piston, il est peut-être nécessaire de verser le sérum dans un tube Eppendorf ou d'utiliser une pipette Pasteur en verre pour aspirer le sérum. Retirer l'étiquette de la seringue et la placer sur le tube Eppendorf.
6. Centrifuger les tubes Eppendorf dans une microcentrifugeuse pendant 30 secondes et verser le sérum dans de nouveaux tubes Eppendorf ou de nouveaux cryotubes, en prenant soin de ne pas perturber le culot de globules rouges. Retirer l'étiquette du premier tube Eppendorf utilisé et la placer sur le nouveau tube Eppendorf ou sur le cryotube.
7. Placer les tubes dans un portoir ou une boîte de stockage pour les maintenir en position verticale.
8. Pour un stockage à court terme (jusqu'à deux semaines), placer les sérums à 4°C. Pour un stockage à long terme, placer le sérum dans un congélateur à -20°C ou à -70°C.

NOTE:

- Manipuler le sang en douceur. Les échantillons de sérum hémolysés ou contaminés peuvent donner de faux résultats.
- Conserver les tubes en position verticale lors de la congélation. Cela permettra d'assurer que le sérum reste au fond du tube et réduira les pertes qui peuvent survenir lorsque les tubes sont ouverts après la décongélation.

- Le stockage du sérum à -70°C est idéal car les enzymes présentes dans le sérum continueront à dégrader les protéines s'il est stocké à -20°C (Catty et Raykundalia 1988).
- Il est préférable de diviser chaque échantillon de sérum en deux aliquots si de nombreux tests doivent être effectués sur chaque échantillon. Des cycles répétés de congélation/décongélation peuvent influencer les résultats des tests.
- Des étiquettes convenables pour les seringues et les tubes peuvent être fabriquées à partir de bande Dermicel ou de ruban adhésif. Ces étiquettes peuvent être transférées de la seringue au tube Eppendorf et ensuite aux tubes de stockage de sérum. Cela économisera du temps et réduira les erreurs dans la transcription des nombres et des dates.

4.8 Titrage des anticorps (test d'inhibition d'hémagglutination)

Les poulets infectés par le virus de la MN suite à une exposition naturelle sur le terrain ou suite à la vaccination développent des anticorps contre le virus. Généralement les anticorps peuvent être détectés et mesurés dans le sérum entre six à dix jours après infection par le virus de la MN, en utilisant un certain nombre de tests sérologiques. Le test d'inhibition d'hémagglutination (IH) est le test le plus couramment utilisé pour détecter des anticorps au virus de la MN. Il est facile à faire, économique, et ne nécessite aucun équipement coûteux.

Le principe du test IH est l'inhibition (la prévention) de l'hémagglutination par des anticorps spécifiques. Si le virus de la MN est ajouté au sérum contenant des anticorps contre le virus de la MN, l'anticorps s'attache au virus. Le virus de la MN attaché à un anticorps ne sera pas en mesure de réagir avec les globules rouges et l'hémagglutination ne se produira pas. Là où il y a plus de virus que d'anticorps, l'hémagglutination sera observée puisqu'il y aura encore du virus libre disponible. Lorsqu'il y a plus d'anticorps que de virus, ou suffisamment d'anticorps pour réagir avec tous les virus, l'hémagglutination ne sera pas observée.

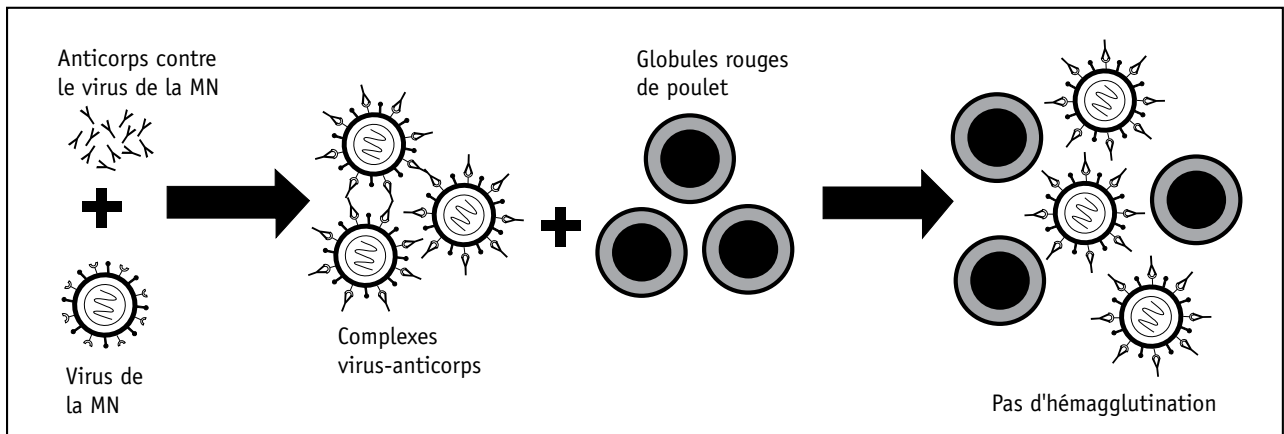


Figure 12: Principe d'inhibition d'hémagglutination.

Il existe un certain nombre de variations dans la façon dont le test est réalisé et ces facteurs influencent les résultats finaux des tests. Par exemple, la concentration de l'antigène HA (virus de la MN) utilisée affectera la sensibilité du test et les titres de sérums d'anticorps varieront en fonction de la quantité d'antigène utilisé. Une concentration élevée de l'antigène HA (jusqu'à 8 unités d'HA) entrainera une diminution de sensibilité, tandis qu'une concentration plus faible entrainera une augmentation de sensibilité. D'autres variables peuvent également affecter les résultats: par exemple, la concentration de la suspension de globules rouges;

le temps entre le mélange sérum et de l'antigène et l'addition des globules rouges, la température et les critères utilisés pour la lecture du test (Thayer et Beard 1998). Par conséquent, il est important d'utiliser un protocole standard pour le test car cela permettra de comparer les résultats entre laboratoires.

La technique décrite ici utilise 4 unités d'HA (Allan et Gough 1974) et a donné les résultats les plus cohérents dans nos laboratoires. Le test est effectué dans des plaques avec un fond en V où le motif d'hémagglutination des globules rouges est plus facile à lire.

4.8.1 Préparation de l'antigène pour le test d'inhibition d'hémagglutination

Le liquide allantoïdien contenant le virus de la MN sert d'antigène dans le test IH. Il peut être préparé à partir d'un lot du vaccin I-2 de la MN produit dans l'unité de production de vaccins ou à partir d'un flacon de vaccin préparé à partir d'une souche avirulente du virus de la MN, telle que la souche Ulster ou la souche V4 (Maas et al. 1998). Les souches non virulentes du virus de la MN donnent des résultats plus fiables dans le test IH. Si une expérience nécessitant un grand nombre de tests IH est prévue, préparer un gros lot d'antigène et utiliser le même lot tout au long de l'expérience. Stocker l'antigène en aliquots de 1 ml à -20°C .

4.8.2 Test d'inhibition d'hémagglutination

Chaque jour avant que le test IH ne soit effectué sur les échantillons de sérum à tester, certains contrôles préalables doivent être effectués.

- Il faut déterminer le nombre d'unités HA dans la suspension d'antigène en utilisant le test HA. La suspension d'antigène est ensuite diluée de sorte que 25 μL contiennent 4 unités d'HA.
- Un 'titrage de retour' est réalisé avec la suspension diluée pour confirmer que la dilution est correcte.
- La vérification préalable finale confirme que les sérums de contrôle positifs et négatifs donnent les résultats espérés dans le test IH.

Si ces contrôles préliminaires ne sont pas faits, de précieux échantillons de sérum peuvent être gaspillés et les résultats du test IH peuvent être peu fiables et imprécis.

Équipement et matériels

PBS

Suspension d'antigène du virus de la MN

Suspension à 1% de globules rouges

Plaques de microtitration de 96 puits à fond en V

Pipettes en verre (1 et 10 ml)

Pipetmans (200–1000 μL et 10–200 μL) et cônes

Sérum de contrôle négatif (voir Section 4.8.4)

Sérum de contrôle positif (voir Section 4.8.5)

Sérums à tester

Procédure

Préparation de 4 unités d'HA de suspension d'antigène du virus de la MN

1. Utiliser le test quantitatif HA (voir section 4.3.2), titrer la suspension d'antigène de virus de la MN et calculer le titre HA.
2. Diviser le titre HA par quatre pour calculer le facteur de dilution.

3. Calculer le volume de la suspension d'antigène dilué nécessaire. Il faut 2,5 ml pour chaque plaque de microtitration.
4. Mesurer le volume de suspension d'antigène nécessaire et diluer dans du PBS, en utilisant le facteur de dilution calculé ci-dessus.

Exemple pratique

Le titre HA de la suspension d'antigène du virus de la MN est de 1:64 (2^6).

1. Calculer le facteur de dilution.
2. Calculer le volume de la suspension d'antigène dilué nécessaire pour quatre plaques.
3. Calculer le volume de la suspension d'antigène et le volume de PBS qui doit lui être mélangé pour obtenir le volume de la suspension d'antigène dilué.

$$1. \text{ Facteur de dilution} = \frac{2^6}{4} = \frac{64}{4} = 16$$

Donc la suspension d'antigène du virus de la MN doit être diluée au 16^{ème} avant qu'il ne soit utilisé dans le test IH (une dilution au 16^{ème} signifie qu'un volume de la suspension d'antigène doit être mélangé avec 15 volumes de PBS pour obtenir une concentration finale de 4 unités HA).

2. Si quatre plaques vont être utilisées:

$$\text{Le volume de 4 unités HA requis} = 4 \text{ plaques} \times 2,5 \text{ ml/plaque} = 10 \text{ ml}$$

Il est prudent de préparer un peu plus d'antigène que ce dont on a besoin dans l'immédiat. De l'antigène supplémentaire pourrait être nécessaire pour remplacer un liquide renversé ou pour répéter des tests douteux. Cela permet également au technicien de laboratoire de sélectionner un volume qui permet des calculs mathématiques simples, réduisant ainsi le risque d'erreur. Dans l'exemple présent, le volume requis d'antigène de travail est de 10 ml. Le liquide allantoïdien (64 unités HA dans 25 µL) doit être dilué de 1 à 16 pour produire l'antigène de travail (4 unités HA dans 25 µL). Un procédé commode serait de diluer 1 ml de liquide allantoïdien dans 15 ml de PBS, ce qui donne 16 ml d'antigène de travail à la concentration requise. D'autres solutions sont possibles, par exemple 0.8 ml de liquide allantoïdien dans 12.0 ml de PBS.

Les calculs sont faciles à faire pour de plus grands volumes d'antigène de travail ou pour des facteurs de dilution différents. Il faut toujours se rappeler que, même si les formules mathématiques semblent infaillibles, un titrage de l'antigène de travail doit être inclus dans le test

Titration en retour de la suspension d'antigène dilué

5. Utiliser le test HA (voir Section 4.3.2), titrer la suspension d'antigène dilué du virus de la MN.
6. Confirmer que le titre HA de la suspension diluée est de 4 (à savoir, 2^2).

Confirmation du titre des sérums standards positifs et négatifs

7. Utiliser le test IH (voir la procédure ci-dessous) pour titrer les sérums positifs et négatifs.
8. S'assurer que le titre HA du sérum positif est de 2^5 (voir Section 4.8.5) et que le sérum négatif est de 2^1 ou moins (voir Section 4.8.4).

Test des Sérums

9. Calculer le nombre de plaques requises et numéroter chaque plaque avec un crayon marqueur. S'il y a suffisamment de sérum, il est bon de faire les tests en double.
10. Ajouter 25 µL de PBS dans chaque puits d'une plaque de microtitration de 96 puits à fond en V.
11. Agiter le sérum doucement pour le mélanger. Ajouter 25 µL de sérum au premier et au dernier puits de chaque rangée (contrôle).
12. En utilisant une pipette multicanaux, faire des dilutions en série de deux en deux de chaque échantillon de sérum à travers la rangée en transférant 25 µL de liquide de puits en puits (voir Annexe 8). S'arrêter à l'avant-dernier puits.
13. Jeter 25 µL de liquide de l'avant-dernier puits de chaque rangée. Ne pas diluer le dernier puits de chaque rangée (contrôle, douzième).
14. Ajouter 25 µL d'unités de 4 HA à chaque puits (mais pas au puits de contrôle).
15. Tapoter doucement sur le côté de la plaque pour mélanger, couvrir et laisser reposer à température ambiante pendant 30 minutes.
16. Ajouter 25 µL d'une suspension à 1% de globules rouges dans chaque puits.
17. Tapoter doucement sur le côté de la plaque pour mélanger, recouvrir et laisser reposer à température ambiante pendant 45 minutes.
18. Lire le motif d'agglutination. Enregistrer les résultats comme le montre les Figures 13 et 14: pas d'hémagglutination ☉ ou hémagglutination ☉.
19. Déterminer le point final. C'est le puits qui montre une inhibition complète de l'hémagglutination.
20. Noter le titre d'anticorps pour chaque échantillon. Le titre est enregistré comme la dilution de sérum la plus forte qui provoque une inhibition complète d'hémagglutination. Les résultats IH pour chaque oiseau sont généralement exprimés comme la valeur inverse (positive) du point final de la dilution de sérum.

NOTE:

- Des contrôles doivent toujours être inclus dans le test IH:
 - des puits contenant des sérums de contrôle positifs et négatifs (avec titre IH connu)
 - un puits contenant du sérum, du PBS et la suspension de globules rouges seulement, mais sans antigène. Ceci constitue le contrôle de la suspension de globules rouges et teste les agglutinines naturelles dans le sérum.
- Il est important que les résultats des tests soient lus le plus tôt possible, à la fin des 45 minutes d'incubation. Après un certain temps, le virus est élué – c'est-à-dire que les cellules agglutinées se dissocient et les globules rouges vont tomber au fond des puits. Ainsi, un échantillon négatif peut ne pas présenter d'hémagglutination et paraîtrait positif. L'éluion du virus se produit plus rapidement à des températures plus élevées.
- Lire les puits de contrôle en premier.
- Souvent, il n'y a qu'un faible volume de sérum de chaque poulet disponible pour faire les tests. Il est donc important que le nombre d'unités d'antigène HA soit normalisé et que les titres de sérums de contrôle positifs et négatifs soient confirmés avant que ce sérum précieux ne soit utilisé.

- Si l'échantillon de sérum dans le dernier puits de la rangée (le douzième puits) indique une hémagglutination, cela veut dire qu'il y a des agglutinines naturelles dans l'échantillon et elles devront être absorbées (voir Section 4.8.6).
- Les sérums de poulet contiennent rarement des inhibiteurs non spécifiques, mais s'ils sont présents ils donneront lieu à des résultats IH erronés. Les échantillons peuvent être inactivés par la chaleur dans un bain-marie à 56°C pendant 30 minutes. Si une inactivation supplémentaire est nécessaire, les échantillons doivent être traités avec du périodate de potassium (Burlison, Chambers et Wiedbrauk 1992).
- Le point final n'est pas toujours facile à déterminer. Comparer la taille du culot des globules rouges à celle du culot des globules rouges dans les puits de contrôle
- Pour économiser les ressources, il faut toujours tenir compte de l'origine des échantillons et des résultats espérés avant de commencer le test IH.
- Les poulets vaccinés qui ont survécu une épreuve par le virus de la MN virulent peuvent développer des titres d'anticorps IH de plus de 2^{12} et le point final ne sera pas atteint dans une seule rangée de la plaque.

Eventuels problèmes pouvant être rencontrés en lisant la plaque de contrôle

Titrage de retour de 4 unités d'HA:

- Si l'hémagglutination se produit au-delà des deux premiers puits (1 et 2), cela signifie qu'il y a plus de 4 unités HA dans l'hémagglutinine. Si une grande quantité de la solution d'hémagglutinine a été préparée, elle devrait être titrée à nouveau et du PBS rajouté pour atteindre 4 unités d'HA. Alternativement le titre d'hémagglutination de la solution initiale peut être retesté et la solution peut être diluée à nouveau pour donner 4 unités d'HA.
- Si l'hémagglutination se produit dans moins de deux puits, il y a donc moins de 4 unités d'HA dans l'hémagglutinine. Le titre d'hémagglutination de la solution initiale doit être à nouveau testé et la solution initiale peut être diluée en conséquence, pour donner 4 unités d'HA.

Sérums de contrôle positif et négatif:

- S'il y a plus de 4 unités d'HA dans la suspension d'antigène du virus de la MN (> 4 unités d'HA, donc trop de virus), le test donnera un titre d'IH généralement faible ou des résultats faussement négatifs d'IH. Le contrôle positif sera plus bas que 32 (2^5).
- S'il y a moins de 4 unités d'HA dans la suspension d'antigène du virus de la MN (< 4 unités d'HA, donc pas assez de virus), le test donnera un titre d'IH généralement élevé ou des résultats faussement positifs d'IH. Le contrôle positif sera supérieur à 32 (2^5) et le contrôle négatif pourrait être supérieur à 2^1 .

Pour corriger ce problème, recalculer la dilution de l'antigène pour obtenir 4 unités d'HA et tester à nouveau la plaque de contrôle.

Suspension de globules rouges:

- Si la suspension de globules rouges n'est pas fraîche et qu'elle est hémolysée, il est possible que les cellules ne puissent ni s'agglutiner ni se déposer en culot. Il sera difficile de lire le point final. Pour corriger le problème, utiliser une suspension fraîche de globules rouges.

Un résultat positif d'IH indique une exposition antérieure au virus de la MN par vaccination ou par infection naturelle. Pour confirmer une infection récente, il est nécessaire de prélever le sérum du même oiseau à la phase aiguë de la maladie et durant la convalescence et le tester pour confirmer une augmentation de titre.

Il existe une bonne corrélation entre le niveau d'anticorps spécifiques du virus de la MN et le niveau d'immunité chez les oiseaux âgés de plus de 6 semaines. Le test IH permet de prédire l'issue probable d'infection par le virus virulent de la MN à différents niveaux d'immunité:

- Titre négatif IH — <1:8 (2³)** — les oiseaux ne sont probablement ni immunisés ni infectés
- Titre positif IH — 1:8 (2³) ou plus haut** — ce niveau devrait protéger contre la mort dans les infections sans complications; il n'empêchera pas une certaine répllication du virus virulent et il est possible d'observer une perte en production d'œufs.

Test d'inhibition de l'hémagglutination

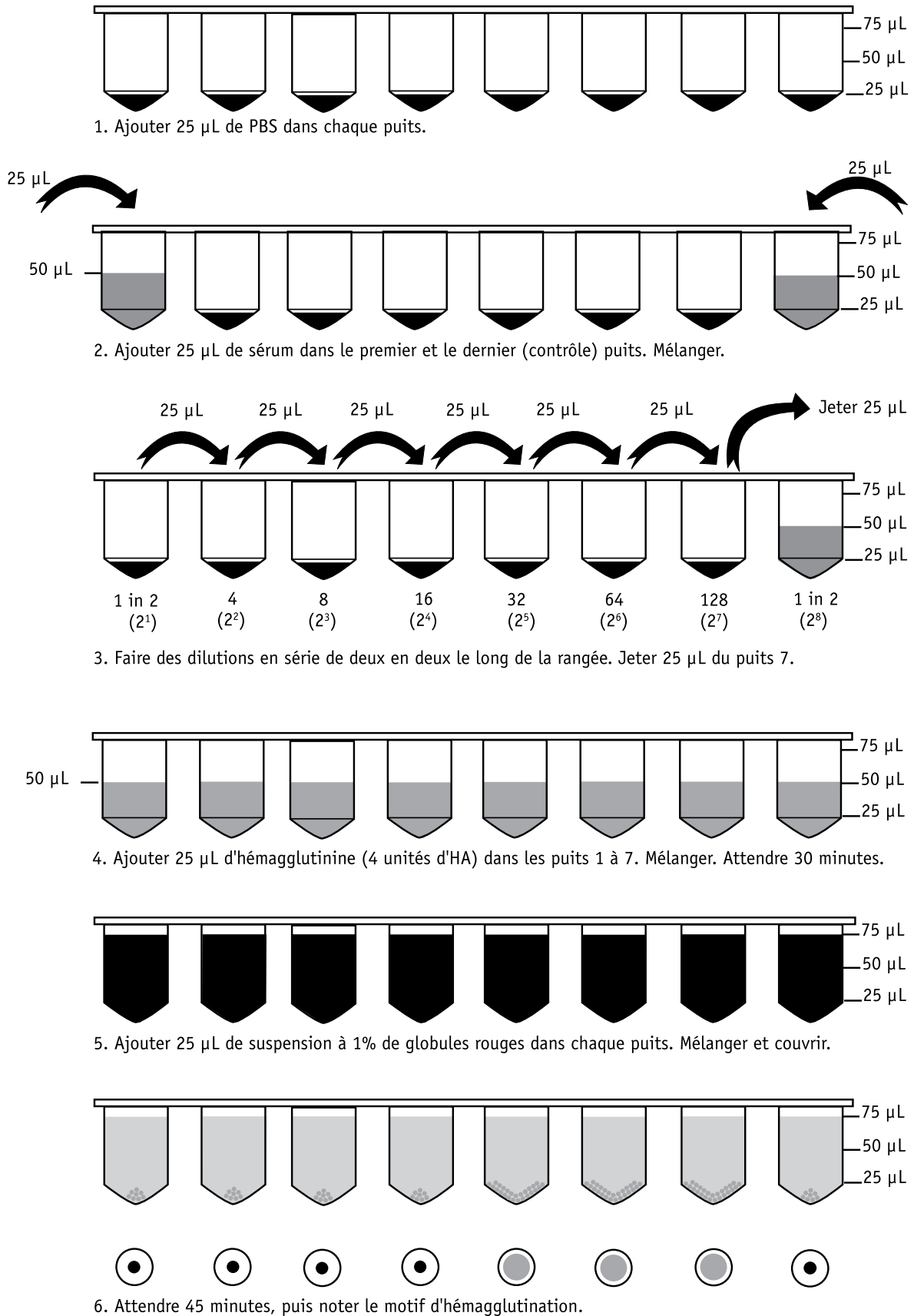


Figure 13: Test d'inhibition d'hémagglutination.

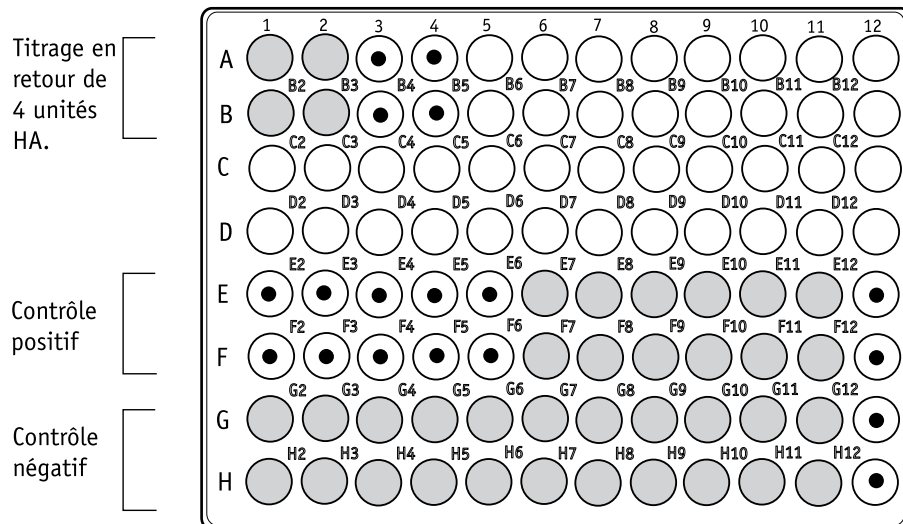


Figure 14: *Plaque de microtitration de 96 puits à fond en V mise en place pour le test IH. Tous les titrages sont effectués en double. Les rangées A et B montrent le résultat du titrage en retour de 4 unités HA (titre HA de 4 ou 2²). Les rangées E et F montrent les résultats du titrage du sérum de contrôle positif (titre IH de 32 ou 2⁵) et les rangées G et H montrent les résultats du titrage du sérum de contrôle négatif (titre IH de 0 ou 2⁰ ou pas de titre). La colonne 12, rangées E à H montrent le motif normal d'hémagglutination des globules rouges non-agglutinés. Ces puits contiennent seulement du sérum, du PBS et la suspension de globules rouges.*

4.8.3 Exercices

Les quatre plaques de la Figure 15 montrent les résultats de tests IH réalisés sur des échantillons de sérum prélevés sur le terrain par l'agent vétérinaire de district (agent vétérinaire régional, départemental, d'arrondissement). Les tests ont été effectués en double. Regarder les plaques et répondre aux questions suivantes. Donner des explications pour vos réponses.

1. Le test IH a-t-il fonctionné comme prévu?
2. Quel est le titre IH pour chacun des échantillons de sérum?
3. Est-ce que le poulet sera protégé en cas de foyer de la MN?
4. Le sérum 1 a été recueilli à partir d'un oiseau vacciné récemment. Quel aurait dû être le titre? Pourquoi le résultat est-il si bas?
5. Les rangées E et F de la première plaque montrent les résultats des tests de l'échantillon 3 en double. Qu'est-ce qui a pu arriver pour provoquer cette incohérence?
6. Le titre de l'échantillon 8 (rangées G et H de la deuxième plaque) est très haut et ne peut être déterminé dans ce test. S'il s'agit d'une lecture correcte, qu'est-ce qui aurait pu la causer? Comment peut-on déterminer le titre réel de cet échantillon? Si ce résultat élevé est une erreur technique, quelle pourrait en être la cause?
7. Des tests sur les échantillons des sérums 9, 10, 13 et 14 ont été effectués en double, mais les résultats des deux tests ne sont pas les mêmes. Que peut-on faire pour confirmer les résultats? S'il ne reste pas suffisamment de sérum pour refaire le test, quel titre enregistrer sur le formulaire de rapport?

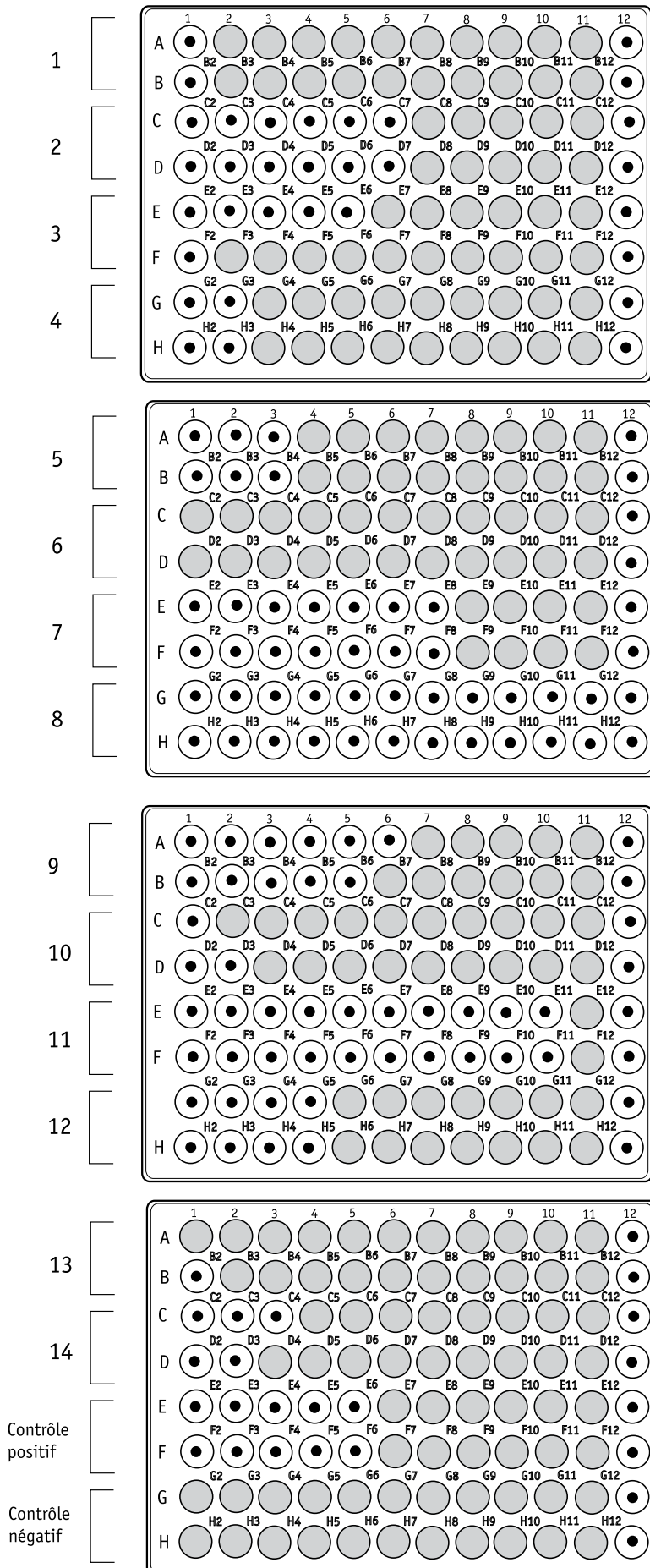


Figure 15: Exercices de tests IH.

4.8.4 Préparation du sérum de contrôle IH-négatif

Le sérum de contrôle IH-négatif idéal ne contient pas d'anticorps contre le virus de la MN. Il n'a pas de titre IH et n'agglutine pas les globules rouges de poulet. S'il est difficile de trouver des poulets avec du sérum sans titre IH, un sérum positif avec de faibles titres IH de 2^1 ou 2^2 peut être utilisé.

Procédure

1. Prélever du sang de poulets sains et normaux.
2. Laisser le sang se coaguler.
3. Séparer le sérum du caillot, mélanger les échantillons et centrifuger. (Voir Section 4.7).
4. Tester le sérum en utilisant le test IH (voir Section 4.8.2) afin de confirmer que le sérum a un titre de 2^1 ou moins.
5. Conserver à -20°C en aliquots de 1 ou 2 ml.

NOTE:

Dans les zones où il est difficile de trouver des oiseaux sans titre IH ou à titre IH bas, les échantillons de sérum d'oiseaux individuels devraient être testés et seulement ceux avec des titres IH adéquats devraient être mélangés

4.8.5 Préparation du sérum de contrôle IH-positif

Le sérum de contrôle IH-positif contient des anticorps contre le virus de la MN. Le titre du sérum doit être dans la gamme de 2^4 à 2^8 . Généralement le sérum de référence est préparé par des laboratoires internationaux ou nationaux pour la distribution aux plus petits laboratoires, et ce sérum est généralement coûteux. Le laboratoire national devra alors préparer une grande quantité de sérum positif à titre équivalent pour l'utilisation interne ou pour distribuer aux laboratoires provinciaux ou aux annexes. Le titre IH du sérum est établi par titrage répété. Le protocole ci-dessous est basé sur celui décrit par Alexander (1998).

Procédure

1. Vacciner avec des gouttes oculaires ou nasales plusieurs poulets âgés de 6 à 9 semaines avec le vaccin I-2 de la MN.
2. Vacciner les poulets à nouveau deux semaines plus tard.
3. Sacrifier les poulets trois semaines après la seconde vaccination et recueillir autant de sang que possible.
4. Laisser le sang se coaguler.
5. Séparer le sérum du caillot, mélanger les échantillons.
6. Centrifuger le sérum et le conserver à -20°C en aliquots de 1 ou 2 ml.
7. Tester le sérum par IH par rapport au sérum de référence positif pour déterminer le titre IH. Utiliser de l'antigène fraîchement titré et dilué. Le titre du sérum doit être dans la gamme de 2^4 à 2^8 (il est préférable d'utiliser du sérum avec un titre de 2^4 ou 2^5 ainsi moins de sérum sera requis pour produire le sérum de contrôle de référence comparable aux normes nationales ou internationales).
8. Répéter plusieurs fois pour confirmer le titre IH.

Un test supplémentaire peut être utilisé pour confirmer le titre IH du sérum.

1. Préparer une dilution en série de deux en deux du sérum de 1:2 à 1:64.
2. Test par IH. Les résultats des tests devraient montrer que le titre IH du sérum de référence est égal au titre IH prédéterminé (voir ci-dessus: 2^4 à 2^8).
3. Dispenser le sérum en aliquots, étiqueter et conserver au congélateur à -70°C . Si un congélateur à -70°C n'est pas disponible, -20°C est suffisant.

Un sérum positif de référence peut également être préparé à partir d'échantillons de sérums IH-positifs stockés.

1. Mélanger les échantillons avec des titres égaux ou supérieurs au contrôle de référence positif et tester par IH contre le sérum de contrôle de référence positif jusqu'à dix fois. Utiliser 4 unités HA d'antigène, fraîchement préparées, pour chaque test. Si c'est possible, faire les tests à des jours différents.
2. Comparer les résultats. Le titre survenant le plus fréquemment peut être considéré comme le titre IH du sérum de référence.
3. Diluer le sérum dans du PBS ou du sérum IH-négatif jusqu'à ce que le titre des sérums mélangés soit égal au titre du sérum de contrôle de référence positif.

4.8.6 Adsorption d'agglutinines naturelles

Parfois, les puits de contrôle de sérum dans le test IH peuvent montrer une hémagglutination pour des échantillons particuliers de sérum de poulet. Ces sérums contiennent des agglutinines naturelles et ceci provoque une interaction avec les globules rouges, provoquant l'agglutination. Si le point final est difficile à lire, les agglutinines doivent être éliminées par adsorption avec des globules rouges de poulet pour que les échantillons puissent être retestés.

Équipement et matériels

Suspension à 1% de globules rouges

Tubes Eppendorf

Pipetman (jusqu'à 1000 μL) et cônes

Microcentrifugeuse

Procédure

1. Placer 200 μL de suspension à 10% de globules rouges dans un tube Eppendorf.
2. Centrifuger pendant 15 secondes.
3. Jeter le surnageant.
4. Agiter doucement l'échantillon de sérum pour le mélanger. Prendre 500 μL du sérum et ajouter aux globules rouges dans le tube Eppendorf. Agiter doucement.
5. Laisser reposer pendant au moins 30 minutes à 4°C .
6. Centrifuger dans la microcentrifugeuse pendant 15 secondes.
7. Transférer le surnageant (sérum) dans un tube Eppendorf propre aussi vite que possible.

NOTE:

Suivre les instructions des étapes 4 à 7 de près, afin de minimiser les risques de dissociation des agglutinines naturelles des globules rouges.

4.8.7 Calcul de la moyenne géométrique des titres (MGT)

Les valeurs moyennes de données telles que les titres IH sont exprimées sous forme de logs et sont calculées et exprimées en moyennes géométriques plutôt qu'en moyennes arithmétiques. Ainsi les effets des résultats qui divergent beaucoup de la moyenne générale sont minimisés.

La formule générale pour le calcul de la MGT est:

$$MGT = \sqrt[n]{x_1 x_2 x_3 \dots x_n}$$

dans laquelle x = valeur de l'observation, n = nombre d'observations.

Dans notre expérience, la méthode qui suit donne de bons résultats.

Pour calculer la MGT:

1. Calculer le log₂ de chacun des titres du groupe.
2. Ajouter les indices et diviser par le nombre total des échantillons (quand le titre IH est <2¹, l'indice est '0').
3. Il s'agit de la moyenne géométrique des titres.

Exemple pratique

Quatre poulets ont été vaccinés pendant une expérience de laboratoire avec la souche vaccinale I-2 de MN. Leurs titres IH étaient de 2³, 2⁴, 2⁴ et 2⁶. Calculer la MGT.

$$2^3 = 8$$

$$2^4 = 16$$

$$2^4 = 16$$

$$2^6 = 64$$

$$MGT = \frac{3 + 4 + 4 + 6}{4} = \frac{17}{4} = 2^{4.2} = 18.4$$

Sur la calculette utiliser la fonction Y^x

Ceci devrait être écrit : MGT (log₂) ou IH titre (log₂) = 4.2

(La moyenne arithmétique de ces titres serait de 26 en raison de la forte valeur unique de 2⁶ i.e. $\frac{8 + 16 + 16 + 64}{4} = 26$)

4.9 Enquêtes sérologiques

Les enquêtes sérologiques sont un outil important dans la lutte contre les maladies du bétail. Elles peuvent être menées dans une région afin de déterminer la prévalence d'une maladie telle que la MN et pour aider à la planification, la mise en œuvre et le suivi de programmes de lutte contre les maladies. Une bonne planification permettra que des ressources limitées ne soient pas gaspillées et que des informations fiables soient recueillies rapidement, et à moindre coût.

4.9.1 Estimation de la prévalence de la maladie

Les exemples ci-dessous sont basés sur un échantillonnage aléatoire de la population. Souvent, ceci n'est pas possible dans les études sur le terrain et une sorte d'échantillonnage en grappe est effectué sur des groupes particuliers (seulement les oiseaux de certains propriétaires par exemple). Ceci complique l'estimation de la prévalence de la maladie. Il existe des formules compliquées

pour estimer la prévalence en utilisant des échantillons en grappe, mais elles sont souvent peu pratiques à utiliser sur le terrain. Il faut alors faire un compromis entre l'utilisation de formules pour échantillonnage aléatoire et l'acceptation d'une perte de précision dans l'estimation.

1. Echantillonnage à partir d'une grande population (théoriquement) infinie, en utilisant un simple échantillonnage aléatoire

La taille approximative de l'échantillon nécessaire pour estimer la prévalence de maladies peut être déterminée en utilisant un ensemble de tables spécifiques – par exemple, celle de Cannon et Roe (1982) qui donne la prévalence attendue et la précision souhaitée avec plusieurs intervalles de confiance.

Alternativement, une simple formule peut être utilisée pour donner une approximation:

$$n = \frac{4 \times p \times (1 - p)}{L \times L}$$

dans laquelle n = taille de l'échantillon nécessaire, p = prévalence attendue, L = précision souhaitée.

A moins que la prévalence attendue ne soit connue, il est préférable d'utiliser une prévalence attendue de 50%.

Ainsi, la taille de l'échantillon pour déterminer la prévalence de la maladie dans une grande population (infinie) avec une précision de +/-2%, est:

$$n = \frac{(4 \times 50 \times 50)}{(2 \times 2)} = 2500$$

Si la précision est réduite à +/-5%, la taille de l'échantillon est:

$$n = \frac{(4 \times 50 \times 50)}{(5 \times 5)} = 400$$

Dans ce cas et dans les tables mentionnées ci-dessus, la taille de l'échantillon est indépendante du nombre total d'animaux dans la population. Ceci est dû au fait que la prévalence est une proportion: plus la taille de la population étudiée est grande, plus grand sera le nombre d'animaux malades.

Souvent, la taille de l'échantillon est prédéterminée (par exemple, par la disponibilité des animaux), ou la prévalence obtenue à partir d'une enquête est différente de celle qui a été prévue. Dans tous les cas, il faut calculer les intervalles de confiance (c'est-à-dire la précision) de la valeur de la prévalence obtenue à partir de l'enquête. Ceci peut être calculé en utilisant l'équation suivante où L est la précision.

Si, par exemple, après l'échantillonnage de 400 oiseaux, on trouve une prévalence de 70%, la précision de l'estimation est:

$$L = \sqrt{\left(\frac{(4 \times 30 \times 70)}{400}\right)} = \sqrt{21} = 4.6$$

Donc, la prévalence estimée se situe entre 65.4% et 74.6%.

2. Echantillonnage à partir d'une petite population (finie)

La table et le calcul ci-dessus sont acceptables si la taille de la population étudiée est très grande par rapport à la taille de l'échantillon. Pour des raisons statistiques, il est possible de sélectionner dans les petites populations un échantillon plus petit que dans le cas de populations 'infinies' et d'atteindre le même niveau de précision.

La taille requise n^* est donnée par la formule qui suit:

$$n^* = \frac{n}{\left(1 + \frac{n}{N}\right)}$$

dans laquelle n est la taille de l'échantillon, basée sur une population infinie et obtenue à partir du calcul précédent; N est la taille de la population de l'étude.

Donc, pour les exemples ci-dessus, si la taille de la population (nombre de poulets dans un village) est de 500, la taille de l'échantillon nécessaire est:

$$n^* = \frac{2500}{\left(1 + \frac{2500}{500}\right)} = \frac{2500}{6} = 417 \text{ pour une précision de } +/-2\%$$

ou

$$n^* = \frac{400}{\left(1 + \frac{400}{500}\right)} = \frac{400}{1.8} = 223 \text{ pour une précision de } +/-5\%$$

Un tableau de tailles d'échantillon nécessaires pour estimer la prévalence (basée sur une prévalence attendue de 50%) peut être établi comme suit:

Taille de l'élevage	Précision de l'estimation (+/- %)			
	1	2	5	10
100	99	96	80	50
200	196	185	133	67
300	291	268	171	75
400	385	345	200	80
500	476	417	222	83
600	566	484	240	83
700	654	547	255	88
800	741	606	267	89
900	826	662	277	90
1000	909	714	286	91

On peut arrondir ces valeurs pour donner un peu plus de flexibilité à l'estimation.

4.9.2 Déterminer l'efficacité du vaccin

Afin de mesurer si la vaccination est efficace, on peut utiliser un échantillon d'oiseaux suffisamment grand pour déterminer si 80% des oiseaux ont un titre protecteur avec une précision de +/- 10%.

NOTE:

Les théories suggèrent que si au moins 70% de la population est immunisée, les foyers sont peu susceptibles de se produire car il n’y a pas suffisamment de sujets sensibles pour propager la maladie. Donc en travaillant avec un pourcentage de 80% +/- 10% on peut déterminer si plus de 70% de la population est protégée.

Donc le nombre d’oiseaux devant être échantillonnés est le suivant (taille d’échantillon arrondie):

Taille de l'élevage	Taille de l'échantillon
100	40
200	50
300	55
400	55
500	60
600	60
700	60
800	60
900	60
1000	60

Si plus de 80% de l’échantillon ont des titres protecteurs, il est à peu près certain (probabilité de 95%) que la population, à partir de laquelle l’échantillon a été pris, est adéquatement protégée. Si moins de 80% de l’échantillon ont des titres protecteurs, on peut supposer que la population n’est que partiellement protégée.

S’il n’est pas possible d’obtenir un bon échantillon représentatif, prélever des échantillons comme indiqué ci-dessus, et utiliser un seuil d’efficacité du vaccin à 90% pour évaluer la protection de la population.

4.9.3 Exercices

Exercice 1: Combien d’oiseaux provenant d’un élevage de 50 oiseaux vaccinés, faut-il saigner afin de déterminer le niveau d’immunité de l’élevage? Même question pour un élevage de 100 oiseaux, et 200 oiseaux?

Exercice 2: Le personnel de terrain vous a contacté en disant que par erreur les oiseaux ont été vaccinés à l’aide d’un vaccin périmé, mais aucun flacon de ce lot n’est disponible pour des tests. Comment allez-vous gérer cette situation?

Exercice 3: Le personnel d’un laboratoire provincial a effectué une enquête de séroprévalence de la MN et a constaté que seulement 1% des oiseaux étaient positifs et avaient des anticorps contre la MN. Des vétérinaires sur le terrain ont indiqué que la MN a été un problème majeur. Comment interprétez-vous les résultats?

5.0

Aspects pratiques de la distribution du vaccin I-2 de la MN

5.1 Recommandations générales pour la lyophilisation du vaccin I-2 de la MN

La lyophilisation est un moyen de préserver un produit biologique pour augmenter la durée de sa conservation, faciliter son transport et réduire sa vitesse de dégradation. Lors de la lyophilisation, l'eau et l'oxygène, qui jouent un rôle important dans la dégradation du vaccin, sont extraits du produit sans perturber sa structure. Une lyophilisation correcte ne devrait pas réduire l'infectivité (l'activité) ou la stabilité du virus ou du vaccin de manière significative.

Une lyophilisation inefficace peut entraîner une perte importante de titre ou des problèmes d'humidité résiduelle du vaccin. Une humidité résiduelle élevée se traduit par une mauvaise stabilité de vaccin, alors qu'un séchage excessif peut entraîner l'inactivation du virus.

Puisque le mode de fonctionnement varie d'un type de lyophilisateur à l'autre, seuls les aspects généraux de la lyophilisation seront considérés ici. Pour une description du processus de la lyophilisation, voir Mariner (1997) et les instructions accompagnant l'unité de lyophilisation.

En général, s'assurer que:

- il y a suffisamment de personnel qualifié et fiable pour faire fonctionner le lyophilisateur
- il y a un roulement du personnel pendant les périodes d'activité intense
- il y a des fonds pour payer les heures supplémentaires du personnel (la lyophilisation est un long processus et nécessitera des heures supplémentaires de travail)
- le lyophilisateur est calibré et entretenu régulièrement
- Un seul type de vaccin est lyophilisé à la fois
- les procédures de routine telles que le nettoyage et les contrôles du vide sont effectuées avant chaque cycle de lyophilisation.

5.2 Inspection du vaccin après lyophilisation

Après lyophilisation, les flacons de vaccin doivent être inspectés pour:

- l'intégrité du vide – les bouchons en caoutchouc doivent être fermement enfoncés dans le flacon, et le dessus du bouchon doit être déprimé s'il a été scellé sous vide
- la couleur de la pastille lyophilisée – les pastilles du vaccin doivent être d'une couleur uniforme
- la consistance de la pastille lyophilisée – la pastille du vaccin doit être compacte (comme un cachet) et homogène après dilution
- la présence de corps étrangers.

Si la pastille a une couleur irrégulière ou montre des signes d'ébullition, la lyophilisation n'a pas été faite correctement et la stabilité du vaccin et son infectivité seront affectées. Le vaccin doit être jeté.

La teneur résiduelle en humidité du vaccin lyophilisé doit être mesurée (VICH 2002). Un excès d'humidité résiduelle dans le vaccin va influencer sa stabilité et la période de son stockage. L'intégrité du vide doit également être confirmée (Allan, Lancaster et Toth 1978).

Après inspection, les flacons sont scellés à l'aide de capsules en aluminium. Lorsque le laboratoire produit d'autres vaccins en plus du I-2, il serait prudent d'utiliser des bouchons ou capsules colorés.

5.3 Test de stabilité du vaccin

Les tests de stabilité permettent d'évaluer la manière dont la qualité d'un vaccin varie avec le temps dans des environnements différents. Les résultats de ces tests permettent d'établir les conditions de stockage et la durée de conservation du vaccin. Les tests devraient porter sur les facteurs qui peuvent changer au cours du stockage et qui sont susceptibles d'influencer la qualité, la sécurité et/ou l'efficacité du produit. La durée des études de stabilité et le type de facteurs étudiés devraient être adaptés de manière à tester le stockage, le transport et l'éventuelle utilisation du vaccin.

De nombreux facteurs influencent la stabilité du vaccin. Par exemple, la stabilité du vaccin lyophilisé I-2 de la MN dépend de:

- la nature de l'agent stabilisant ajouté au vaccin
- l'efficacité du procédé de lyophilisation
- l'étanchéité à l'air et à l'humidité du bouchon en caoutchouc
- la qualité de la pastille du vaccin lyophilisée
- la température de stockage et le transport du vaccin.

Un changement de l'un des facteurs ci-dessus peut influencer la qualité du vaccin. Par conséquent, bien que les données des tests sur le vaccin I-2 de la MN produit dans un autre laboratoire puissent servir de guide, chaque fabricant doit effectuer des tests de stabilité sur le vaccin produit dans son propre laboratoire.

La température est le facteur qui influence le plus la stabilité du vaccin dans de nombreux pays en développement. Lorsque la chaîne de froid est inadéquate ou inexistante, le vaccin perd rapidement de son efficacité. Dans ces conditions, la vaccination peut ne pas protéger les poulets et les agriculteurs vont perdre confiance dans le vaccin. Pour éviter ceci, la stabilité du vaccin I-2 de la MN doit être testée à diverses températures.

Les tests de stabilité sont simples à effectuer. Le vaccin est maintenu à:

- la température normale de stockage (idéalement 2–8°C)
- la température ambiante (aussi bien en été qu'en hiver, s'il y a d'importantes variations saisonnières)
- 37°C

L'activité du vaccin est ensuite mesurée par titrage (voir Section 4.4) à des intervalles déterminés. Pour le vaccin lyophilisé, les essais doivent être effectués une fois par mois (vaccin stocké à 2–8°C), une fois par semaine ou toutes les deux semaines (température ambiante), et deux fois par semaine (37°C). Il peut être nécessaire de tester tous les jours le vaccin liquide conservé à température ambiante et à 37°C.

La connaissance de la stabilité du vaccin à 2–8°C permettra aux fabricants de déterminer la durée de vie du vaccin et de fixer une date d'expiration réaliste. Les dates d'expiration doivent toujours tenir compte des abus d'utilisation. Par exemple, si les tests montrent que le vaccin conserve son titre infectieux pendant 15 mois à 2–8°C, la date d'expiration doit préciser 12 mois.

Les autorités nationales d'enregistrement auront probablement besoin de données de stabilité pour trois lots de vaccin. Afin de déterminer la durée de conservation du vaccin, ils peuvent permettre des tests de stabilité accélérés. Ce sont des études conçues pour accroître le taux de dégradation du vaccin en utilisant des conditions de stockage exagérées – par exemple, vaccin stocké à 37°C.

5.4 Etiquetage du vaccin

Étiqueter le vaccin dès que possible après la production. Cela permettra d'éviter la confusion avec d'autres lots de vaccin I-2 de la MN ou avec d'autres types de vaccins stockés. Les renseignements qui suivent doivent être imprimés sur l'étiquette (Figure 16):

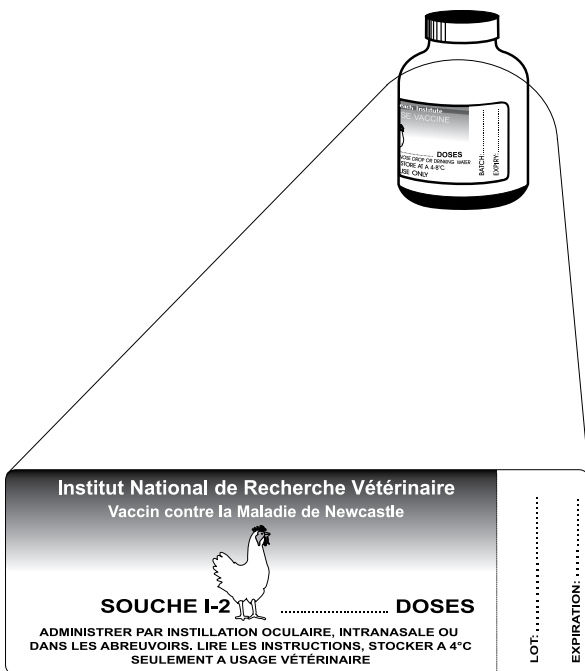


Figure 16: L'étiquette sur le flacon du vaccin contient des informations très importantes

- le nom du vaccin, y compris la souche de virus utilisée
 - la maladie que le vaccin va prévenir
 - la voie d'administration
 - les conditions de stockage
 - le numéro de lot
 - la date d'expiration (mois et année, calculés à partir de tests de stabilité de vaccins)
 - le nombre de doses dans le flacon
 - le nom (et l'adresse) du fabricant
 - l'enregistrement ou le numéro de licence
 - 'Seulement à usage vétérinaire'
 - une image de poulet.
- Des renseignements supplémentaires pourraient inclure:
- la composition du vaccin
 - le nom de tous les agents bactériostatiques ajoutés.

Pour le vaccin lyophilisé, la date d'expiration est fixée à partir de la date de fabrication, considérée comme la date de lyophilisation. Il est important que le mois et l'année de fabrication soient inclus. Toujours autoriser une marge d'erreur raisonnable! Par exemple, si les tests de stabilité montrent que le vaccin conserve son titre pendant 15 mois s'il est stocké à 2–8°C, alors la date d'expiration doit préciser 12 mois.

Pour s'assurer que le vaccin est utilisé correctement, le vaccin doit être accompagné d'une notice décrivant sa manutention, sa reconstitution et son utilisation. Si possible, les instructions doivent être rédigées dans la langue la plus couramment parlée par les utilisateurs locaux. Les informations suivantes doivent figurer sur la notice:

- le nom du vaccin
- le numéro d'enregistrement
- la composition du vaccin (y compris la souche de virus utilisée, 'préparé dans des œufs', le titre minimum par dose)
- les indications pour l'utilisation du vaccin ('Afin de prévenir la MN chez les poulets villageois', 'Sécuritaire pour les poulets de tous âges', 'Vacciner avant un foyer potentiel de la MN')
- la voie d'administration
- les précautions (comme 'Ne pas vacciner des animaux malades', 'Seulement à usage vétérinaire')
- les conditions de stockage
- la présentation (le nombre de doses par flacon, vaccin lyophilisé ou liquide)
- le temps d'attente avant consommation de la viande de l'animal vacciné
- le nom et l'adresse du fabricant
- les contacts pour de plus amples informations et instructions.

Toujours vérifier auprès de l'autorité d'enregistrement nationale avant l'impression d'étiquettes et de dépliants en grandes quantités. Elle devrait fournir les détails concernant les informations qui doivent figurer sur l'étiquette du vaccin et sur tout dépliant l'accompagnant.

Les fabricants de vaccins peuvent également préparer un résumé du dépliant à l'usage du personnel de terrain, la liste d'instructions élémentaires pour l'administration du vaccin I-2 de la MN. Des exemples sont présentés à l'Annexe 9.

5.5 Stockage du vaccin

Il faut éviter les excès de chaleur, de froid ou de lumière durant le stockage du vaccin I-2 de la MN. Il faut également éviter les fluctuations de températures. Il est préférable de conserver les vaccins lyophilisés et les vaccins liquides dans une chambre froide ou dans un réfrigérateur à 2–8°C. Un certain nombre de flacons de vaccins doivent être retenus et conservés par le fabricant jusqu'à la fin de la période d'expiration pour chaque lot de vaccin mis en circulation à l'usage du public. Ces échantillons sont appelés échantillons de rétention, ils sont gardés à des fins de traçabilité et ils seront utiles en cas de plaintes concernant la qualité du vaccin.

Les zones de stockage doivent être propres et sèches. Elles doivent être régulièrement vérifiées et la température doit y être contrôlée. Un thermomètre à maximum et minimum doit être placé dans chaque chambre froide et les températures doivent être inscrites quotidiennement dans un registre.

Un membre responsable du personnel doit être en charge du contrôle de température dans les lieux de stockage de vaccin pour vérifier que la température n'y dépasse jamais la température 'critique', c'est-à-dire, la température au-dessus de laquelle la qualité des vaccins peut être affectée (normalement 10°C).

Un vaccin qui est exposé à des températures élevées ou fluctuantes perd de son efficacité et ne doit pas être utilisé. L'activité ne sera pas restaurée si le vaccin est remis à la température de stockage correcte.

5.6 Maintien de la chaîne de froid

Pour assurer une efficacité optimale, le vaccin doit être stocké et manipulé correctement en tout temps. Les procédés de production, de distribution et d'utilisation du vaccin sont composés d'un certain nombre d'étapes, chacune d'elles étant un maillon dans ce qui s'appelle 'la chaîne de froid'. La chaîne de froid est une composante essentielle de tout programme de vaccination, car si l'un de ces maillons est rompu, le vaccin peut perdre son efficacité et ne pas fournir de protection. On note trois éléments majeurs dans la chaîne de froid:

- Equipement – pour le stockage et le transport des vaccins
- Personnel – pour utiliser, contrôler et maintenir l'équipement et pour effectuer la vaccination
- Procédures – pour assurer des conditions correctes de stockage, de transport et d'utilisation du vaccin.

La figure 17 montre les maillons d'une chaîne de froid typique du vaccin I-2 de la MN au Mozambique, et ce qui pourrait arriver si les maillons de la chaîne étaient brisés.

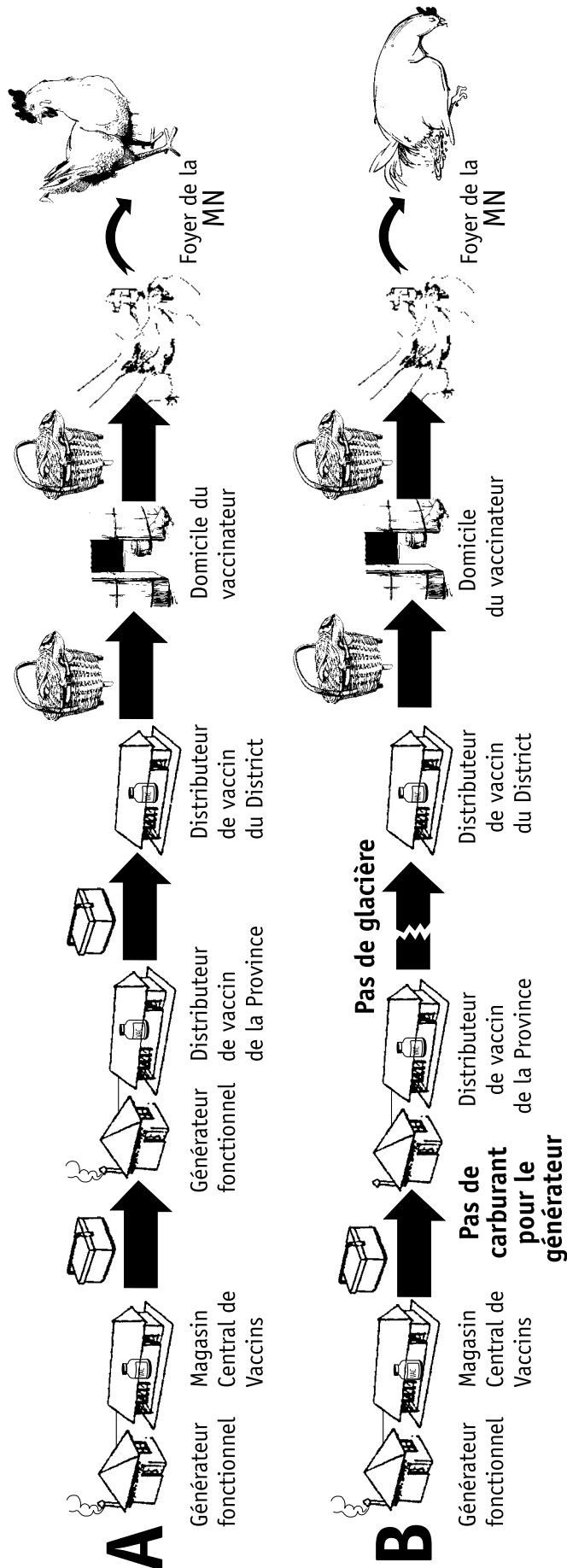


Figure 17: Chaîne de froid typique, exemple au Mozambique.

1. **Précautions lors de la production de vaccin.** S'assurer que les lots de semence primaire et de semence de travail, ainsi que le liquide allantoïdien avant lyophilisation sont stockés correctement et s'assurer que le lyophilisateur fonctionne correctement.
2. **Stockage du vaccin au Magasin Central de Vaccins.** S'assurer que le vaccin est stocké à une température convenable, que la température est contrôlée quotidiennement, que la personne responsable du contrôle de la température sait ce qu'il faut faire si la température excède les limites fixées et que des dispositions sont en place en cas de pannes d'équipement.
3. **Distribution et transport de vaccins.** Emballer le vaccin dans une boîte isotherme contenant de la glace ou des briques de glace, et mettre les instructions de manutention à l'extérieur de la boîte. Vérifier que les instructions sur la façon de stocker, de diluer et d'utiliser le vaccin sont incluses dans la boîte. Pendant le transport, veiller à ce que le paquet de vaccins soit gardé dans un endroit frais et à l'abri du soleil. S'il est envoyé par transport commercial, s'assurer que les instructions sur la façon de prendre soin du vaccin sont à l'extérieur de la boîte, et qu'un nom et un numéro de contact sont fournis aux transporteurs. Le vaccin devrait atteindre sa destination dans le plus bref délai possible.
4. **Stockage des vaccins aux points de distribution provinciaux et de districts.** S'assurer que le vaccin est conservé à une température convenable, que la température est contrôlée quotidiennement, que la personne responsable de la surveillance de la température sait ce qu'il faut faire si la température dépasse les limites fixées et que des dispositions sont en place en cas de panne d'équipement.
5. **Envoi de vaccins à partir des points de distribution provinciaux et de districts.** Si une boîte isotherme, de la glace ou des briques de glace ne sont pas disponibles pour emmener le vaccin sur le terrain, le refroidissement par évaporation permettra de le garder au frais pendant une courte période. Envelopper les vaccins dans un linge humide et les placer dans un panier tissé (ajouré). Le mouvement d'air à travers le panier et sur le linge refroidira le vaccin.
6. **Stockage et manutention sur le terrain.** Stocker le vaccin dans un endroit frais. Il peut être stocké à la maison, à l'ombre, à côté d'un pot d'eau en argile en attendant d'être utilisé. Quand le vaccin est transporté sur le terrain, utiliser un panier tissé (ajouré) comme décrit ci-dessus. Ne pas utiliser le vaccin lyophilisé reconstitué plus de deux jours après la reconstitution.

S'assurer que tous ceux qui sont impliqués dans la chaîne de froid – producteurs, distributeurs de vaccin, et les équipes de vaccination – comprennent la nécessité de maintenir la chaîne de froid et ce qu'ils doivent faire pour assurer son maintien.

NOTE:

- Le vaccin devrait toujours être transporté en conformité avec les réglementations nationales et internationales. Se renseigner auprès des services postaux ou les autorités de transport concernant les procédures correctes.
- Lors de la planification des campagnes de vaccination, une bonne coordination est nécessaire entre le personnel de laboratoire, les distributeurs du vaccin (par exemple, les pharmacies vétérinaires, les ONG ou le personnel de laboratoires provinciaux) et les équipes de vaccination. Cela permettra d'assurer la livraison d'un vaccin de bonne qualité aux vaccinés quand ils en ont besoin.
- Des moyens de communication et de transport rapides et fiables sont nécessaires pour faire en sorte que la qualité des vaccins soit maintenue lors de leur transport du producteur au vaccinateur.

- Toujours inscrire la date à laquelle le vaccin quitte la chaîne de froid, de préférence sur l'étiquette du flacon de vaccin. Cela peut être, de temps en temps, utile pour les retraits de vaccin du terrain, ou pour demander le renvoi de flacons inutilisés stockés dans des conditions douteuses. Un titrage pourra ensuite tester l'activité du vaccin et l'efficacité de la chaîne de froid pourra être vérifiée.

5.7 Emballage du vaccin

Pour la distribution, le vaccin I-2 doit être mis dans des récipients convenables. Les récipients doivent être:

- 'sans effet nocif pour le virus'
- inertes chimiquement et physiquement
- de faible coût
- de taille adéquate (nombre de doses).

Le coût est un facteur très important à considérer, surtout lors de la production de vaccin lyophilisé. Le coût du récipient est une composante importante du prix du vaccin lyophilisé; cela comprend le flacon en verre, le bouchon en caoutchouc, l'étiquette et la capsule en aluminium. Le coût du flacon est le même pour 20, 50 ou 100 doses de vaccin.

5.7.1 Vaccin lyophilisé

Pour le vaccin lyophilisé, il faut des récipients de bonne qualité pour assurer une dessiccation uniforme, une bonne étanchéité et le maintien du vide.

Les flacons en verre doivent être en verre de bonne qualité avec des parois minces et d'une épaisseur uniforme. Les flacons ne doivent pas être recyclés puisque c'est presque impossible de les nettoyer complètement et que la contamination du goulot peut entraîner le développement de micro-fuites pendant le stockage. Cela posera des problèmes pour la stabilité du vaccin. Avant utilisation, les flacons doivent être stockés dans un environnement exempt de poussière, rincés à l'eau distillée et stérilisés dans un four à air chaud.

Les fermetures (bouchons en caoutchouc) utilisées pour la lyophilisation sont généralement fabriquées à partir de caoutchouc naturel ou d'un composé synthétique tel que le butyle ou le néoprène. Ils doivent être chimiquement inertes et posséder des fentes qui permettent l'extraction de l'humidité lors de la lyophilisation. Avant utilisation, ils doivent être stérilisés dans un autoclave à 121°C. Il faut ensuite les faire sécher à 135–142°C pendant quatre heures avant utilisation, sinon ils absorbent l'humidité pendant l'autoclavage. Si les bouchons ne sont pas secs, un vaccin même correctement séché peut absorber l'humidité provenant du bouchon pendant le stockage, ce qui provoquera une perte de stabilité.

Des capsules d'aluminium sont utilisées pour tenir en place le bouchon en caoutchouc et aussi comme sceau de sécurité. Si plusieurs sortes de vaccins sont fabriquées, des capsules de couleurs différentes peuvent être utilisées pour différencier les différents vaccins.

Pour de plus amples informations voir Srinivasan, Kariath et Bangar Raju (1997).

5.7.2 Vaccin liquide

Divers conditionnements peuvent être utilisés pour le vaccin I-2 de la MN sous forme liquide. Les récipients en plastique sont le plus fréquemment utilisés. Ils sont plus légers, moins fragiles et potentiellement moins chers que ceux en verre. Le vaccin peut aussi être transporté dans des compte-gouttes en plastique jetables ou dans des pipettes de transfert jetables, contenant juste suffisamment de doses pour un seul élevage. Les compte-gouttes en plastique avec des bouchons inviolables sont idéaux.

5.7.3 Récipients et compte-gouttes pour vaccin sans effet nocif pour le virus

Les récipients en plastique utilisés pour conserver ou administrer le vaccin I-2 de la MN doivent être testés avant qu'ils ne soient utilisés, pour montrer qu'ils sont sans effet nocif pour le virus. Les récipients peuvent être contaminés par des résidus chimiques qui affectent le virus, ou être constitués d'un type de plastique qui inactivera le virus et, par conséquent, le vaccin. De tels récipients ou compte-gouttes ne doivent pas être utilisés. Avant de commander un nouveau lot, il est préférable de demander au fournisseur d'en fournir quelques-uns pour les tester.

Équipement et matériels

Récipient pour vaccin ou une bouteille compte-goutte et un cône

Vaccin I-2

PBS stérile avec antibiotiques

Une pipette de 10 ml stérile ou une seringue

Procédure

1. S'il s'agit d'un vaccin lyophilisé, sélectionner le lot de vaccin qui doit être testé, prendre un échantillon et le laisser atteindre la température ambiante.
2. Diluer le vaccin avec un volume adéquat de PBS. Cela n'a pas besoin d'être le volume recommandé pour la reconstitution.
3. Transférer la moitié du vaccin lyophilisé reconstitué ou du vaccin liquide dilué dans le récipient ou le compte-gouttes et le sceller.
4. Sceller le flacon de vaccin contenant le reste du vaccin.
5. Placer le flacon et le récipient ou compte-gouttes dans un endroit sombre et frais^a pendant 24 heures.
6. Après 24 heures, mesurer le titre infectieux des deux échantillons du vaccin par inoculation d'œufs (voir Section 4.4 pour la procédure) et comparer.

Les récipients ou les compte-gouttes sont adéquats si le titre infectieux du vaccin stocké dans le récipient ou dans le compte-gouttes, est égal à celui du vaccin stocké dans le flacon de vaccin.

5.7.4 Taille de la goutte

La taille de la goutte livrée par le compte-goutte doit aussi être vérifiée. On recommande des compte-gouttes fabriqués à partir de polyéthylène basse densité (PE-BD) et fournissant 35–40 gouttes par ml. Les méthodes d'étalonnage de compte-gouttes sont décrites dans l'Annexe 3 du *Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual* (Alders et Spradbrow 2001).

^a Cette procédure teste l'infectivité du vaccin stocké à température ambiante, la température à laquelle le vaccin est susceptible d'être stocké dans les conditions du terrain. Une façon plus correcte de mesurer si un récipient peut inactiver le virus, consisterait à placer le flacon en verre et le récipient à 4°C pendant 24 heures.

Équipement et matériels

Bouteille compte-gouttes et un embout

Eau

Pipette de 1 ml ou seringue

Procédure

1. Retirer l'embout du compte-gouttes.
2. Placer 1 ml d'eau dans le compte-gouttes et remettre l'embout.
3. Inverser le compte-gouttes, presser doucement et compter le nombre de gouttes.
4. Répéter encore deux fois, au minimum.

Les meilleurs compte-gouttes sont ceux qui livrent entre 35 et 40 gouttes par ml.

5.8 Transport du vaccin

Tous les récipients de transport doivent être testés pour établir la durée effective de conservation du froid; c'est-à-dire le nombre d'heures durant lesquelles ils pourront conserver le vaccin à une température sécuritaire (en dessous de 10°C) une fois sorti du réfrigérateur ou de la chambre froide, sachant que le vaccin est emballé dans la quantité recommandée de blocs réfrigérants ou de glace. La durée de conservation du froid dépend:

- du type de glacière ou autre emballage utilisé pour le transport – le matériau isolant, son épaisseur et la méthode de construction de la glacière ou autre emballage
- du nombre de blocs réfrigérants, de leur température de congélation et de leur position ou de la quantité de glace placée dans la glacière
- de la température ambiante
- du nombre de fois que la glacière est ouverte, et pendant combien de temps.

Les enregistreurs de données

Un enregistreur de données est un appareil électronique qui sert à enregistrer des données telles que la température ou l'humidité. Cela ressemble à un enregistreur à cassette, mais au lieu d'enregistrer le son, il enregistre la température à intervalles définis par l'utilisateur à l'aide d'un ordinateur et de logiciels. L'enregistreur de données continuera d'enregistrer et de sauvegarder ces informations jusqu'à ce qu'il soit arrêté. Ensuite l'information peut être téléchargée, affichée et analysée. Avant les ordinateurs, on utilisait des enregistreurs graphiques pour enregistrer cette information et avant les enregistreurs graphiques, un technicien était assigné à cette tâche avec un thermomètre, un crayon et du papier!

Dans le laboratoire les enregistreurs de données sont utiles pour surveiller la température des équipements tels que les incubateurs à œufs, les chambres froides et les réfrigérateurs et pour réaliser de simples expériences sur la durée de conservation du froid des récipients pour vaccins. Un enregistreur de données ne coûte pas cher et peut faire économiser de nombreuses fois son prix d'achat en assurant la détermination de conditions correctes de transport du vaccin.

Les blocs réfrigérants sont disponibles dans le commerce et sont idéaux pour garder le vaccin au frais. Cependant, ils sont coûteux et en général ils ne seront pas retournés au producteur ou au distributeur de vaccin après l'utilisation du vaccin. Par conséquent, le coût devrait être ajouté au coût du vaccin. Une alternative peu coûteuse, et facilement accessible, est l'utilisation de bouteilles d'eau minérale en plastique et jetables, remplies au trois quarts avec de l'eau ou une solution saturée de sel, et congelées. Toutefois, ces bouteilles ne peuvent pas maintenir des températures basses aussi longtemps que les blocs réfrigérants.

5.9 Reconstitution et administration du vaccin I-2 par compte-gouttes

Le vaccin devrait être reconstitué et administré dans un endroit ombragé, à l'abri du soleil. Cela permettra au vaccin de conserver sa qualité aussi longtemps que possible.

5.9.1 Reconstitution et administration du vaccin I-2 lyophilisé

Équipement et matériels

Seringue de 10 ml

Flacon de vaccin I-2

Bouteille compte-gouttes et embout

Diluant du vaccin fourni par le fabricant ou eau potable bouillie (voir Annexe 9)

Procédure

1. Enlever la capsule d'aluminium et le bouchon en caoutchouc du flacon de vaccin.
2. Mesurer la quantité recommandée de diluant ou d'eau potable dans une seringue et ajouter au flacon de vaccin.
3. Remettre le bouchon en caoutchouc et mélanger le vaccin en agitant doucement le flacon.
4. Verser le contenu du flacon de vaccin dans le compte-gouttes propre.
5. Remettre l'embout du compte-gouttes sur la bouteille et agiter pour mélanger le vaccin.
6. Demander à votre assistant, ou au propriétaire de l'oiseau, de tenir le poulet à vacciner à l'horizontale, avec un œil tourné vers vous.
7. Tenir la tête de l'oiseau et ouvrir l'œil avec le pouce et l'index d'une main.
8. Tenir le compte-gouttes verticalement et presser doucement pour permettre à une goutte de vaccin de tomber dans l'œil du poulet. S'assurer que la goutte de vaccin se répand sur la surface de l'œil avant de relâcher l'oiseau.

5.9.2 Administration du vaccin I-2 liquide en utilisant un compte-gouttes

1. Demander à votre assistant, ou au propriétaire de l'oiseau, de tenir le poulet à vacciner à l'horizontale, avec un œil tourné vers vous.
2. Tenir la tête de l'oiseau et ouvrir l'œil avec le pouce et l'index d'une main.
3. Tenir le compte-gouttes verticalement et presser doucement pour permettre à une goutte de vaccin de tomber dans l'œil du poulet. S'assurer que la goutte de vaccin se répand sur la surface de l'œil avant de relâcher l'oiseau.

NOTE:

- Lorsque le vaccin lyophilisé est reconstitué avec de l'eau potable locale, utiliser le vaccin pendant deux jours seulement. Jeter tout le vaccin inutilisé lors du troisième jour car l'activité du vaccin peut avoir été affectée par des éléments dans l'eau, ou bien le vaccin peut avoir été contaminé sur le terrain après l'ouverture.
- L'eau chlorée du robinet n'est pas adéquate pour la reconstitution ou pour la dilution du vaccin I-2 de la MN. Si c'est la seule eau disponible, la laisser reposer pendant une nuit (Alders et Spradbrow 2001) avant de l'utiliser.

5.10 Résolution des problèmes

Les problèmes qui surviennent doivent permettre d'apprendre et améliorer les techniques. En cas de problème, le responsable du laboratoire et le personnel devraient résoudre le problème – c'est-à-dire en discuter et suivre les étapes suivantes pour trouver une solution:

- Identifier le problème.
- Examiner la procédure étape par étape, y compris les dossiers et les calculs.
- Identifier là où le problème a pu se produire.
- Déterminer ce qui a pu causer le problème.
- Réfléchir à ce qu'il faut faire pour confirmer la cause du problème.
- Identifier les mesures qui peuvent être prises pour éviter au problème de se reproduire
- Si cela est nécessaire, examiner et réviser les Procédures Opérationnelles Standardisées.

Rappel

- Toujours lire les instructions et le protocole d'abord. De cette façon, on sera sûr d'utiliser de bonnes procédures.
- Toujours enregistrer tous les détails du travail effectué. Lorsque des problèmes surviennent, il sera possible de vérifier les données telles que les poids, les dilutions et les calculs.
- La tenue de bons dossiers permet de faire des économies! Les problèmes peuvent être identifiés plus facilement si tous les aspects du travail ont été enregistrés. Il faut se rappeler que le prix de vente du vaccin doit couvrir non seulement le coût de production des lots de vaccin vendus, mais aussi le coût des lots rejetés.

Certains des problèmes pouvant survenir lors de la production de vaccin sont présentés dans la Figure 18 et sont abordés dans les exemples.

Exemple 1

Des œufs fécondés sont obtenus à partir de la source habituelle et sont maintenus à 16°C pendant 48 heures avant d'être transférés dans l'incubateur. Ils sont incubés pendant neuf jours, puis enlevés de l'incubateur et mirés pour être inoculés avec le lot de semence de travail. Cependant, environ 35% des œufs doivent être rejetés car ils contiennent des embryons morts.

- ❑ Les problèmes de viabilité embryonnaire avant l'inoculation pourrait indiquer des embryons de mauvaise qualité (problèmes de santé dans l'élevage des pondeuses), stockage à une température ou une humidité incorrecte avant l'incubation ou à une température et une humidité incorrectes pendant l'incubation. Des interruptions de l'alimentation électrique de l'incubateur pourraient également entraîner une perte de viabilité chez les embryons.
- Analyser les chiffres précédents de la viabilité embryonnaire pendant l'incubation et si nécessaire, contacter le fournisseur d'œufs pour demander s'il y a eu des problèmes de santé ou des changements dans la gestion de l'élevage d'origine. Utiliser un thermomètre ou un enregistreur de données pour surveiller la température des incubateurs et veiller à ce que les bacs à eau à l'intérieur des incubateurs soient remplis régulièrement. Si possible, se renseigner pour savoir s'il y a eu une coupure électrique et la durée. Si la région est sujette à des coupures d'électricité fréquentes et prolongées, il pourrait être nécessaire de s'équiper d'un générateur de secours.

Exemple 2

100 œufs embryonnés de dix jours sont mirés et inoculés avec le lot de semence de travail I-2 de la MN. Après 24 heures d'incubation, les œufs sont mirés de nouveau et on trouve que les embryons sont morts dans 15 œufs.

- ❑ Une mortalité embryonnaire de plus de 2% des œufs inoculés moins de 24 heures après l'inoculation indique d'habitude une technique défectueuse – par exemple, le site d'inoculation a été marqué incorrectement ou l'aiguille utilisée pour l'inoculation était trop grosse ou trop longue, de sorte que l'aiguille a percé le sac vitellin ou un gros vaisseau sanguin (si les mortalités ont lieu après 24 heures d'incubation, le problème est généralement dû à une contamination bactérienne de l'inoculum).
- Vérifier le mirage et le marquage des œufs pour l'inoculation. Vérifier les dimensions (diamètre et longueur) des aiguilles utilisées pour l'inoculation. Vérifier la technique d'inoculation de la façon suivante: mélanger un peu de colorant alimentaire bleu avec du PBS et inoculer quelques œufs en utilisant la voie et la technique habituelles. Ouvrir les œufs avec soin après les avoir réfrigérés et examiner la répartition du colorant bleu. Le virus I-2 de la MN peut tuer les embryons s'il est inoculé dans le sac vitellin.

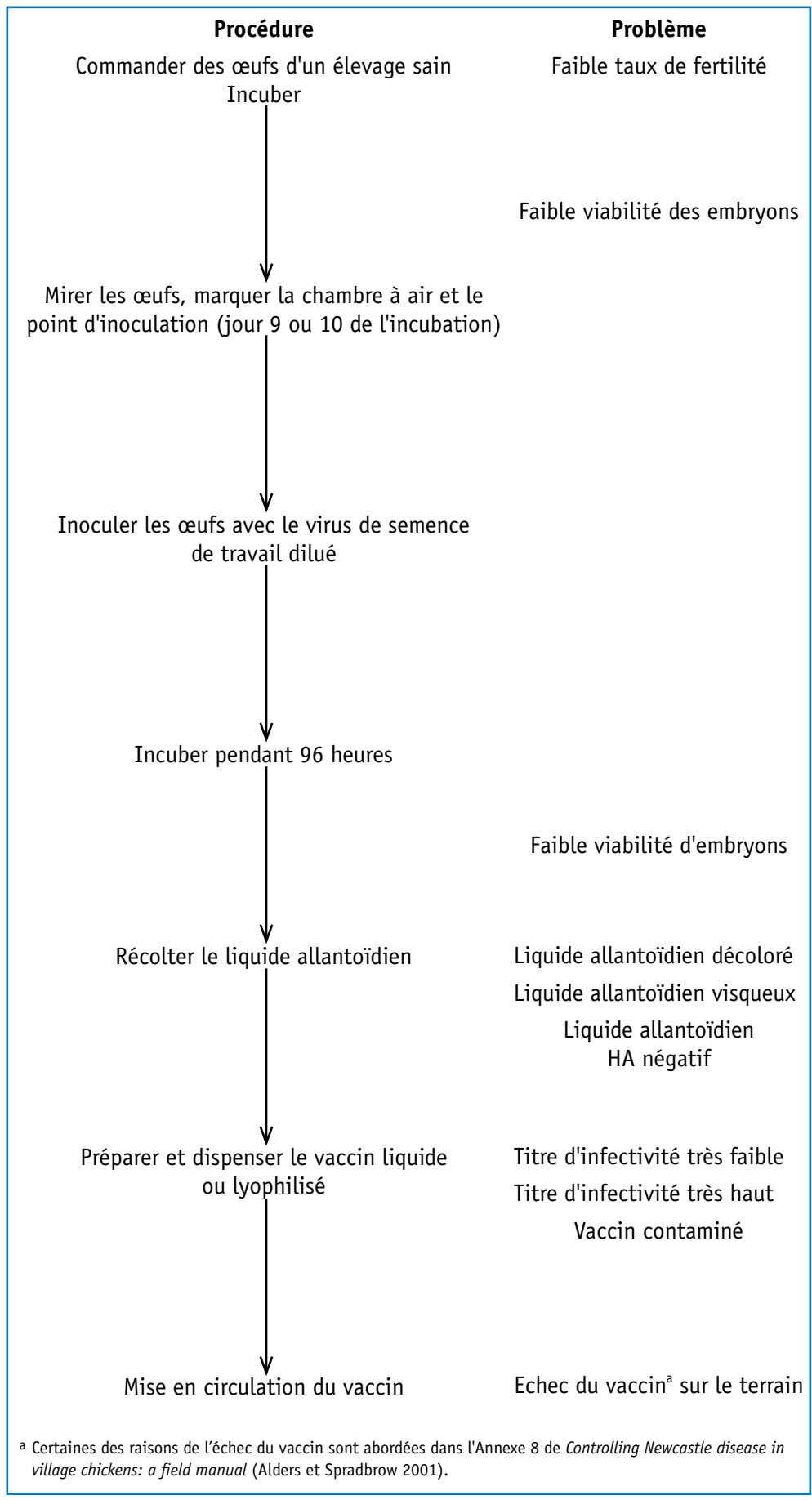


Figure 18: Diagramme de la production du vaccin I-2 montrant quelques-uns des problèmes pouvant être rencontrés pendant la production et l'utilisation sur le terrain du vaccin I-2 de la MN.

Exemple 3

On a fait des dilutions en série au 1/10ème du vaccin liquide de I-2 de la MN fraîchement préparé et les dilutions ont été inoculées dans des œufs embryonnés. Les résultats du titrage d'infectivité sont présentés ci-dessous.

Dilution du Vaccin	Résultat
10 ⁻⁶	+++++
10 ⁻⁷	+++++
10 ⁻⁸	+++++
10 ⁻⁹	+++++
10 ⁻¹⁰	+++++
10 ⁻¹¹	+++++

- ❑ Ces résultats suggèrent que le vaccin possède un titre infectieux plus élevé que celui qui est obtenu d'habitude avec le vaccin fraîchement préparé. Il s'agit d'une erreur due à une technique défectueuse et ceci est généralement dû au fait que les pipettes ou les cônes de pipette n'ont pas été changés lors de la préparation des dilutions de vaccin pour l'inoculation. Cependant, cela peut également être dû à une contamination du PBS (utilisé comme diluant) par le virus I-2 de la MN ou par un autre organisme qui provoque l'hémagglutination.
- Répéter le titrage et veiller à ce qu'un nouveau cône de pipette, ou une nouvelle pipette, soit utilisé pour chaque dilution (voir Section 4.4). Si le résultat est le même, il est probable que le PBS a été contaminé. Pour tester la contamination du PBS, inoculer plusieurs œufs avec le PBS, incubé pendant 96 heures et tester les liquides allantoïdiens pour la présence de virus en utilisant le test HA (voir Section 4.3.1).

Exemple 4

Deux flacons du vaccin I-2 (250 doses par flacon) ont été renvoyés au laboratoire par le personnel du terrain qui pensait que le vaccin provoquait une mortalité élevée chez les oiseaux vaccinés.

- ❑ Le vaccin I-2 de la MN est sécuritaire et ne nuit pas aux oiseaux, même s'ils reçoivent 100 fois la dose recommandée. Des problèmes peuvent survenir si le vaccin est une contrefaçon ou a été mal étiqueté, ou lorsque les oiseaux sont vaccinés durant une épidémie. L'Annexe 8 de *Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual* (Alders et Spradbrow 2001) explique les raisons de l'échec de la vaccination.
- Vérifier l'étiquette sur le flacon du vaccin. Titrer le vaccin. (Lors du titrage du vaccin, le titre était plus élevé que le minimum recommandé et aucune mort d'embryon n'avait été enregistrée au cours du titrage d'infectivité).
- Se renseigner, auprès du personnel local, concernant la situation sur le terrain. Est-ce que certains oiseaux étaient malades au moment de la vaccination? A-t-on rencontré des problèmes lors de la vaccination? Comment le vaccin a-t-il été préparé? Est-ce que les autres oiseaux dans le village sont en bonne santé? (Ces enquêtes ont révélé que le vaccin avait été administré à des oiseaux dans un élevage, deux jours après des mortalités dues à la MN chez les animaux du voisin)

- Rappeler au personnel du terrain qu'il faut 7-14 jours après la vaccination, pour que les oiseaux développent un titre protecteur d'anticorps. Les oiseaux malades, ou ceux en contact avec des oiseaux qui sont morts de la MN, ne doivent pas être vaccinés car les agriculteurs associent la mortalité avec le vaccin plutôt qu'avec la maladie.

Exemple 5

Deux compte-gouttes en plastique contenant le vaccin liquide I-2 de la MN, provenant d'une boîte de 300 compte-gouttes envoyés sur le terrain, ont été retournés au laboratoire parce que, par erreur, la boîte avait été laissée au dehors de la chambre froide pendant une semaine. Le personnel de terrain voudrait savoir s'il peut utiliser le reste du vaccin. Chaque compte-gouttes contient 30 doses et produit des gouttes d'une taille de 40 µL.

- Titrer le vaccin. En fonction des résultats, décider si le personnel de terrain devrait utiliser le vaccin.

Le vaccin a été titré et a donné les résultats ci-dessous. Est-ce que le vaccin peut être utilisé? (Voir Annexe 11 pour la réponse.)

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % cumulé d'œufs infectés
10 ⁻¹	+++++					
10 ⁻²	+++++					
10 ⁻³	+++++					
10 ⁻⁴	+++++					
10 ⁻⁵	+++++					
10 ⁻⁶	+++++					
10 ⁻⁷	+++++					
10 ⁻⁸	++++-					
10 ⁻⁹	+++--					
10 ⁻¹⁰	-----					

- Revoir la chaîne de froid. Rappeler au personnel de terrain les conditions dans lesquelles le vaccin doit être stocké pour mieux conserver son infectivité.

6.0

Diagnostic de la maladie de Newcastle

Sur le terrain, un diagnostic provisoire de la MN est basé sur l'historique des épidémies de la maladie, les signes cliniques et les lésions observées à l'autopsie. Les signes cliniques de la MN sont très variables et dépendent, entre autres, de la souche du virus, de l'âge du poulet, de la présence d'infections simultanées, de l'état immunitaire de l'animal et du stress dû à des conditions de l'environnement. Les signes cliniques associés à la MN comprennent la détresse respiratoire, la diarrhée, la dépression, l'œdème de la tête et des barbillons, des signes nerveux et la mort. Dans les élevages de pondeuses, la production d'œufs pourrait être réduite et des œufs déformés produits (Alders et Spradbrow 2001). Les lésions observées à l'autopsie, sur des oiseaux morts de la MN, ne sont pas pathognomoniques.

Afin de confirmer le diagnostic, le virus de la MN doit être isolé, identifié, et son pouvoir pathogène déterminé en laboratoire. Dans la plupart des laboratoires, l'évaluation de la virulence sera basée sur des essais de l'isolat *in vivo*. Toutefois, pour des raisons tant commerciales que de mise en place de mesures de contrôle et de politique sanitaire, la définition actuelle de l'OIE pour la MN accepte l'évaluation de la virulence par des méthodes moléculaires. (OIE 2011b).

La définition OIE pour signaler un foyer de la MN

La maladie de Newcastle est définie comme une infection d'oiseaux causée par un virus de sérotype paramyxovirus aviaire 1 (APMV-1) qui répond à l'un des critères de virulence suivant:

a) le virus possède un indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC) de 0,7 ou plus chez les poussins d'un jour (*Gallus gallus*).

Ou

b) présence, au C-terminus de la protéine F2 du virus, de nombreux acides aminés basiques (séquence directe ou déduite de la séquence nucléotidique) et la présence de la phénylalanine au résidu 117 au N-terminus de la protéine F1. Le terme «nombreux acides aminés basiques» signifie la présence d'au moins 3 résidus d'arginine ou de lysine entre les positions 113 et 116. En l'absence du motif de résidus d'acides aminés décrit ci-dessus, il faut utiliser le test IPIC pour caractériser le virus isolé.

Dans la définition ci-dessus, les acides aminés sont numérotés depuis le N-terminus de la séquence des acides aminés déduite de la séquence nucléotidique du gène F0, et les positions 113–116 correspondent aux résidus situés à -4 et -1 du site de clivage.

(OIE 2011b)

La MN est confirmée par l'isolement du virus dans des œufs embryonnés de poule et par l'identification et la caractérisation du virus virulent de la MN. Ces souches seront une source de virus pour tester l'efficacité du vaccin I-2 de la MN si une souche d'épreuve adéquate n'est pas disponible. La collecte et le stockage des souches de terrain du virus de la MN sont importants pour les études épidémiologiques.

6.1 Isolement et caractérisation du virus

Prélever des échantillons de: poumon, rate, foie, cœur, cerveau et moelle d'os long (par exemple, le fémur ou l'humérus), les envelopper dans du plastique et les placer dans une glacière avec de la glace ou des blocs réfrigérants. En fonction des signes cliniques, d'autres échantillons peuvent être prélevés.

Par exemple, le cerveau (ou la tête entière) ne sera prélevé que si des signes nerveux ont été observés, ainsi que tous les organes ou les tissus présentant des lésions. Si possible, prélever des écouvillons trachéaux, des prélèvements cloacaux et/ou des fèces, car il est généralement possible d'isoler le virus à partir de ces prélèvements (Alexander 1998). Les prélèvements doivent être complètement immergés dans un milieu antibiotique. Recueillir les fèces dans un milieu antibiotique.

S'il n'est pas possible de conserver les prélèvements au frais ou s'il n'est pas certain qu'ils arriveront au laboratoire dans un délai de 24 heures, la rate, les poumons, la tête entière (contenant le cerveau) et les os longs doivent être placés dans une solution de glycérol (glycérine) à 50% dans de l'eau froide salée et conservés aussi froid que possible (Alders et Spradbrow 2001).

Le type et la concentration des antibiotiques utilisés dans les milieux de transport varient en fonction du prélèvement qui doit être transporté, de la disponibilité locale des antibiotiques et de leur coût. Des concentrations élevées d'antibiotiques sont nécessaires dans les milieux de transport d'échantillons de fèces. Les concentrations généralement recommandées d'antibiotiques sont 10 000 UI/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine, 0.25 mg/ml de gentamycine et 5000 UI/ml de nystatine dans du PBS (Alexander 1998). La concentration d'antibiotiques dans du PBS peut être réduite pour le transport des écouvillons: on recommande 2000 UI/ml de pénicilline, 2 mg/ml de streptomycine, 0.05 mg/ml de gentamycine, et 1000 UI/ml de nystatine à un pH de 7.0–7.4.

Essayer de garder les prélèvements au frais pendant le transport au laboratoire. Les températures élevées et la décomposition des tissus diminuent l'infectivité du virus.

Pour l'isolement du virus, l'idéal est de séparer les prélèvements. Toutefois dans le laboratoire, il est souvent nécessaire de regrouper les échantillons d'organes et de tissus.

Écouvillons dans un milieu antibiotique

1. Agiter vigoureusement l'échantillon au vortex pour libérer un maximum de matériel des fibres de l'écouvillon.
2. Retirer l'écouvillon et transférer l'échantillon dans un tube à centrifugation. Centrifuger à 1000–1500 x *g* pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à 4–10°C. Ceci sédimentera les débris de tissus et la plupart des bactéries.
3. Récolter le surnageant en utilisant une technique aseptique et ensemercer des œufs embryonnés (voir ci-dessous Fèces: étape 4).

Tissus et organes

1. Broyer ou émincer finement l'échantillon en utilisant un homogénéisateur, ou un mortier et pilon, ou mettre l'échantillon dans une seringue et le pousser à travers une aiguille à jauge étroite. L'échantillon peut également être broyé à l'aide de billes en verre stériles ou du sable.
2. Créer une suspension à 20% p/v dans un milieu antibiotique (PBS avec 2000 UI/ml de pénicilline, 2 mg/ml de streptomycine, 0.05 mg/ml de gentamycine et 1000 UI/ml de nystatine, à un pH de 7.0–7.4).
3. Centrifuger à 1000–1500 x *g* pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à 4–10°C pour sédimenter les débris des tissus et la plupart des bactéries. Récolter le surnageant de façon aseptique et inoculer des œufs embryonnés (voir ci-dessous Fèces: étape 4).

Fèces

1. Les fèces doivent être récoltées dans un milieu contenant des antibiotiques (PBS avec 10.000 UI/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine, 0.25 mg/ml de gentamycine et 5.000 UI/ml de nystatine à pH 7.0–7.4:) de façon à obtenir une suspension à 20% p/v.
2. Centrifuger à 1000–1500 x *g* pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à 4–10°C pour sédimenter les débris de tissus et la plupart des bactéries.
3. Éliminer le surnageant de manière aseptique.
4. Inoculer 0,1 ml du surnageant dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés âgés de 9–10 jours.
5. Incuber les œufs à 37°C et mirer chaque jour. Placer les œufs contenant des embryons morts dans une chambre froide ou un réfrigérateur à 4°C.
6. 5–7 jours après l'inoculation, tester pour l'hémagglutinine le liquide allantoïdien de tous les œufs, y compris ceux contenant des embryons morts ou en train de mourir.

Les échantillons qui sont HA positifs doivent subir des tests supplémentaires, y compris le titrage d'activité HA pour confirmer et quantifier l'activité HA et l'identification de l'agent HA au moyen du test IH (Terregino et Capua 2009).

NOTE:

Il est préférable d'utiliser des œufs issus d'un élevage SPF ou d'un élevage exempt d'anticorps contre le virus de la MN, si ceux-ci ne sont pas disponibles, on peut utiliser des œufs de bonne qualité à partir d'un élevage sain exposé à un minimum de contamination.

6.2 Tests de pathogénicité

Il faut confirmer la virulence des souches du virus de la MN en utilisant des tests de pathogénicité. Ceci différenciera les souches de virus de la MN de haute virulence et celles de faible virulence. Plusieurs tests de pathogénicité sont décrits en détail dans Alexander (1998). Les trois tests les plus couramment utilisés sont:

- le délai moyen de l'effet létal (MDT) dans les œufs
- l'indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC)
- l'indice de pathogénicité intraveineuse (IPIV).

De surcroît, des études moléculaires ont été utilisées récemment pour évaluer la pathogénicité. Celles-ci reposent sur la déduction de la séquence d'acides aminés autour d'un site particulier par réaction de polymérisation en chaîne par la transcriptase inverse (RT-PCR) et par le séquençage du produit de la PCR.

Seul le MDT est décrit ici puisque c'est le moyen le plus simple et le moins cher pour estimer la virulence d'une souche de virus de la MN, et il peut être effectué en utilisant un matériel simple qui se trouve dans la plupart des laboratoires.

Délai moyen de l'effet léthal (MDT) dans les œufs

1. Faire une dilution en série au 10^{ème} de l'isolat dans une solution saline isotonique stérile.
2. Inoculer 0,1 ml de chaque dilution dans la cavité allantoïdienne d'au moins cinq œufs embryonnés de poule âgés de 9 à 10 jours.
3. Garder le reste de la dilution de l'isolat à 4°C.
4. Environ 8 heures plus tard, ensemercer encore 5 œufs avec chaque dilution.
5. Incuber les œufs à 37°C et mirer deux fois par jour pendant 7 jours.
6. Noter l'heure à laquelle la mort de chaque embryon est observée pour la première fois.
7. Calculer la dose létale minimum. Il s'agit de la plus forte dilution causant la mort de tous les embryons.
8. Calculer le MDT. C'est le temps moyen (en heures) nécessaire pour que la dose létale minimum tue les embryons.

En se basant sur le MDT, on peut définir trois groupes dans les œufs SPF (Hanson et Brandly 1955):

- vélogènes < 60 heures
- mésogènes 60–90 heures
- lentogènes > 90 heures

Si des œufs SPF ne sont pas disponibles, on peut se servir d'œufs commerciaux pour avoir une estimation du MDT. Ces œufs contiendront probablement des anticorps contre la MN, mais les anticorps sont confinés au sac vitellin jusqu'à environ 15 jours d'incubation (Senne, 1998). Initialement, le virus se réplique dans les cellules qui tapissent le sac allantoïdien, lequel est libre d'anticorps. Le virus virulent se disséminera ensuite dans la cavité amniotique et dans l'embryon lui-même, ce qui provoquera sa mort. En revanche, un virus de la MN avirulent restera confiné à la cavité allantoïque car il n'a pas les enzymes nécessaires pour envahir les autres tissus.

Il existe une bonne corrélation entre le MDT et la maladie clinique qui résulte de l'infection des poulets sensibles. Toute souche de virus de la MN qui tue les embryons dans des œufs commerciaux en moins de 60 heures est certainement vélogène et pourra être utilisée comme souche d'épreuve.

7.0

Références bibliographiques

- Albiston, H.E. and Gorrie, C.J. 1942. Newcastle disease in Victoria. *Australian Veterinary Journal*, 18:75–79.
- Alders, R.G., Fringe, R. and Mata, B.V. 2001. Characteristics of the I-2 live thermostable Newcastle disease produced at INIVE. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B., ed. *SADC Planning Workshop on Newcastle Disease Control in Village Chickens. Proceedings of an International Workshop, Maputo, Mozambique, 6–9 March 2000*. ACIAR Proceedings No. 103:97–100.
- Alders, R. and Spradbrow, P.B. 2001. *Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual*. ACIAR Monograph 82. 112pp.
- Alders, R., dos Anjos, F., Bagnol, B., Fumo, A., Mata, B. and Young, M. 2002. *Controlling Newcastle disease in village chickens: a training manual*. ACIAR Monograph No. 86. 128pp.
- Aldous, E.W. and Alexander, D.J. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology*, 30:117–128.
- Alexander, D.J. 1991. Newcastle disease. In: Rweyemamu, M.M., Palya, V., Win, T. and Sylla, D., ed. *Newcastle Disease Vaccines for Rural Africa*. Debre Zeit, Ethiopia, Pan African Veterinary Vaccine Centre. pp. 7–45.
- Alexander, D.J. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Reed, W.M., ed. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn, American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania. pp. 156–163.
- Alexander, D.J. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Office International des Epizooties, Scientific and Technical Review*, 19(2):443–462.
- Alexander, D.J., Campbell, G., Manvell, R.J., Collins, M.S., Parsons, G. and McNulty, M.S. 1992. Characterisation of an antigenically unusual virus responsible for two outbreaks of Newcastle disease in the Republic of Ireland in 1990. *The Veterinary Record*, 130:65–68.
- Allan, W.H. and Gough, R.E. 1974. A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease (1) A comparison of macro and micro methods. *The Veterinary Record*, 95:120–123.
- Allan, W.H., Lancaster, J.E. and Toth, B. 1978. *Newcastle disease vaccines*. FAO, Rome, Italy.
- Amakye-Anim, J., Awuni, J.A., Coleman, T. and Seddor, V. 2000. Ghanaian trials with a locally produced thermostable Newcastle disease vaccine (strain I-2) in chickens. Paper presented at the Ghana Animal Science Association (GASA) 25th Animal Science Symposium on Sustaining Ghana's Livestock Industry in a Competitive World Market, Kumasi, October 4–7 2000.
- Animal Health Australia 2010. *Disease strategy: Newcastle disease (Version 3.2)*. Australian Veterinary Emergency Plan (AUSVETPLAN), Edition 3, Primary Industries Ministerial Council, Canberra, ACT.
- ASEAN 1998. *Manual of ASEAN standards for animal vaccines*. Jakarta: ASEAN Secretariat, Livestock Production Series No. 2A. (http://www.aseansec.org/agr_pub/ls2.doc)

- Beard, C.W. and Hanson, R.P. 1984. Newcastle disease. In: Hofstad, M.S., Barnes, H.J., Calnek, B.W., Reid, W.M. and Yoder, H.W., ed. *Diseases of Poultry*, 8th edn, Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 452–470.
- Bell, J.G. 2001. A comparison of the different vaccines available for the control of Newcastle disease in village chickens. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B., ed. *SADC Planning Workshop on Newcastle Disease Control in Village Chickens. Proceedings of an International Workshop*, Maputo, Mozambique, 6–9 March 2000. *ACIAR Proceedings No. 103:56–60*.
- Bensink, Z. and Spradbrow, P. 1999. Newcastle disease virus strain I-2: a prospective thermostable vaccine for use in developing countries. *Veterinary Microbiology*, 68:131–139.
- Bermudez, A.J. 2003. Principles of disease prevention: diagnosis and control. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E., ed. *Diseases of Poultry*, 11th edn, Mosby-Wolfe, Iowa State University Press, p. 41.
- Bounous, D.I. and Stedman, N.L. 2000. Normal avian hematology: chicken and turkey. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C., ed. *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th edn, Lippincott, Williams and Wilkins. p. 1147.
- Burleson, F.G., Chambers, T.M. and Wiedbrauk, D.L. 1992. *Virology: a laboratory manual*. Academic Press, Sydney.
- Buza, J.J. and Mwamuhehe, H.A. 2001. Country report: Tanzania. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B., ed. *SADC Planning Workshop on Newcastle Disease Control in Village Chickens. Proceedings of an International Workshop*, Maputo, Mozambique, 6–9 March 2000. *ACIAR Proceedings No. 103:38–42*.
- Cannon, R.M. and Roe, R.T. 1982 *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. Australian Bureau of Animal Health, Department of Primary Industry. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Catty, D. and Raykundalia, C. 1988. Production and quality control of polyclonal antibodies. In: Catty, D., ed. *Antibodies Vol. 1. A Practical Approach*. IRL Press Ltd, Oxford. p. 62.
- Dias, P.T., Alders, R.G., Fringe, R. and Mata, B.V. 2001. Laboratory and field trials with thermostable live Newcastle disease vaccines in Mozambique. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B., ed. *SADC Planning Workshop on Newcastle Disease Control in Village Chickens. Proceedings of an International Workshop*, Maputo, Mozambique, 6–9 March 2000. *ACIAR Proceedings No. 103:91–96*.
- Doyle, T.M. 1927. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *Journal of Comparative Pathology*, 40:144–169.
- EDQM, 2010. Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 6th edition. Strasbourg.
- Freshney, R.J. 1994. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 3rd edn, Wiley-Liss, New York.
- Geering, W.A., Forman, A.J. and Nunn, M.J. 1995. *Exotic diseases of animals*. Australian Government Publishing Service, Canberra. pp. 422–430.
- Gould, A.R., Kattenbelt, J.A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, A. and Westbury, H.A. 2001. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus Research*, 77:51–60.

- Hanson, R.P. and Brandly, C.A. 1955. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science*, 122:156–157.
- Hlaing, W., Thein, M., Khin, A., Than, T.T. and Maung, T. 2000. Experiment on thermostable Newcastle disease vaccine I-2 strain. *Proceedings of the Myanmar Academy of Agricultural, Forestry, Livestock and Fishery Science Annual Research Conference*, Yangon, 3–5 April, 2000. pp. 50–59.
- Hooper, P.T., Russell, G.M., Morrow, C.J. and Segal, I.Y. 1999. Lentogenic Newcastle disease virus and respiratory disease in Australian broiler chickens. *Australian Veterinary Journal*, 77:53–54.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. 1962. *Review of Medical Microbiology*, 5th edn, Lange Medical Publications, Los Altos, California.
- Johnstone, R.N. 1933. The pseudopoultry plague: the second outbreak. *Journal of Agriculture of Victoria*, 31:80–82.
- Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture 2000. Guidelines for establishing quality systems in veterinary diagnostic testing laboratories. Report of a Joint FAO/IAEA Consultants Meeting/Workshop. Vienna International Centre, 4–8 September 2000. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/guidelines-eng-may02.pdf>
- Kattenbelt, J.A., Meers, J., Gould, A.R. 2006. Genome sequence of the thermostable Newcastle disease virus (strain I-2) reveals a possible phenotypic locus. *Veterinary Microbiology* 114:134–41.
- Kite, V.G., Boyle, D.B., Heine, H.G., Pritchard, I., Garner, M.G., East, I.J. 2007. A serological and virological survey for evidence of infection with Newcastle disease virus in Australian chicken farms. *Australian Veterinary Journal* 85:236–42.
- Maas, R.A., Oei, H.L., Kemper, S., Koch, G. and Visser, L. 1998. The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or Clone 30 leads to an over estimation of protective serum antibody titres. *Avian Pathology*, 27:625–631.
- Maclean, M.F. and Ramsay, M.J. 1999. Training course in local production of I-2 MN vaccine. FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok.
- Mariner, J.C. 1997. The use of lyophilization in the manufacture of vaccines. In: Mowat, N. and Rweyemamu, M., ed. *Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for Use in Developing Countries*. FAO Animal Health and Production Series No. 35. FAO, Rome, Italy. pp. 251–266.
- McNulty, M.S., Adair, B.M., O’Loan, C.J. and Allan, G.M. 1988. Isolation of an antigenically unusual paramyxovirus type 1 from chickens. *Avian Pathology*, 17:509–513.
- Mebus, C.A. 1997. The principles of good laboratory practices, including safety in vaccine production and quality control. In: Mowat, N. and Rweyemamu, M., ed. *Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for Use in Developing Countries*. FAO Animal Health and Production Series No. 35. FAO, Rome, Italy. pp. 309–315.
- Nagai, Y., Shimokata, K., Yoshida, T., Hamaguchi, M., Hnuma, M., Maeno, K., Matsumoto, T., Klenk, H.D. and Rott, R. 1979. The spread of a pathogenic and an apathogenic strain of Newcastle disease virus in the chick embryo as depending on the protease sensitivity of the virus glycoproteins. *Journal of General Virology*, 45:263–272.

- OIE 2011a. Terrestrial Animal Health Code 2011. http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.1.2.htm
- OIE 2011b. Newcastle disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- OIE 2011c. Principles of veterinary vaccine production. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- OIE 2011d. Biosafety and biosecurity in the veterinary microbiology laboratory and animal facilities. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- OIE 2011e. Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Osol, A., ed. 1972. Blakiston's Gould Medical Dictionary, 3rd edn, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Reed, L.J. and Muench, L.H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27:493–497.
- Rehmani, S.F. 1995. Oral vaccination in chickens against Newcastle disease and some factors affecting vaccination in developing countries. PhD Thesis, Department of Veterinary Pathology, University of Queensland.
- Rott, R. 1979. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. *Archives of Virology* 59:285–298.
- Rovozzo, G.C. and Burke, C.N. 1973. A manual of basic virological techniques. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- Senne, D.A. 1998. Virus propagation in embryonating eggs. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Reed, W.M., ed. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn, American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania. pp. 235–240.
- Simmons, G.C. 1967. The isolation of Newcastle disease virus in Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 43:29–31.
- Soulebot, J.P., Palya, V.J., Rweyemamu, M. and Sylla, D. 1997. Quality assurance and good manufacturing practice. In: Mowat, N. and Rweyemamu, M., ed. *Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for Use in Developing Countries*. FAO Animal Health and Production Series No. 35. FAO, Rome, Italy. pp. 297–308.
- Spradbrow, P.B. 1992. Heat-stable vaccines as one approach to the control of Newcastle disease in village chickens. *Newcastle Disease in Village Chickens: Control with Thermostable Oral Vaccines*. Proceedings of an International Workshop, Kuala Lumpur, Malaysia, 6–10 October 1991. ACIAR Proceedings No. 39:11–14.
- Spradbrow, P.B. 2001. Thermostable Newcastle disease vaccines. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B., ed. *SADC Planning Workshop on Newcastle Disease Control in Village Chickens*. Proceedings of an International Workshop, Maputo, Mozambique, 6–9 March 2000. ACIAR Proceedings No. 103:61–66.

- Spradbrow, P., Bensink, Z. and Grimes, S. 1995. Small-scale production and testing of Newcastle disease vaccine. Laboratory manual. Department of Veterinary Pathology, University of Queensland.
- Spradbrow, P.B., MacKenzie, M. and Grimes, S.E. 1995. Recent isolates of Newcastle disease virus in Australia. *Veterinary Microbiology*, 46:21–28.
- Spradbrow, P., Grimes, S., Young, M., Meers, J., Wambura, P., Bensink, Z., Lobo, Q., da Silva, A., Buza, J., Awuni, J., Msami, H. 2001. Studies on the I-2 Newcastle disease vaccine. Presentation at Coordination Meeting of ACIAR Project AS1/96/96 'Investigations into the Control of Newcastle Disease in Village Chickens in Mozambique'. Tofo, Mozambique, 7–9 November 2001.
- Srinivasan, V.A., Kariath, A.P. and Bangar Raju, P.B.V.P. 1997. Bottling, labelling and packaging of vaccine. In: Mowat, N. and Rweyemamu, M., ed. *Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for Use in Developing Countries*. FAO Animal Health and Production Series No. 35. FAO, Rome, Italy. pp. 297–308.
- Terregino, C. and Capua, I. 2009. Conventional Diagnosis of Newcastle Disease Virus Infection. In: Capua, I. and Alexander, D.J., ed. *Avian Influenza and Newcastle Disease*, Springer-Verlag Italia. pp. 123–125.
- Thayer, S.G. and Beard, C.W. 1998. Serologic procedures. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Reed, W.M., ed. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn, American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania. pp. 255–266.
- Tu, T.D. 2001. Village chicken production in Vietnam and Newcastle disease control with thermostable vaccine. In: Alders, R.G. and Spradbrow, P.B., ed. *SADC Planning Workshop on Newcastle Disease Control in Village Chickens. Proceedings of an International Workshop*, Maputo, Mozambique, 6–9 March, 2000. ACIAR Proceedings No. 103:110–114.
- Tu, T.D., Phuc, K.V., Dinh, N.T.K., Quoc, D.N. and Spradbrow, P.B. 1998. Vietnamese trials with a thermostable Newcastle disease vaccine (strain I-2) in experimental and village chickens. *Preventive Veterinary Medicine*, 34:205–214.
- Vannier, P. 1997. Registration, licensing, controls and practical issues related to veterinary vaccines. In: Mowat, N. and Rweyemamu, M., ed. *Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for Use in Developing Countries*. FAO Animal Health and Production Series No. 35. FAO, Rome, Italy. pp. 155–165.
- Versteeg, J. 1985. *A colour atlas of virology*. Wolfe Medical Publications, London.
- VICH. 2002. Testing for residual moisture. http://www.vichsec.org/pdf/03_2003/Gl26_st7.pdf
- Villegas, P. 1998. Titration of biological suspensions. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Reed, W.M., ed. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edn, American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania. pp. 248–254.
- Wambura, P.N., Kapaga, A.M. and Hyera, J.M.K. 2000. Experimental trials with a thermostable Newcastle disease virus (strain I-2) in commercial and village chickens in Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, 43:75–83.
- Wambura, P.N., Meers, J., Kattenbelt, J.A., Gould, A.R. and Spradbrow, P.B., 2007. Deduced amino acid sequences surrounding the fusion glycoprotein cleavage site and of the carboxyl-terminus of haemagglutinin-neuraminidase protein

of the avirulent thermostable vaccine strain I-2 of Newcastle disease virus. *Veterinary Research Communications*, 31(1):105–12.

- Wambura, P.N. 2009a. Vaccination of chickens using raw rice coated with novel trehalose nano-organogels containing Newcastle disease (strain I-2) vaccine. *Tropical Animal Health and Production*, 41:797–802.
- Wambura, P.N. 2009b. Formulation of novel trehalose flakes for storage and delivery of Newcastle disease (strain I-2) vaccine to chickens. *African Journal of Biotechnology*, 8:6731–6734.
- Wambura, P.N., 2011. Formulation of novel nano-encapsulated Newcastle disease vaccine tablets for vaccination of village chickens. *Tropical Animal Health and Production*, 43:165–169.
- Westbury, H.A. 1979. Newcastle disease virus: some properties of Australian strains. *Avian Diseases*, 23:564–570.
- Westbury, H.A. 1981. Newcastle disease virus in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 57:292–297.
- Westbury, H.A. 2001. Newcastle disease virus: an evolving pathogen? *Avian Pathology*, 30:5–11.
- Worrall, E.E. 1997. Basic laboratory services and media preparation for vaccine production. In: Mowat, N. and Rweyemamu, M., ed. *Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for Use in Developing Countries*. FAO Animal Health and Production Series No. 35. FAO, Rome, Italy. p. 226.
- Young, M., Chikungwa, P., Ngeleja, C., Lobo, Q. and Fumo, A. 2009. Managing the risks to vaccine quality associated with the small-scale production of I-2 Newcastle disease vaccine in developing countries. In: Alders R.G., Spradbrow P.B. and Young M.P., eds. *Village chickens, poverty alleviation and the sustainable control of Newcastle disease*. Proceedings of an international conference held in Dar es Salaam, Tanzania, 5–7 October 2005. *ACIAR Proceedings No. 131*:108–112.

8.0

Glossaire

Activité – force relative d'un produit biologique déterminé par des méthodes adéquates de test (initialement l'activité est mesurée en utilisant un test d'efficacité chez les animaux. Plus tard, ceci peut être corrélé avec des tests de teneur en antigènes, ou de réponse en anticorps, pour les tests de routine de l'activité du lot.)

Adsorption – adhésion d'une substance à une particule organique dans une solution: par exemple, l'adhérence d'un virus à une cellule.

Agglutination – agglomération.

Antigène – substance qui stimule la production d'anticorps lorsqu'elle est introduite dans le corps.

Antiseptique – agent chimique qui est appliqué par voie topique, pour empêcher la croissance de micro-organismes.

Aseptique – qui prévient la contamination microbienne de tissus vivants ou de matériaux stériles en excluant, en enlevant ou en tuant les micro-organismes.

Assurance qualité (AQ) – inclut toutes les actions et les spécifications nécessaires planifiées pour assurer qu'un produit réponde aux exigences prescrites en matière de sécurité.

Biosécurité – toutes les mesures prises pour prévenir la transmission d'un organisme infectieux d'un hôte à un autre. Dans le cas de la maladie de Newcastle, la biosécurité englobe toutes les mesures prises pour prévenir l'introduction du virus de la MN dans une ferme ou dans un élevage de poulets.

Bonnes pratiques de fabrication (BPF) – partie de l'AQ qui garantit que le produit est fabriqué dans un environnement sain et propre, par des méthodes indiquées, sous une supervision adéquate, avec des procédures efficaces de contrôle de qualité, de sorte que le produit final réponde à des normes de qualité.

Cahier de paille – données brutes ou les dossiers de laboratoire

Certificat d'analyse – spécifications écrites du produit.

Contamination – introduction de micro-organismes à des articles, des matériaux ou des tissus stériles.

Contrôle de la qualité – partie des BPF qui englobe le prélèvement d'échantillons, les spécifications du produit et les tests effectués, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de distribution.

Contrôle en cours – méthodes de tests effectuées lors de la fabrication d'un produit biologique pour s'assurer que le produit sera conforme aux normes de qualité convenues.

Désinfectant – agent qui est destiné à tuer ou à éliminer les micro-organismes pathogènes, à l'exception des spores bactériennes.

Diluant – liquide fourni séparément et utilisé pour diluer un vaccin à la concentration correcte avant administration. Il s'agit généralement d'une solution saline stérile ou d'eau stérile.

Dilutions – les dilutions sont données pour la confection de réactifs liquides ou d'un vaccin, elles sont exprimées comme, par exemple, 1 à 3, ce qui signifie un volume ajouté à trois volumes.

Dose – quantité recommandée sur l'étiquette d'un produit biologique, à donner à un animal d'un âge spécifié, à un moment donné, et par une voie d'administration spécifiée.

Dose infectieuse moyenne (50%) pour l'embryon (DIE₅₀) – quantité requise d'un agent pour infecter 50% des hôtes inoculés. Normalement exprimée comme le nombre d'unités infectieuses par volume. Cela représente le titre de la suspension.

Dose létale moyenne (50%) pour l'embryon (DLE₅₀) – quantité requise d'un agent pour tuer 50% des hôtes inoculés. Normalement exprimée comme le nombre d'unités létales par volume. Cela représente le titre de la suspension.

Dossier de lot – essentiellement, l'histoire écrite ou le journal d'un lot spécifique de vaccins. Le dossier de lot retrace les traitements des composants et des matières une fois que le processus de production a commencé.

Efficacité – capacité spécifique du produit biologique à produire le résultat pour lequel il est offert, lorsqu'il est utilisé dans les conditions recommandées par le fabricant.

Exempt d'agents pathogènes spécifiques (SPF) – se réfère aux animaux qui se sont révélés exempts d'agents pathogènes par l'utilisation de tests adéquats, et se réfère également aux œufs provenant d'oiseaux SPF.

Fiche technique de sécurité du matériel (MSDS) – donne des informations sur les risques associés à l'utilisation du produit chimique, y compris le feu et les données sur les dangers d'explosion, les précautions nécessaires lors du maniement du produit chimique, comment faire face aux accidents et aux renversements, et les premiers soins.

Hémolyse – destruction de globules rouges et libération d'hémoglobine.

Hémagglutination – agglutination de globules rouges.

Inhibition d'hémagglutination – inhibition de l'hémagglutination.

Isotonique – indique une solution ayant la même pression osmotique que d'autres solutions avec laquelle elle est comparée, par exemple une solution de sel physiologique et le sérum sanguin.

Laboratoire de référence – laboratoire reconnu pour son expertise scientifique en matière de diagnostic pour une maladie animale et/ou une méthodologie de test particulières; inclut la capacité de caractériser et d'attribuer des valeurs aux réactifs et aux échantillons de référence.

Libre de contamination – libre de contaminants viables d'origine bactérienne et fongique et de virus parasites qui pourraient être nuisibles aux poulets recevant le vaccin.

Livre de bord – livre contenant un enregistrement permanent de tous les événements dans la vie d'une pièce d'équipement, tels que l'entretien, les pannes, les réparations et les résultats des tests de validation.

Lot – tous les récipients finaux scellés, provenant du même volume homogène de vaccin et identifié par un numéro de code unique.

Lot de semence de travail – ensemble d'aliquots de virus dérivé du lot de semence primaire et à partir duquel le vaccin est produit.

Lot de semence primaire – ensemble d'aliquots de virus à un niveau de passage spécifique, qui a été sélectionné et stocké de manière permanente par le producteur, et à partir duquel tous les autres passages de semences sont dérivés, dans les limites des niveaux autorisés. Les aliquots doivent être distribués dans des flacons en une seule opération, traités ensemble de manière à assurer une bonne uniformité, et stockés de manière à assurer leur stabilité.

p / v – poids par volume (solide ajouté à un liquide).

Passage – transmission naturelle ou expérimentale d'un agent, à partir d'un hôte vers un autre.

Pathogénique – capable de provoquer une maladie chez un hôte sensible.

Procédure Opératoire Normalisée (PON) – instructions écrites ‘étape-par-étape’ qui décrivent comment exécuter une fonction spécifique dans un processus. La PON doit être concise, pertinente et capable d’être comprise par la personne qui effectue la procédure.

Produit final (lot) – tous les flacons qui ont été remplis à partir du même lot homogène de vaccin en une seule séance de travail, et qui ont été lyophilisés ensemble en une seule opération continue (le cas échéant), scellés en une séance de travail, et identifiés par un numéro de code unique.

Pureté – libre de micro-organismes étrangers et de matières étrangères (organiques ou inorganiques) qui pourraient nuire à la sécurité, à l’activité ou à l’efficacité du produit, comme déterminée par des méthodes adéquates de test pour le produit.

Qualité – caractéristiques et particularités d’un produit qui contribuent à sa capacité de satisfaire des besoins exprimés ou implicites.

Risque – probabilité que la substance ou l’agent dangereux soit nuisible dans des circonstances spécifiques.

Sécurité – libre de propriétés provoquant des réactions locales ou systémiques indues lorsqu’utilisé comme recommandé ou suggéré par le fabricant.

Stabilisant – substance ajoutée à un vaccin pour l’aider à maintenir son efficacité en gardant l’antigène et d’autres composants du vaccin stables au stockage. Par exemple le lactose, le saccharose, l’albumine de sérum bovin et la gélatine.

Stabilité – capacité de conserver une activité dans des conditions spécifiées.

Stérilisation – destruction complète des micro-organismes.

Stérilité – exempt de micro-organismes contaminants viables, tel que démontré par des tests approuvés et adéquats.

Température ambiante – température d’un environnement de travail. Des limites précises pour cela ne peuvent pas être réglées, elle se situe entre 18 et 25°C. Lorsque le test indique la température ambiante, ceci devrait être réalisé avec la climatisation si nécessaire, sinon les paramètres du test peuvent être affectés.

Thermotolérance – terme utilisé pour décrire la capacité du virus vaccinal-2 de la MN et du virus parental de conserver un niveau d’infectivité après une exposition à la chaleur, c’est-à-dire que la chaleur ne dégrade le virus qu’après un certain temps. Pour le vaccin I-2 de la MN ceci est défini par le temps durant lequel le vaccin conservera un titre infectieux suffisant pour induire une réponse immunitaire protectrice, à une température particulière. Les termes ‘résistants à la chaleur’, ‘dégradation retardée par la chaleur’ et ‘thermostable’ peuvent aussi être rencontrés. Dans notre expérience, l’utilisation du terme ‘thermostable’ prête à confusion. Par conséquent, nous préférons utiliser le terme ‘thermotolérant’.

Titrage par point final – point dans un essai où la plus forte dilution de la substance à l’essai donne un résultat positif. En titrant l’infectiosité, le point final a lieu quand la plus forte dilution de virus va produire un effet détectable dans 50% des hôtes inoculés. En général il est déterminé mathématiquement.

Titre – expression de la puissance d’une solution: par exemple, la concentration de virus infectieux présent dans un échantillon ou une mesure de la concentration d’un anticorps spécifique dans un sérum.

v / v – volume par volume (deux liquides).

Validation – preuve que la procédure, le processus, l’équipement, le matériel, l’activité ou le système conduisent à des résultats attendus.

Virulent – provoquant une maladie grave.

9.0

Annexes

Annexe 1.1

Solution saline de phosphate tamponné (sans calcium ni magnésium)

Équipement et matériels

Phosphate disodique	— Na_2HPO_4	— PM 142
	ou — $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	— PM 178
	ou — $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	— PM 358
Phosphate de potassium dibasique	— KH_2PO_4	— PM 136,1
Chlorure de sodium	— NaCl	— PM 58,44
Chlorure de potassium	— KCl	— PM 74,56

Eau distillée

Une balance

Un agitateur magnétique avec plaque chauffante

Un pH-mètre

Un erlenmeyer (1 L ou 5 L)

Des bouteilles (100 ml, 250 ml, 500 ml)

Une éprouvette graduée (1 L)

Procédure

1. Recueillir l'eau distillée directement à partir du distillateur le jour même de la préparation.
2. Peser tous les sels selon la formule présentée dans le tableau ci-dessous et placer dans l'erlenmeyer.

Produits de base	g/L	g/5 L
Phosphate disodique	0,92	4,6
ou Phosphate disodique ($2\text{H}_2\text{O}$)	1,15	5,75
ou Phosphate disodique ($12\text{H}_2\text{O}$)	2,32	11,6
Phosphate de potassium dibasique	0,2	1,0
Chlorure de potassium	0,2	1,0
Chlorure de sodium	8,0	40,0
Eau distillée	Compléter jusqu'à 1 L	Compléter jusqu'à 5 L

3. Introduire le barreau d'agitation magnétique dans l'erlenmeyer.
4. Ajouter 800 ml (ou 4,8 L) d'eau distillée aux sels (utiliser l'éprouvette de 1 L pour mesurer le volume d'eau).
5. Placer l'erlenmeyer sur l'agitateur magnétique avec plaque chauffante pour permettre aux sels de se dissoudre.
6. Une fois que tous les sels sont dissous, laisser refroidir à température ambiante (25°C) et ajuster le volume de la solution au volume final exact nécessaire.

7. Calibrer le pH-mètre.
8. Ajuster le pH de la PBS à pH 7,2 (utiliser du HCl concentré pour abaisser le pH).
9. Répartir la PBS dans des bouteilles et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
10. Marquer toutes les bouteilles clairement, en écrivant l'état de stérilité (stérile/non stérile) et la date de préparation sur l'étiquette.
11. Stocker à température ambiante.

Annexe 1.2**Tampon de formol neutre à 10%****Consignes de sécurité**

Le formaldéhyde est toxique si inhalé et irritant pour les yeux, la peau et les poumons. Utiliser des gants lors du maniement du formol.

Préparer la solution sous une hotte.

Équipement et matériels

Hydrogénophosphate de sodium — Na_2HPO_4 (anhydre) — PM 142

Dihydrogénophosphate de potassium — KH_2PO_4 — PM 136

Formol (solution formaldéhyde à 40%)

Eau distillée

Une balance

Un agitateur magnétique avec plaque chauffante

Un pH-mètre

Un erlenmeyer (1 L ou 5 L)

Des bouteilles (100 ml, 250 ml, 500 ml)

Une éprouvette graduée (1 L)

Procédure

1. Recueillir l'eau distillée directement à partir du distillateur le jour même de la préparation.
2. Peser tous les sels selon la formule présentée dans le tableau ci-dessous et placer dans l'erlenmeyer.

Produits de base	g/L	g/5 L
Hydrogénophosphate disodique (Na_2HPO_4) (anhydride)	6,55	32,75
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	4,0	20,0
Eau distillée	Compléter jusqu'à 1 L	Compléter jusqu'à 5 L

3. Ajouter 100 ml (ou 500 ml) de formol.
4. Compléter jusqu'à 1 L (ou 5 L) avec de l'eau distillée.
5. Stocker à température ambiante.

NOTE:

- Cette solution est utilisée comme fixateur général de tissus.
- Le volume du fixateur doit être au moins dix fois celui des tissus.
- L'épaisseur des tranches de tissu ne doit pas être supérieure à 5 mm.
- Le formol à 10% peut également être préparé en mélangeant le formol avec de l'eau du robinet (mais le pigment de formol se verra dans les tissus).

Annexe 1.3

Solution d'iode à 3,5%

Consignes de sécurité

L'iode est irritant pour les yeux, la peau et le système respiratoire.

Porter des gants lors de la manipulation de produits chimiques.

Porter des lunettes de sécurité ou une visière lors de la manipulation et du mélange de produits chimiques, ou bien préparer la solution sous une hotte.

Équipement et matériels

Iode	— I ₂	— PM 253,81
Alcool éthylique (95%)		
Eau		

Procédure

1. Dissoudre 3,5 g d'iode dans 30 ml d'eau.
2. Diluer jusqu'à 100 ml avec de l'alcool éthylique à 95%.

ou

Équipement et matériels

Iode	— I ₂	— PM 253,81
Iodure de sodium	— NaI	— PM 149,92

Procédure

1. Dissoudre 3,5 g d'iode et 1,5 g d'iodure de sodium dans 30 ml d'eau.
2. Diluer jusqu'à 100 ml avec de l'alcool éthylique à 95%.

Annexe 1.4**Tampon de glycérol phosphate à 50%***Équipement et matériels*

Hydrogénophosphate de sodium	— $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	— PM 358
Dihydrogénophosphate de potassium	— KH_2PO_4	— PM 136,09
Glycérol AR	— $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	— PM 92,1
Eau distillée		
Une balance		
Un agitateur magnétique avec plaque chauffante		
Un pH-mètre		
Un erlenmeyer (1 L ou 5 L)		
Des bouteilles (100 ml, 250 ml, 500 ml)		
Une éprouvette graduée (1 L)		

*Procédure***Tampon Phosphate de 0.04 M (pH 7,6)**

1. Préparer les deux solutions suivantes:

Solution A

- Peser 7,13 g d'hydrogénophosphate de sodium dans un flacon.
- Ajouter 1 L d'eau distillée.

Solution B

- Peser 5,45 g de dihydrogénophosphate de potassium dans un flacon.
- Ajouter 1 L d'eau distillée.

2. Préparer un tampon phosphate de 0,04 M (pH 7.6)

- Mélanger six volumes de la solution A (par exemple, 600 ml) avec un volume de solution B (par exemple, 100 ml) pour donner un tampon de pH 7,6.
- Vérifier le pH en utilisant un pH mètre, et ajuster si nécessaire.
- Stériliser par autoclavage et revérifier le pH.

Tampon de glycérol phosphate

1. Ajouter des volumes égaux de glycérol AR et 0,04 M de tampon phosphate.
2. Stériliser par autoclavage.
3. Vérifier et ajuster le pH.
4. Conserver à température ambiante.

NOTE:

- Du glycérol à 50% peut aussi être préparé en utilisant de la PBS ou de l'eau distillée.
- La majorité des bactéries pathogènes ne survivent pas plus de 5–6 jours dans du glycérol à 50% (Jawetz, Melnick et Adelberg 1962).

Annexe 1.5

Alcool à 70%

Équipement et matériels

Ethanol absolu ou éthanol à 95%

Eau distillée

Eprouvette graduée (100 ml ou 1 L)

Procédure

1. Mélanger 70 ml d'éthanol absolu (100%) avec 30 ml d'eau distillée.

ou

Mélanger 70 ml d'éthanol à 95% avec 25 ml d'eau distillée.

Annexe 1.6

La solution d'Alsever

Équipement et matériels

Dextrose (D + Glucose)	— $C_6H_{12}O_6$	— PM 180,2
Citrate de sodium	— $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	— PM 294,1
Chlorure de sodium	— NaCl	— PM 58,44
Acide citrique	— $C_6H_8O_7$	— PM 192,1
Eau distillée		
Une balance		
Un agitateur magnétique		
Un pH-mètre		
Un erlenmeyer (1 L ou 5 L)		
Des bouteilles (100 ml, 250 ml, 500 ml)		
Une éprouvette graduée (1 L)		

Procédure

1. Recueillir l'eau distillée directement à partir du distillateur le jour même de la préparation.
2. Peser tous les sels selon la formule présentée dans le tableau ci-dessous.

Produits de base	g/100 ml	g/L
Dextrose	2,05	20,5
Citrate de sodium	0,8	8,0
Chlorure de sodium	0,42	4,2
Acide citrique	0,055	0,55
Eau distillée	Compléter jusqu'à 100 ml	Compléter jusqu'à 1 L

3. Transférer dans une éprouvette de 1 L et compléter jusqu'au volume nécessaire avec de l'eau distillée.
4. Ajuster le pH à 6,1 en utilisant une solution fraîchement préparée d'acide citrique à 10%.
5. Répartir dans des bouteilles.
6. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Utiliser un échappement de vapeur lent.
7. Conserver à 4°C. La solution demeurera stable pendant longtemps.

Annexe 1.7

Solution d'acide-citrate-dextrose (ACD)

Équipement et matériels

Citrate de sodium	— $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	— PM 294,1
Acide citrique	— $C_6H_8O_7$	— PM 192,1
Dextrose (D(+)-Glucose)	— $C_6H_{12}O_6$	— PM 180,2
Eau distillée		
Une balance		
Un agitateur magnétique		
Un pH-mètre		
Un erlenmeyer (1 L ou 5 L)		
Des bouteilles (100 ml, 250 ml, 500 ml)		
Une éprouvette graduée (1 L)		

Procédure

1. Recueillir l'eau distillée directement à partir du distillateur le jour même de la préparation.
2. Peser tous les sels selon la formule présentée dans le tableau ci-dessous.

Produits de base	g/500 ml	g/1 L
Acide citrique	4,0	8,0
Citrate de sodium	11,26	22,52
Dextrose	11,0	22,0
Eau distillée	500 ml	1 L

3. Compléter jusqu'à 500 ml (ou 1 L) avec de l'eau distillée.
4. Répartir dans des bouteilles.
5. Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.
6. Stocker à 4°C.

Annexe 1.8

Solution véronal gélatine dextrose (VGD)

Équipement et matériels

Barbitone (acide diéthylbarbiturique, véronal)	— $C_8H_{12}N_2O_3$	— PM 184,2
Gélatine		
Barbitone sodique	— $C_8H_{11}N_2O_3Na$	— PM 206,2
Chlorure de calcium dihydraté	— $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	— PM 147
ou chlorure de calcium (anhydre)	— $CaCl_2$	— PM 111
Sulfate de magnésium	— $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— PM 246,5
Chlorure de sodium	— $NaCl$	— PM 58,44
Dextrose (D(+)-Glucose)	— $C_6H_{12}O_6$	— PM 180,2

Eau distillée

Une balance

Un agitateur magnétique avec plaque chauffante

Béchers (1 L)

Une éprouvette graduée (1 L)

Bouteilles de 100 ml

Procédure

Pour 1 L:

1. Recueillir l'eau distillée directement à partir du distillateur le jour même de la préparation.
2. Peser le barbitone et la gélatine dans un bécher selon la formule présentée dans le tableau ci-dessous.

Produits de base	g/1 L	g/2 L
Barbitone (acide diéthylbarbiturique)	0,58	1,16
Gélatine	0,60	1,20
Barbitone sodique	0,30	0,60
Chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,026	0,052
ou chlorure de calcium anhydre ($CaCl_2$)	0,02	0,04
Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,12	0,24
Chlorure de sodium ($NaCl$)	8,50	17,0
Dextrose	10,0	20,0
Eau distillée déionisée	1 L	2 L

3. Dissoudre dans 250 ml (ou 500 ml) d'eau distillée déionisée sur un agitateur magnétique avec plaque chauffante.
4. Peser les autres réactifs dans un bécher et dissoudre dans le reste d'eau.
5. Ajouter du barbitone dissous aux réactifs qui restent.
6. Compléter jusqu'à 1 L (ou 2 L).
7. Mesurer le pH et ajuster à 7,0–7,6.
8. Verser dans des bouteilles de 100 ml.
9. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
10. Stocker à 4°C.

NOTE:

L'achat et l'utilisation de Véronal (barbital, acide diéthylbarbiturique) qui entre dans la composition de la VGD, peuvent être limités par des règlements gouvernementaux.

Annexe 2

Liste générale de verrerie et de consommables de laboratoire

Verrerie

Pipettes – 1 ml, 5 ml, 10 ml
Pipettes Pasteur en verre
Erlenmeyers – 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 L, 2 L
Béchers – une gamme de différentes tailles
Tubes pour les dilutions en série – jusqu'à 10 ml
Epruvettes graduées – une gamme de différentes tailles
Bouteilles en verre avec bouchons à vis 20–30 ml, 5–10 ml
Grandes bouteilles en verre avec bouchons à vis 200 ml, 500 ml, 1 L, 2 L

Consommables

Seringues – 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
Aiguilles – 23 G × 32 mm, 25 G × 16 mm
Cônes pour pipetman
Tubes Eppendorf
Cryotubes
Plaques de microtitration de 96 puits à fond en V
Tubes à centrifuger en plastique – 10 ml, 50 ml
Bouteilles à centrifuger en plastique – 500 ml, 1 L, 2 L
Alcool
Ruban adhésif, cire ou Collodion (pour sceller le site d'inoculation dans les œufs)
Pénicilline, Streptomycine ou autres antibiotiques, en fonction des disponibilités
Produits chimiques généraux de laboratoire (voir les Annexes 1.1 à 1.8)
Étiquettes
Flacons, bouchons, capsules en aluminium pour le vaccin lyophilisé
Petites bouteilles ou pipettes jetables pour le vaccin liquide

Équipement

Lampe pour mirage d'œufs
Incubateur d'œufs
Bec Bunsen
Balance électronique
Agitateur magnétique avec plaque chauffante
Centrifugeuse
Distributeur de vaccin
Emporte-pièce
Foret
Portoirs à tubes
Pipetman monocanal et multicanaux

Annexe 3

Enregistrement du vaccin

Chaque produit vendu pour traiter ou prévenir des maladies chez les animaux doit être enregistré auprès de l'autorité nationale responsable de la réglementation de l'utilisation de ces produits. L'enregistrement des produits fabriqués localement ou importés permet de vérifier qu'ils répondent aux normes requises de qualité, de sécurité et d'efficacité, protégeant ainsi le bétail et assurant le maintien de la qualité et l'hygiène des aliments pour la consommation humaine.

Les producteurs de vaccins et les importateurs doivent travailler avec l'autorité d'enregistrement pour encourager la formulation de règlements et de normes qui soient réalistes, compte tenu des ressources humaines et financières disponibles, mais qui conduiront à des améliorations des normes de produits fabriqués et/ou utilisés.

Le service d'enregistrement définit les conditions de l'enregistrement et doit donner des directives sur la façon de déposer une demande d'enregistrement d'un produit, la documentation requise et autres informations, y compris:

- les conditions d'enregistrement
- la façon de déposer une demande d'enregistrement
- ce qui est nécessaire, par exemple:
- une licence de fabrication
 - l'inspection des lieux
 - un dossier d'information
 - les fichiers de données et les registres de toutes les étapes de fabrication (y compris les tests)
 - les spécifications du vaccin
 - les données relatives à la validation de la durée de vie du vaccin
 - les procédures opératoires standardisées.

Le **dossier d'information** doit contenir les informations pour appuyer la demande d'enregistrement – par exemple, des rapports d'experts, des détails analytiques, la description et les résultats des tests de sécurité, les tests d'efficacité et toute la documentation à l'appui de l'enregistrement (Vannier, 1997). Un guide ou un modèle pour le dossier d'information devrait être disponible auprès de l'autorité d'enregistrement.

Procédures Opératoires Normalisées (PON) devraient être rédigées pour chaque tâche spécifique dans le processus de production des vaccins. Toutes les tâches, telles que la calibration ou l'entretien d'une micropipette, la validation d'un processus tel que l'autoclavage, le nettoyage d'un incubateur à œufs ou le placement et le contrôle des pièges à insectes ou animaux nuisibles dans le poulailler de production des vaccins, doivent être documentées dans une PON. La PON doit être claire, concise, pertinente et rédigée dans un langage qui peut être facilement compris.

Les éléments clés d'une PON sont:

- la feuille de couverture indiquant:
 - le titre
 - le numéro de la procédure
 - le département
 - le numéro de la page
 - la date à laquelle la PON prend effet
 - la signature des personnes responsables pour la PON
 - le nom de la personne responsable pour la rédaction de la PON
- l'objectif expliquant le but principal de la procédure. Il définit si le but est de décrire le mode de fonctionnement, l'entretien, etc.
- le champ d'application de la PON, qui donne les limites de la procédure
- la position ou le titre et les rôles des personnes chargées d'effectuer la procédure
- la procédure, en donnant, étape par étape, les instructions écrites de façon à ce que la personne qui effectue la procédure ou la tâche comprenne ce qui doit être fait
- les dates pour réviser ou maintenir les PON. Elles devraient être revues au moins une fois par an.

La préparation de documents tels que les PON, les descriptions de postes et un Manuel de Qualité de laboratoire sont abordés dans *Guidelines for establishing quality systems in veterinary diagnostic testing laboratories* (Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture 2000).

Annexe 4

Utilisation d'un pipetman multicanaux

1. Sélectionner un pipetman avec la gamme appropriée de volumes.
2. Régler le volume à débiter conformément aux instructions du fabricant.
3. Monter des cônes jetables. Veiller à ce que le type de cône soit le type correspondant au pipetman. Pour assurer un montage correct, appuyer fermement sur les cônes, en utilisant un léger mouvement de torsion.
4. **Ne jamais utiliser un pipetman sans cônes.**
5. Tenir le pipetman verticalement; appuyer sur le piston ou le bouton jusqu'au premier arrêt.
6. Placer l'extrémité des cônes dans le liquide; relâcher la pression lentement et uniformément, en gardant le pouce sur le bouton ou sur le piston. Surveiller la manière dont le liquide est aspiré dans les cônes. S'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les cônes.
7. Retirer les cônes du liquide et vérifier que tous les cônes contiennent le même niveau de liquide.
8. Pour éjecter le liquide, maintenir l'extrémité des cônes légèrement inclinée contre la paroi du récipient. Appuyer sur le piston lentement et en douceur vers le bas jusqu'au premier arrêt. Attendre que le liquide résiduel descende dans les cônes et appuyer sur le piston jusqu'à l'arrêt final.
9. Éjecter les cônes utilisés dans un récipient approprié en appuyant sur le bouton d'éjection de cône. Toujours éjecter les cônes utilisés avant de mettre la pipette sur la paillasse puisque du liquide résiduel peut retourner dans le baril du pipetman.
 - Il est essentiel de nettoyer et de calibrer le pipetman régulièrement. Suivre les instructions du fabricant fournies avec l'instrument.
 - Pour la calibration, distribuer des volumes d'eau distillée dans un bécher pré-pesé ou dans une barquette de pesée, et peser à l'aide d'une balance analytique. Assumer qu' $1 \text{ mg} = 1 \mu\text{L}$.

Annexe 5

Conversion de r.p.m. en force centrifuge relative (FCR)

La vitesse centrifuge (la vitesse de rotation du rotor) est mesurée en tours par minute (r.p.m.). Cependant, la force centrifuge relative (FCR) qui est la force exercée sur le matériel centrifugé est une mesure plus correcte de la fonction centrifuge. La FCR dépend de la vitesse du rotor et du rayon de rotation, et elle est exprimée en $\times g$, un multiple de l'accélération due à la pesanteur.

Pour convertir la FCR en r.p.m.

1. Mesurer le rayon du rotor de la centrifugeuse, y compris les godets en position horizontale (en centimètres).
2. En utilisant la règle et le nomogramme (Figure 19), tracer une ligne imaginaire reliant le radius et la FCR (g).
3. Lire les r.p.m. là où la règle traverse la ligne r.p.m.

Pour convertir les r.p.m. en FCR

4. Mesurer le rayon du rotor de la centrifugeuse (en centimètres).
5. En utilisant la règle et le nomogramme (Figure 19), tracer une ligne imaginaire reliant le radius et les r.p.m.
6. Lire la FCR (g) là où la règle traverse la ligne de g .

Exemple

Le protocole exige qu'un échantillon soit centrifugé à une FCR de $500 \times g$. Le rayon du rotor de la centrifugeuse que vous utilisez est de 12 cm. En utilisant le nomogramme, on peut voir que votre centrifugeuse devra être fixée à 1900 r.p.m.

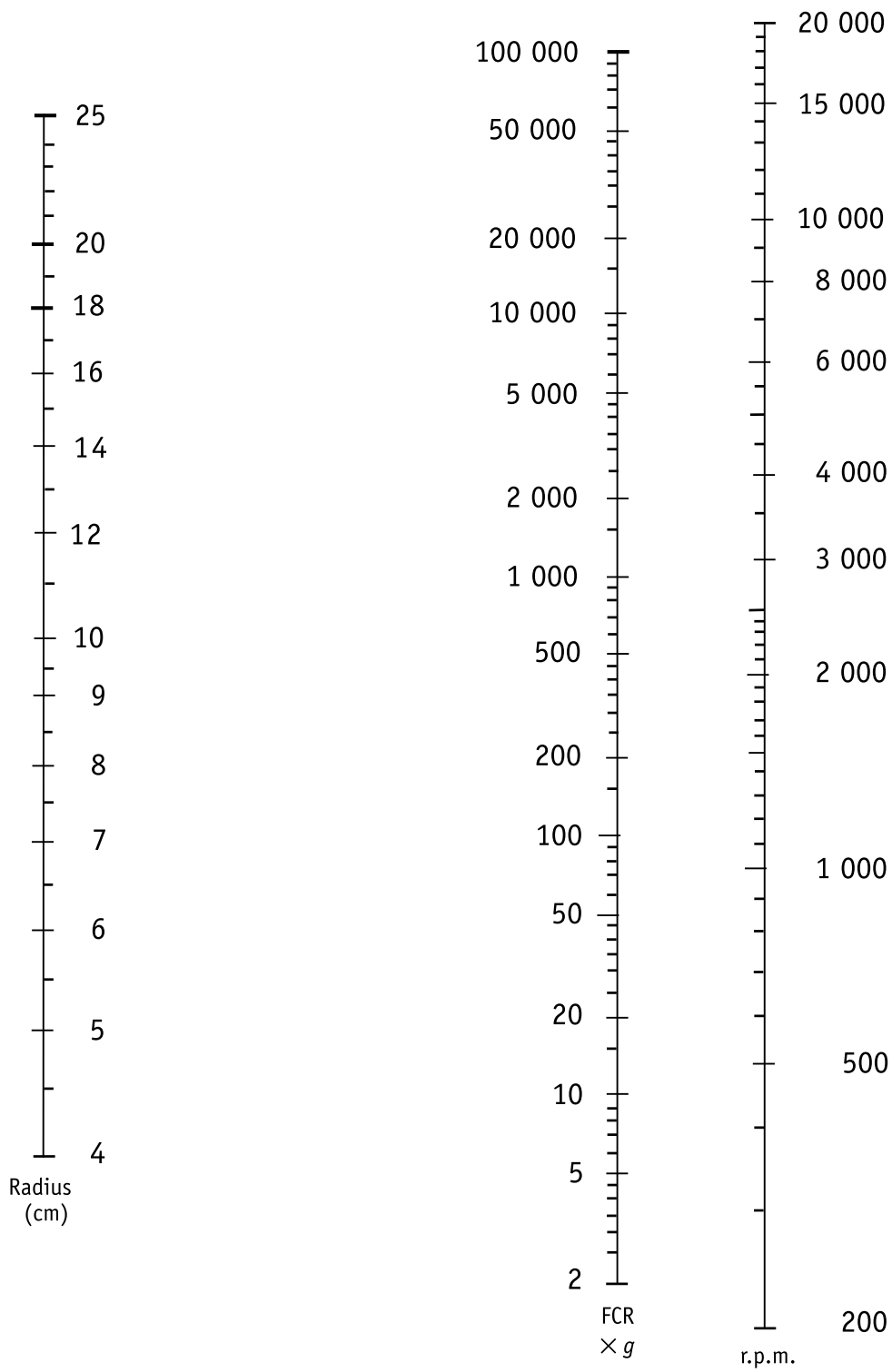


Figure 19: Nomogramme: un moyen facile de convertir la force centrifuge relative maximum (FCR) en r.p.m. ou les r.p.m. en FCR.

Annexe 6

Utilisation d'antibiotiques dans la production de vaccins

L'utilisation d'antibiotiques pour éviter les contaminations pendant la production du vaccin doit être évitée autant que possible. Les antibiotiques sont coûteux, parfois difficiles à obtenir, et ajoutent au coût de production du vaccin. Les producteurs de vaccins devraient également encourager une utilisation plus responsable des antibiotiques et opter pour une technique aseptique améliorée. De surcroît, de nombreuses autorités d'enregistrement ne permettent pas l'utilisation d'antibiotiques comme agents de conservation dans les vaccins, et les autorisent uniquement lors de la reconstitution du vaccin pour éviter les contaminations durant la vaccination.

Le tableau 5 énumère les antibiotiques autorisés dans les produits pharmaceutiques selon les normes américaines (Mebus 1997) ainsi que leurs fréquences d'usage.

Tableau 5: Les antibiotiques autorisés dans les produits pharmaceutiques (Mebus 1997) et leur spectre d'activité

Nom de l'antibiotique	Concentration autorisée par ml	Bactérie gram positif	Bactérie gram négatif	Levures	Moisissures	Mycoplasmes
Amphotéricine B	2,4 µg			■	■	
Nystatine	30,0 U			■	■	
Tétracyclines	30,0 µg	■	■			
Pénicilline	30,0 U	■				
Streptomycine	30,0 µg	■	■			
Polymixine B	30,0 µg		■			
Néomycine	30,0 µg	■	■			
Gentamycine	30,0 µg	■	■			■

Les combinaisons d'antibiotiques autorisées par la réglementation américaine sont:

- pénicilline et streptomycine
- amphotéricine B et l'un des autres antibiotiques présentés dans le tableau 5
- nystatine et l'un des autres antibiotiques présentés dans le tableau 5
- amphotéricine B (ou nystatine) avec une combinaison de pénicilline et de streptomycine
- amphotéricine B (ou nystatine) avec une combinaison de polymixine B et de néomycine

Annexe 7 Calcul du titre en utilisant la méthode Spearman-Kärber

Certains travailleurs préfèrent utiliser la méthode de Spearman-Kärber pour calculer le titre du virus (Villegas 1998) plutôt que d'utiliser la formule de Reed et Muench car elle ne comporte pas beaucoup de calculs, et les résultats semblent être aussi précis que ceux obtenus en utilisant la formule de Reed et Muench. Cependant, cette méthode ne peut être utilisée que lorsque les résultats des dilutions testées recouvrent la gamme complète d'infection de 0-100%.

A. Si le nombre d'œufs est constant à chaque dilution, le titre de suspension du virus (DIE_{50}) est calculé en suivant cette formule:

$$DIE_{50} = x + \frac{1}{2}d - \frac{d\Sigma r}{n}$$

dans laquelle

- x = la plus haute dilution à laquelle tous les œufs étaient non infectés (exprimé comme valeur inverse, ou valeur positive)
- d = le facteur de dilution (si des dilutions au 1/10ème ont été utilisées, le facteur de dilution est de 1)
- Σr = le nombre total d'œufs non infectés (dans une dilution allant de 0-100% infectés)
- n = le nombre d'œufs dans chaque dilution

Puisque le volume de l'inoculum était de 0,1 ml, le titre est exprimé comme DIE_{50} par 0,1 ml.

En utilisant les données présentées à la Section 4.4.1:

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés
10^{-1}	+++++	5	
10^{-2}	+++++	5	
10^{-3}	+++++	5	
10^{-4}	+++++	5	
10^{-5}	+++++	5	0
10^{-6}	++++-	4	1
10^{-7}	+++--	3	2
10^{-8}	++---	2	3
10^{-9}	-----	0	5
10^{-10}	-----	0	

- + Infecté.
- Non-infecté.

- Inscrire dans les colonnes 3 et 4 le nombre d'œufs infectés et le nombre d'œufs non infectés pour la gamme de dilution 0–100% infectés.
- En utilisant la méthode Spearman-Kärber:

$$DIE_{50} = x + \frac{1}{2}d - \frac{d\Sigma r}{n}$$

$$x = 9$$

$$d = 1$$

$$\Sigma r = 5 + 3 + 2 + 1 + 0$$

$$n = 5$$

$$\begin{aligned} \text{Par conséquent: } DIE_{50} &= 9 + \frac{1}{2} \times 1 - \frac{1(5 + 3 + 2 + 1 + 0)}{5} \\ &= 9 + 0,5 - \frac{11}{5} \\ &= 9,5 - 2,2 \\ &= 7,3 \end{aligned}$$

Donc, le titre de la suspension du virus = $10^{7,3} DIE_{50}$ par 0,1 ml

B. Si le nombre d'œufs n'est pas constant à chaque dilution, par exemple si il y a eu des mortalités non-spécifiques d'embryons, les calculs deviennent plus complexes (Allan et al. 1978). Le DIE_{50} est calculé en suivant cette formule:

$$DIE_{50} = x + \frac{1}{2}d - d\Sigma p$$

dans laquelle

x = la plus haute dilution à laquelle tous les œufs étaient non infectés (exprimé comme valeur inverse, ou valeur positive)

d = le facteur de dilution (si des dilutions au 1/10ème ont été utilisées, le facteur de dilution est de 1)

Σp = la somme des proportions d'œufs non infectés (dans une dilution allant de 0–100% infectés)

En utilisant les données présentées à la Section 4.4.2, Exercice 5:

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Proportion d'œufs non-infectés
10^{-1}	+++++	5	0	
10^{-2}	++++0	4	0	
10^{-3}	+++00	3	0	0
10^{-4}	++++-	4	1	$1/5 = 0,2$
10^{-5}	+++00	3	0	0
10^{-6}	++--0	2	2	$2/4 = 0,5$
10^{-7}	++--0	2	2	$2/4 = 0,5$
10^{-8}	+----	1	4	$4/5 = 0,8$
10^{-9}	-----	0	5	1
10^{-10}	-----	0	5	

1. Incrire dans les colonnes 3 et 4 le nombre d'œufs infectés et le nombre d'œufs non infectés pour la gamme de dilution 0–100% infectés
2. Calculer la proportion d'œufs non-infectés (colonne 5).
3. En se servant de la méthode Spearman-Kärber:

$$DIE_{50} = x + \frac{1}{2}d - d\Sigma p$$

$$x = 9$$

$$d = 1$$

$$Sp = (1 + 0,8 + 0,5 + 0,5 + 0 + 0,2 + 0) = 3$$

$$DIE_{50} = 9 + \frac{1}{2} - 1 \times 3$$

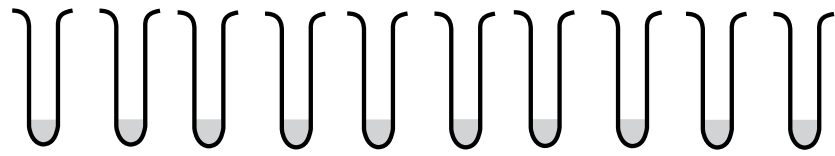
$$= 9 + 0,5 - 3$$

$$= 6,5 \text{ par } 0,1 \text{ ml de suspension de virus}$$

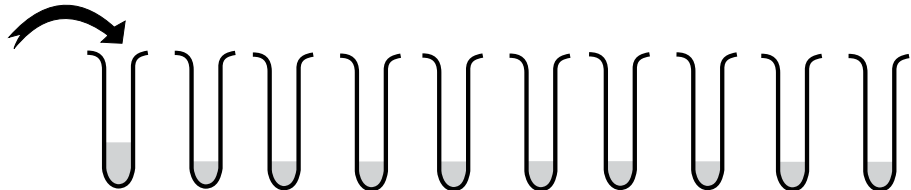
Donc, le titre de la suspension du virus = $10^{6,5} DIE_{50}$ par 0,1 ml

Annexe 8
Préparation des dilutions en série

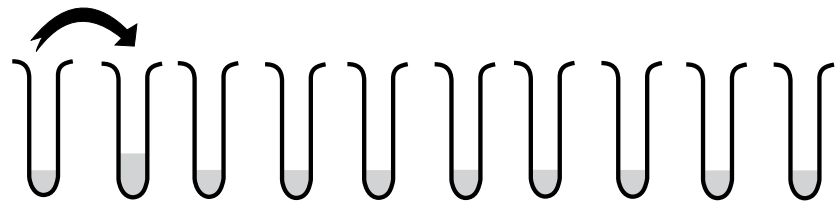
Dilution en série de deux en deux



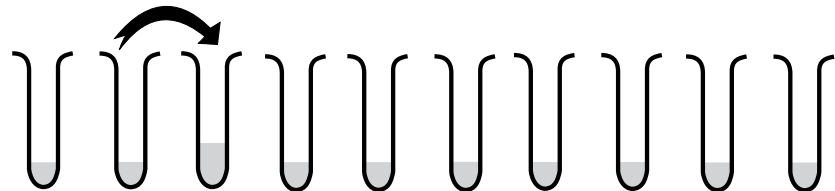
1. Ajouter 1 mL de PBS dans chaque tube.



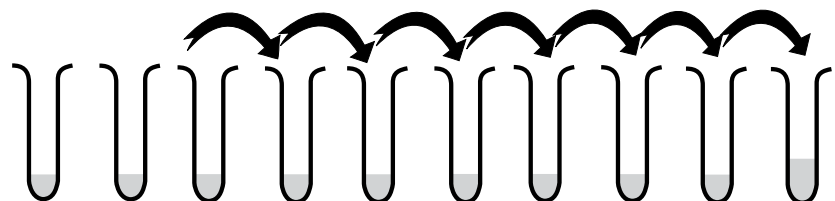
2. Ajouter 1 mL de suspension du virus dans le premier tube. Bien mélanger.



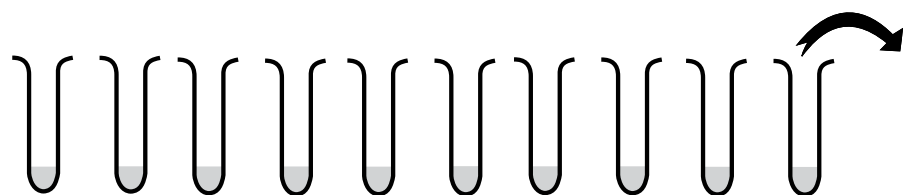
3. Transférer 1 mL du premier tube dans le second tube. Bien mélanger.



4. Transférer 1 mL du second tube dans le troisième tube. Bien mélanger.



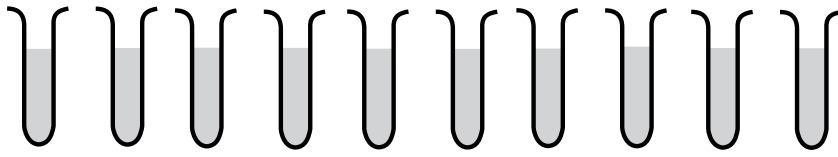
5. Continuer jusqu'à ce que tous les tubes contiennent la suspension du virus.



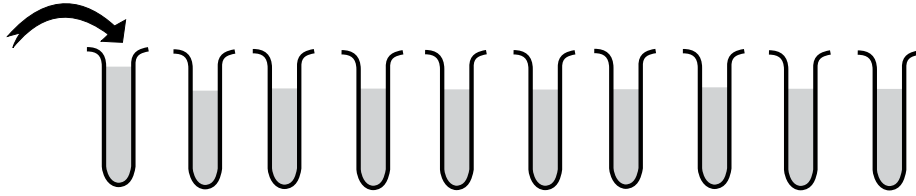
6. Jeter 1 mL du dernier tube.

Figure 20: *Dilution en série de deux en deux*

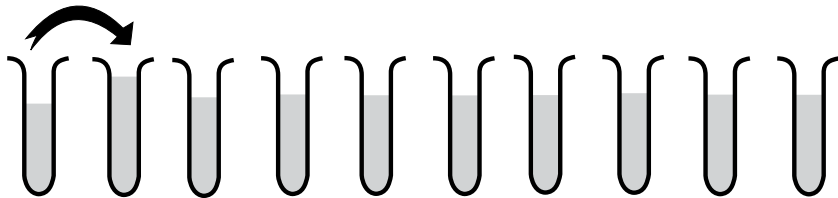
Dilutions en série de dix en dix



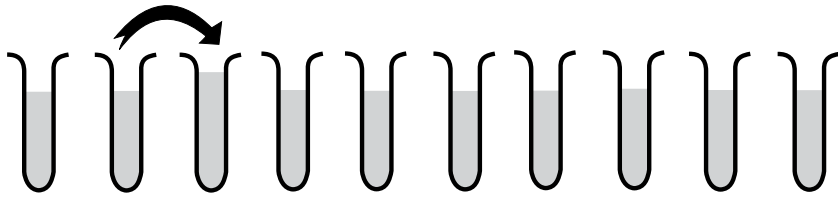
1. Ajouter 9mL de PBS dans chaque tube.



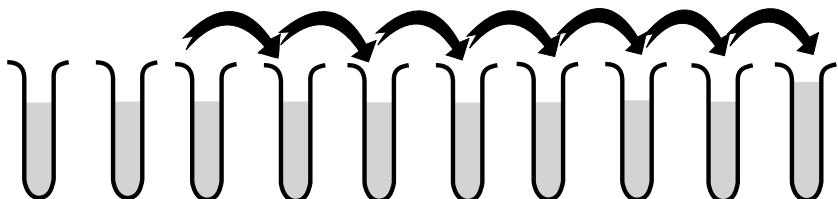
2. Ajouter 1 mL de la suspension du virus au premier tube. Bien mélanger.



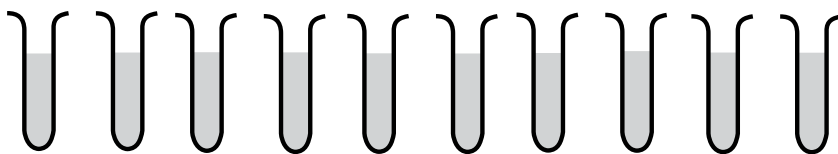
3. Transférer 1 mL du premier tube dans le second tube. Bien mélanger.



4. Transférer 1 mL du second tube dans le troisième tube. Bien mélanger.



5. Continuer jusqu'à ce que tous les tubes contiennent la suspension du virus.



6. Jeter 1 mL du dernier tube.

Figure 21: Dilutions en série au 1/10ème.

Annexe 9

Instructions élémentaires pour l'administration du vaccin vivant, thermotolérant, contre la maladie de Newcastle

A. Vaccin lyophilisé

Par instillation oculaire

- Le vaccin protège seulement contre la maladie de Newcastle (éventuellement utiliser le nom local pour la MN).
- Ne pas vacciner les poulets malades.
- Les poulets peuvent être consommés immédiatement après la vaccination.
- Le vaccin ne nuira pas aux poulets, et n'affectera ni la croissance ni la ponte.
- Le vaccin ne causera pas de problèmes chez les personnes s'il est renversé sur la peau.
- Il faut **7 à 14 jours** après la vaccination pour qu'un poulet développe une protection adéquate contre la maladie de Newcastle.
- Les poulets devraient être revaccinés **tous les 4 mois^a** car leur niveau de protection commencera à diminuer après cette période.
- La dose (une goutte oculaire) est **la même pour les poulets de tous les âges** (à partir d'un jour jusqu'à l'âge adulte) et pour les mâles et les femelles.
- Si la première goutte n'a pas entièrement pénétré l'œil, mettre une deuxième goutte.
- Utiliser le compte-gouttes fourni par^b et confirmer le volume de diluant ou d'eau potable nécessaire pour diluer le vaccin le jour avant la vaccination. Un guide pour déterminer le volume est donné au dos de cette feuille^c.

Préparation de l'eau pour diluer le vaccin

Si le diluant^b n'est pas disponible:

- Faire bouillir de l'eau potable locale et laisser refroidir dans un récipient couvert
- Ne pas utiliser de récipients métalliques pour stocker l'eau bouillie
- Ne pas utiliser l'eau du robinet traitée parce que le chlore détruira le vaccin (si pas d'autre eau disponible, laisser l'eau du robinet reposer toute la nuit pour permettre au chlore de se dissiper).

Stockage et conservation du vaccin

- Ce vaccin est thermotolérant mais il faut quand même le traiter avec soin!
- NE PAS CONGELER.
- Dans le réfrigérateur à 4°C, il durera jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'il n'est pas dilué.
- En dehors du réfrigérateur s'il est stocké dans un endroit frais et sombre, il durera pendant^d s'il n'est pas dilué.
- Le transporter sur le terrain à l'aide d'une glacière et d'un bloc réfrigérant si possible ou envelopper le flacon dans un chiffon humide et le transporter dans un panier couvert et ajouré (pour le garder au frais et à l'abri du soleil).

^a Changer selon l'intervalle approprié aux recommandations locales.

^b Insérer le nom du fabricant de vaccins.

^c Voir l'Annexe 10.

^d Insérer l'intervalle déterminé pendant le test de stabilité du vaccin.

Après la dilution du vaccin, l'utiliser dans un délai de deux jours selon le guide ci-dessous:

- Jour 1 ⇒ 1 goutte oculaire par poulet (à savoir le premier jour de la campagne de vaccination)
- Jour 2 ⇒ 2 gouttes oculaires par poulet
- Jour 3 ⇒ jeter.

Pour des informations supplémentaires, contacter:^e

Mélanger à du riz blanc cuit*

Dans certains endroits, il peut être très difficile d'attraper les poulets pour les vacciner et les vaccinateurs peuvent administrer le vaccin dans des aliments. L'utilisation de supports alimentaires pour administrer le vaccin I-2 de la MN n'est pas aussi efficace que la vaccination par instillation oculaire.

- Le vaccin protège **seulement** contre la maladie de Newcastle (utiliser le nom local pour la MN, s'il y a lieu).
- **Ne pas vacciner les poulets malades.**
- Les poulets peuvent être consommés immédiatement après la vaccination.
- Le vaccin ne nuira pas aux poulets, et n'affectera pas la croissance ni la ponte.
- Le vaccin ne causera pas de problèmes chez les personnes s'il est renversé sur la peau.
- La dose est **la même pour les poulets de tous les âges** (à partir d'un jour jusqu'à l'âge adulte) et pour les mâles et les femelles.
- Une dose est diluée dans 1 ml d'eau propre, non chlorée et mélangée avec du riz blanc cuit et refroidi, immédiatement avant l'administration. Donner 20 g de riz cuit (7–10 g de riz cru qui est ensuite cuit) par oiseau. Une vaccination de rappel est indispensable au bout de 2 semaines.
- Il vaut mieux administrer cette dose le matin lorsque les poulets ont faim et sont plus susceptibles de manger une dose complète.
- Cela prend **7 à 14 jours** après la vaccination pour qu'un poulet développe une protection adéquate contre la maladie de Newcastle après la vaccination de rappel.
- Les poulets devraient être revaccinés **tous les 2 mois**^f car leur niveau de protection commencera à diminuer après cette période.

Préparation de l'eau pour diluer le vaccin

- Faire bouillir de l'eau potable locale et laisser refroidir dans un récipient couvert
- Ne pas utiliser de récipients métalliques pour stocker de l'eau bouillie
- Ne pas utiliser l'eau du robinet traitée parce que le chlore détruira le vaccin (si pas d'autre eau disponible, laisser l'eau du robinet reposer toute la nuit pour permettre au chlore de se dissiper).

Stockage et conservation du vaccin

- Ce vaccin est thermotolérant mais il faut quand même le traiter avec soin!
- NE PAS CONGELER.
- Dans le réfrigérateur à 4°C, il durera jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'il n'est pas dilué.

^e Insérer le nom du fabricant de vaccins.

^f Changer selon l'intervalle approprié aux recommandations locales.

- En dehors du réfrigérateur s’il est stocké dans un endroit frais et sombre, il durera pendant^g s’il n’est pas dilué.
- Le transporter sur le terrain à l’aide d’une glacière et d’un pack de glace si possible ou envelopper le flacon dans un chiffon humide et le transporter dans un panier couvert et ajouré (pour le garder au frais et à l’abri du soleil).

Pour des informations supplémentaires, contacter:^h

*Si les vaccinateurs souhaitent utiliser un support alimentaire différent, seuls les supports testés et recommandés par le fabricant ou par un distributeur du vaccin doivent être utilisés. Le fabricant ou le distributeur du vaccin doit vérifier si les aliments et les céréales préparés de différentes façons ont une activité virucide (Rehmani 1995). Afin d’assurer une réponse immunitaire adéquate à la vaccination, il est essentiel que les poulets consomment la dose entière de vaccin et que les vaccinations de rappel soient données. Divers supports, y compris le riz blanc bouilli, le riz blanc huilé, le riz paddy et des dérivés de maïs ont été utilisés.

B. Vaccin liquide

- Le vaccin protège **seulement** contre la maladie de Newcastle (éventuellement utiliser le nom local pour la MN).
- **Ne pas vacciner les poulets malades.**
- Les poulets peuvent être consommés immédiatement après la vaccination.
- Le vaccin ne nuira pas aux poulets, et n’affectera ni la croissance ni la ponte.
- Le vaccin ne causera pas de problèmes chez les personnes s’il est renversé sur la peau.
- Il faut **7 à 14 jours** après la vaccination pour qu’un poulet développe une protection adéquate contre la maladie de Newcastle.
- Les poulets devraient être revaccinés **tous les 4 mois**ⁱ car leur niveau de protection commencera à diminuer après cette période.
- La dose (une goutte oculaire) est **la même pour les poulets de tous les âges** (à partir d’un jour jusqu’à l’âge adulte) et pour les mâles et les femelles.
- Si la première goutte n’a pas entièrement pénétré l’œil, mettre une deuxième goutte.

Le stockage et la conservation du vaccin

- Ce vaccin est thermotolérant mais il faut quand même le traiter avec soin!
- **NE PAS CONGELER.**
- Dans le réfrigérateur à 4°C, il durera jusqu’à la date de péremption indiquée sur l’étiquette.
- Le transporter sur le terrain à l’aide d’une glacière et d’un pack de glace si possible ou envelopper le flacon dans un chiffon humide et le transporter dans un panier couvert et ajouré (pour le garder au frais et à l’abri du soleil).

Utiliser dans un délai de deux jours selon le guide ci-dessous:

- Jour 1 ⇒ 1 goutte oculaire par poulet (à savoir le premier jour de la campagne de vaccination)
- Jour 2 ⇒ 2 gouttes oculaires par poulet
- Jour 3 ⇒ jeter.

Pour des informations supplémentaires, contacter:^h

^g Changer selon l’intervalle approprié aux recommandations locales.

^h Insérer le nom du fabricant de vaccins.

ⁱ Insérer l’intervalle approprié aux recommandations locales.

Annexe 10**Comment calculer le volume d'eau nécessaire pour diluer le vaccin lyophilisé**

Si aucun compte-gouttes n'est fourni avec le vaccin lyophilisé, il faudra calculer le volume de diluant à ajouter au vaccin. Pour le faire :

1. Choisir un compte-gouttes.
2. Aspirer de l'eau dans le compte-gouttes.
3. Retirer le piston d'une seringue de 2 ml et tenir la seringue verticalement avec la pointe vers le bas. Boucher l'ouverture avec un doigt ou le pouce.
4. Tenir le compte-gouttes verticalement, presser la poire délicatement pour faire tomber les gouttes dans la seringue.
5. Compter le nombre de gouttes nécessaires pour que le niveau d'eau atteigne la marque de 1 ml sur la seringue (il faudra peut-être recharger le compte-gouttes).
6. Noter le nombre de gouttes nécessaires pour former 1 ml. Répéter encore au moins deux fois.
7. Utiliser la formule ci-dessous pour calculer le volume de diluant nécessaire pour diluer le nombre de doses de vaccin dans le flacon.

$$\text{Volume de diluant (ml)} = \frac{\text{nombre de doses de vaccin par flacon}}{\text{nombre de gouttes dans 1ml}}$$

Exemple

Il faut 50 gouttes avec un compte-gouttes pour faire 1 ml. Combien de diluant faudrait-il rajouter à un flacon contenant 250 doses de vaccin de la MN?

$$\begin{aligned} \text{Volume de diluant (ml)} &= \frac{250 \text{ doses par flacon}}{50 \text{ gouttes par ml}} \\ &= 5 \text{ ml} \end{aligned}$$

Annexe 11 Solutions des exercices

3.7.2

1. (a) Titre par dose du vaccin liquide:

$$1 \text{ ml} = 0,1 \text{ ml} \times 10$$

$$\begin{aligned} \text{Titre du vaccin par ml} &= 10^9 \text{ DIE}_{50} \times 10 \\ &= 10^9 \text{ DIE}_{50} \times 10^1 \\ &= 10^{9+1} \\ &= 10^{10} \text{ DIE}_{50} \text{ par ml} \end{aligned}$$

Le volume d'une dose est de 30 μL . Par conséquent:

$$\text{Titre du vaccin liquide par dose} = \frac{10^{10} \text{ DIE}_{50} \times 30 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}}$$

$$1 \text{ ml} = 1000 \mu\text{L}$$

$$\begin{aligned} \text{Titre du vaccin liquide par dose} &= \frac{10^{10} \text{ DIE}_{50} / \text{mL} \times 30 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \\ &= 10^{10} \text{ DIE}_{50} \times 0.030 \\ &= 10^{10} \times 10^{-1,5} \\ &= 10^{10+(-1,5)} \\ &= 10^{8,5} \text{ DIE}_{50} \end{aligned}$$

Titre après le stockage						
	Jour 0	2 semaines	4 semaines	6 semaines	8 semaines	10 semaines
DIE ₅₀ par ml	9	7,8	6,8	6,8	6,5	5,8
DIE ₅₀ par dose	8,5	7,3	6,3	6,3	6,0	5,3

(b) La dose minimale de vaccin à utiliser sur le terrain est de 10^6 DIE_{50} par dose. Ce vaccin peut servir pendant 8 semaines maximum s'il est conservé à des températures de moins de 22°C.

$$\begin{aligned} \text{(c) Volume du vaccin I-2 de la MN} &= 25\,000 \text{ doses} \times 30 \mu\text{L} \\ &= 25\,000 \text{ doses} \times 0,030 \text{ ml} \\ &= 750 \text{ ml} \end{aligned}$$

Le vaccin est préparé en mélangeant 1 volume de fluide allantoïdien avec 1 volume de gélatine à 1% dans de la PBS.

$$\begin{aligned} \text{Volume de fluide allantoïdien dans} &= 0,5 \times 750 \\ \text{750 ml de vaccin liquide I-2 de la MN} &= 375 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Nombre d'œufs nécessaires} &= \frac{375 \text{ ml fluide allantoïdien}}{5 \text{ ml par œuf}} \\ &= 75 \text{ œufs} \end{aligned}$$

Il faut inoculer au moins 75 œufs fertiles pour produire 25 000 doses de vaccin. Dans la pratique, toujours incuber et inoculer plus d'œufs pour compenser les mortalités embryonnaires non spécifiques et les erreurs d'inoculation.

2. (a) Titre par dose:

Titre après stockage						
	Jour 0	2 semaines	4 semaines	6 semaines	8 semaines	10 semaines
DIE₅₀ par ml	9,8	8,7	8,3	7,5	7,2	6,2
DIE₅₀ par dose	8,4	7,3	6,9	6,1	5,8	4,8

- (b) La dose minimum de vaccin à utiliser sur le terrain est de 10⁶ DIE₅₀ par dose. Ce vaccin peut servir pendant 6 semaines maximum s'il est conservé à des températures de moins de 22°C.
- (c) Un minimum de 320 œufs fertiles doivent être inoculés pour produire 80 000 doses de vaccin. Dans la pratique, toujours incuber et ensemercer plus d'œufs pour compenser les mortalités embryonnaires non spécifiques et les erreurs d'inoculation.

4.4.2

1. 10^{7.7} DIE₅₀/0,1 ml, 10^{8.7} DIE₅₀/1 ml ou 10^{7.2} DIE₅₀/dose. Le titre de ce vaccin est supérieur au titre minimum de production.
2. 10^{8.3} DIE₅₀/0,1 ml ou 10^{9.3} DIE₅₀/1 ml ou 10^{7.8} DIE₅₀/dose. Le titre de ce vaccin est supérieur au titre minimum de production.
3. 10^{7.5} DIE₅₀/0,1 ml ou 10^{8.5} DIE₅₀/1 ml ou 10^{7.0} DIE₅₀/dose. Le titre de ce vaccin est supérieur au titre minimum de production.
4. 10^{6.4} DIE₅₀/0,1 ml ou 10^{7.4} DIE₅₀/1 ml ou 10^{5.9} DIE₅₀/dose. Le titre de ce vaccin est trop faible et ne répond pas aux normes pour le titre minimum de production et le vaccin doit être rejeté.
5. 10^{6.5} DIE₅₀/0,1 ml ou 10^{7.5} DIE₅₀/1 ml ou 10^{6.0} DIE₅₀/dose. Le titre de ce vaccin est trop faible et ne répond pas aux normes pour le titre minimum de production et le vaccin doit être rejeté.

L'Erreur Standard (ES) des titres d'infectivité calculés de cette manière peut être élevée car les titres sont mesurés à partir de dilutions au 1/10^{ème} et en utilisant seulement cinq échantillons par dilution. Toutefois, d'un point de vue pratique, il y a peu d'intérêt à utiliser de plus petits facteurs de dilution ou à augmenter le nombre d'échantillons pour réduire l'ES.

4.8.3

1. Les contrôles positifs et négatifs de la dernière plaque (rangées E et F, G et H) montrent les titres IH attendus (2^5 et 0). Par conséquent, la dilution de l'antigène du virus MN était correcte et le test IH fonctionne bien.

Il n'y a pas d'agglutination dans les puits de la colonne 12 de toutes les plaques. Par conséquent, tous les sérums qui ont été testés n'ont pas d'agglutinine naturelle. Les agglutinines naturelles peuvent interférer avec la lecture d'IH si le titre IH du sérum est faible. Si l'un des puits dans la colonne 12 montre une agglutination, le sérum doit être adsorbé pour éliminer l'agglutinine naturelle (voir la Section 4.8.6), puis être retesté.

2. et 3.

No. de Sérum	
1	Le titre IH est de 2 (2^1). Le titre n'est pas considéré suffisant pour avoir un effet protecteur.
2	Le titre IH est de 64 (2^6). Le titre est considéré suffisant pour avoir un effet protecteur.
3	Les titres IH sont de 32 (2^5) et de 2 (2^1). Les duplicatas des échantillons sont trop différents. Il faut répéter le test.
4	Le titre IH est de 4 (2^2). Le titre n'est pas suffisant pour avoir un effet protecteur.
5	Le titre IH est de 8 (2^3). Le titre est suffisant pour avoir un effet protecteur.
6	Le titre IH est de 0 (2^0). Le titre n'est pas suffisant pour avoir un effet protecteur.
7	Le titre IH est de 128 (2^7). Le titre est suffisant pour avoir un effet protecteur.
8	Le titre IH est $>2^{11}$. Le titre est exceptionnellement élevé.
9	Les titres IH sont de 64 (2^6) et de 32 (2^5). Les échantillons en duplicatas divergent beaucoup cependant, puisque les deux résultats sont $>2^3$, le titre doit être considéré comme ayant un effet protecteur.
10	Les titres IH sont de 2 (2^1) et de 4 (2^2). Le titre n'est pas suffisant pour avoir un effet protecteur.
11	Le titre IH est de 1024 (2^{10}). Le titre est considéré suffisant pour avoir un effet protecteur.
12	Le titre IH est de 16 (2^4). Le titre est considéré suffisant pour avoir un effet protecteur.
13	Les titres IH sont de 0 et de 2 (2^1). Les échantillons en duplicatas sont incompatibles mais comme les deux résultats sont $<2^3$, le titre n'est pas suffisant pour avoir un effet protecteur.
14	Les titres IH sont de 8 (2^3) et de 4 (2^2). Les échantillons en duplicatas sont incompatibles. Cependant, les deux résultats sont $<2^3$, donc le titre n'est pas suffisant pour avoir un effet protecteur.

4. Si le poulet vient d'un élevage vacciné, il se peut qu'il n'ait pas reçu suffisamment de vaccin, que le vaccin n'ait pas été efficace, que l'échantillon de sang ait été pris trop tôt après la vaccination ou que le poulet n'ait pas développé une réponse immunitaire adéquate (peut-être dû au parasitisme ou à la malnutrition). Quelques-unes des raisons expliquant l'échec du vaccin sont abordées dans l'Annexe 8 de *Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual* (Alders et Spradbrow 2001).

5. La discordance peut être causée par des différences de volumes entre les deux échantillons – trop de sérum pris dans le premier prélèvement, ou trop peu de sérum dans le deuxième. La cause pourrait être un pipetman défectueux, un pipetman bloqué ou une erreur d'opérateur. Par conséquent, s'il reste encore du sérum ou si du sérum peut être à nouveau obtenu, répéter le test. Si le test ne peut pas être répété et qu'une décision doit être prise, le poulet peut probablement être considéré comme ayant des anticorps protecteurs.
6. La lecture pour l'échantillon 8 doit être estimée correcte, car tous les contrôles ont marché. Ce titre élevé suggère que le poulet avait été exposé à une souche sauvage virulente du virus de la MN ou qu'il avait été vacciné avec le vaccin mésogène inactivé ou vivant contre la MN. Il faut faire une dilution supplémentaire afin de déterminer le titre de l'échantillon.
7. Sérum No. 9: Les résultats des échantillons en double sont discordants. Cela pourrait être causé par une erreur de pipetage. Répéter le test. Si cela n'est pas possible, une décision peut être prise. Les 2 titres sont de 2^5 et 2^6 respectivement donc il est fort probable que le poulet a des anticorps protecteurs.
Sérum No. 10: Répéter le test si possible ou bien s'il ne reste pas suffisamment de sérum, une décision peut être prise. Puisque les deux résultats sont $<2^3$, le titre n'est pas suffisant pour être considéré protecteur.
Sérum No. 13: Répéter le test si possible ou bien s'il ne reste pas suffisamment de sérum, une décision peut être prise. Puisque les deux résultats sont $<2^3$, le titre n'est pas suffisant pour être considéré protecteur.

4.9.3

1. A partir de la Section 4.9.2
Elevage de 50 oiseaux – 30 oiseaux doivent être échantillonnés
Elevage de 100 oiseaux – 40 oiseaux doivent être échantillonnés
Elevage de 200 oiseaux – 50 oiseaux doivent être échantillonnés.
2. Si possible, recueillir 20 échantillons de sérum provenant d'oiseaux vaccinés et 20 autres échantillons de sérum provenant d'oiseaux non vaccinés dans le même village. Effectuer des tests d'IH sur les sérums et comparer ensuite les résultats en utilisant le test de 't' non apparié pour déterminer si la différence entre les titres est significative. S'il n'y a que des oiseaux vaccinés disponibles pour l'échantillonnage, suivre le protocole donné à la Section 4.9.2.
3. Les enquêtes sérologiques à point unique sont difficiles à interpréter, en particulier quand la MN est concernée. Si possible, il est toujours utile de prendre des échantillons de sérum appariés pour voir si les titres de la MN changent, indiquant un processus de maladie active. De plus, lorsque des souches virulentes de la MN provoquent des foyers dans un village, les oiseaux les plus sensibles mourront. Les oiseaux qui sont encore vivants dans un village après l'apparition du foyer auront soit:
 - des titres d'anticorps extrêmement élevés indiquant qu'ils avaient déjà une certaine immunité contre la MN et qu'ils ont pu développer une réponse immunitaire efficace, ou
 - de faibles titres d'anticorps, indiquant qu'ils n'ont pas été en contact avec le virus de la MN.

N.B. En général il est possible de différencier entre les oiseaux vaccinés et les oiseaux qui ont été en contact avec des souches virulentes de terrain de la MN. Les oiseaux vaccinés auront des titres de \log_2 3–8, tandis que les oiseaux naturellement infectés ont des titres élevés de \log_2 10–12 ou plus.

5.10

Dilution	Résultats HA	No. d'œufs infectés	No. d'œufs non-infectés	Total cumulé d'œufs infectés	Total cumulé d'œufs non-infectés	Rapport et % cumulé d'œufs infectés	
10 ⁻¹	+++++	5	0				
10 ⁻²	+++++	5	0				
10 ⁻³	+++++	5	0				
10 ⁻⁴	+++++	5	0				
10 ⁻⁵	+++++	5	0				
10 ⁻⁶	+++++	5	0				
10 ⁻⁷	+++++	5	0	12	0	12/12	100%
10 ⁻⁸	++++-	4	1	7	1	7/8	87%
10 ⁻⁹	+++--	3	2	3	3	3/6	50%
10 ⁻¹⁰	-----	0	5	0	8	0/8	0%

Titre du vaccin = 10⁹ DIE₅₀/ml.

La dose recommandée est de 10⁶ DIE₅₀ par oiseau. Par conséquent, pour que le vaccin soit efficace, il doit contenir au moins 10⁶ DIE₅₀ par goutte – à savoir, 10⁶ DIE₅₀ par 40 µL.

1 ml divisé par 40 µL = 25

Donc, 25 gouttes font 1 ml.

$$\begin{aligned}
 25 \text{ gouttes /ml} \times 10^6 \text{ DIE}_{50}/\text{goutte} &= 25 \times 10^6 \text{ DIE}_{50}/\text{ml} \\
 &= 2,5 \times 10^7 \text{ DIE}_{50}/\text{ml} \\
 &= 10^{0,4} \times 10^7 \text{ DIE}_{50}/\text{ml} \\
 &= 10^7 \text{ DIE}_{50}/\text{ml}
 \end{aligned}$$

Puisque le titre du vaccin est supérieur au titre minimal recommandé sur le terrain, il peut être utilisé.

Annexe 12

La maladie de Newcastle en Australie

La MN sous forme vélogénique a été décrite en Australie pour la première fois en 1930 et en 1932. Les foyers étaient confinés à une banlieue de Melbourne, Victoria, et à deux reprises, la maladie fut éradiquée avec succès par l'abattage (Johnstone 1933; Albiston et Gorrie 1942).

En 1966, une souche avirulente du virus de la MN fut identifiée en Australie. Elle fut isolée du proventricule d'un poulet de chair qui avait une déficience nutritionnelle et une infection concomitante avec *Staphylococcus* (Simmons 1967). Des études ultérieures ont montré que le virus MN était répandu dans toute l'Australie, et qu'il était apathogène pour les poulets (Westbury 1981). La souche prototype a été nommée V4. Les souches avirulentes du virus de la MN sont désormais endémiques dans les élevages de volailles en Australie et sont également présentes chez un certain nombre d'espèces d'oiseaux sauvages (Westbury 1979; Spradbrow, MacKenzie et Grimes 1995). Dans les années 1990, des souches du virus de la MN ont été isolées à partir de poulets de chair présentant des signes cliniques d'une maladie bénigne, appelée le syndrome respiratoire. Des poulets SPF infectés par ces souches ne présentaient aucun signe clinique ni lésion macroscopique, mais l'histologie a montré des signes de légère trachéite (Hooper et al. 1999).

Un certain nombre de foyers de la maladie de Newcastle sont apparus en Australie entre Septembre 1998 et Octobre 2002. Dans la plupart des cas, ils ne touchaient qu'un petit nombre de fermes et les animaux ne montraient ni des taux de morbidité et de mortalité élevés ni les signes distinctifs cliniques caractéristiques des foyers de la MN exotiques. Le séquençage génétique des virus responsables dans ces foyers ont montré qu'ils étaient originaires d'un virus avirulent de la MN d'origine australienne, distinct génétiquement d'autres virus australiens (V4 ou similaire à V4), et des virus de la MN identifiés à l'étranger. Les épidémies ont été éradiquées avec succès en utilisant des procédés prescrits dans la stratégie australienne AUSVETPLAN pour le contrôle et l'éradication de la MN. Une vaccination utilisant le V4 vivant et un vaccin inactivé a été introduite pour réduire les risques que des précurseurs du virus de la MN en circulation ne mutent sous formes virulentes (Animal Health Australia 2010).

En Janvier 2001, une enquête nationale a été menée pour recueillir des informations sur le type et la distribution du virus de la MN dans les élevages de volailles australiens. L'enquête n'a pas détecté de virus de la MN virulent, ni aucun virus de la MN semblable aux virus impliqués dans les foyers en New South Wales. Tous les virus détectés étaient des virus de la MN V4 ou similaires à V4, génétiquement éloignés des virus de la MN virulents (Kite, Boyle, Pritchard, Garner et East 2007).

Le plan en vigueur: *National Newcastle Disease Management Plan 2008–2012* énonce un programme basé sur le niveau de risque pour la maladie virulente de Newcastle en Australie. Dans les états à faible risque, une vaccination réduite est autorisée, mais une surveillance continue doit être menée afin d'évaluer l'épidémiologie du virus de la MN.

Des changements dynamiques dans les populations de virus de la MN avaient déjà été décrits avant l'apparition des foyers de la MN en Australie. En 1990, la MN fut diagnostiquée dans deux élevages de poules en Irlande (Alexander et al. 1992). Les virus virulents isolés à partir de ces foyers étaient très proches de souches de faible virulence tant d'un point de vue antigénique que génétiquement. Les souches de faible virulence sont habituellement isolées à partir d'oiseaux aquatiques sauvages, mais on sait qu'elles ont infecté des poulets en Irlande en 1987 (McNulty et al. 1988). Tant d'un point de vue antigénique que génétique, ce groupe de virus est éloigné de tous les autres virus de la MN et il a été suggéré que les virus virulents étaient dérivés de ceux de faible virulence.

On ne sait pas comment de tels changements se produisent dans les populations de virus. Cependant, il est connu que le matériel génétique (génome) de tous les organismes, y compris celui des virus, peut subir des changements par mutations. Les génomes d'acide ribonucléique semblent plus sensibles à ces mutations (car le génome lui-même est répliqué) que les génomes d'acide désoxyribonucléique dans d'autres virus ou organismes (Spradbrow 1992). Lors de la réplication, il est possible que des mutations se produisent. Elles resteront inaperçues dans la population virale jusqu'à ce que des pressions de sélection telles que des changements dans l'environnement (par exemple, l'intensification des industries avicoles) ou des caractéristiques de l'hôte (races «améliorées», maladies concomitantes ou statut immunitaire affaibli) favorisent un changement dans le type de virus prédominant dans la population (Westbury 2001).

Annexe 13

Sources d'informations supplémentaires

Dr Joanne Meers

Professeur Agrégé de Virologie Vétérinaire
School of Veterinary Science
The University of Queensland
Gatton QLD 4343
Australie
Tél: +61 7 5460 1839
Fax: +61 7 5460 1922
Email: j.meers@uq.edu.au

International Rural Poultry Centre, KYEEMA Foundation

GPO Box 3023
Brisbane QLD 4001
Australie
Tél: +61 7 3025 8500
Fax: +61 7 3025 8555
Email: ruralpoultry@kyeemafoundation.org
Site Internet: <http://www.kyeemafoundation.org>

Animal Health Coordinator, The Australian Centre for International Agricultural Research

GPO Box 1571
Canberra ACT 2601
Australie
Tél: +61 2 6217 0500
Fax: +61 2 6217 0501
Email: aciar@aciar.gov.au
Site Internet: www.aciar.gov.au

Des informations supplémentaires sont disponibles sur les sites suivants:

- **International Rural Poultry Centre:**
<http://www.kyeemafoundation.org/content/irpc.php>
- **Australian Centre for International Agricultural Research:**
<http://www.aciar.gov.au>
- **World Organisation for Animal Health:**
<http://www.oie.int>
- **International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products:** <http://www.vichsec.org>



ACIAR

Research that works for developing
countries and Australia

aciar.gov.au