

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 499 411

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 02464

(54) Vaccin viral vivant cultivé contre l'echyma contagieux des races ovines et son procédé de préparation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 39/275.

(22) Date de dépôt..... 9 février 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 32 du 13-8-1982.

(71) Déposant : INSTITUT BIOKHMII I FIZIOLOGII AKADEMII NAUK KIRGIZSKOI SSR, résidant en URSS.

(72) Invention de : T. T. Khanduev, E. D. Imanov, B. N. Gusev, T. S. Sultanov, E. V. Makarova, B. Salidinov et N. B. Chormonova.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, pl. d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

La présente invention concerne le domaine de la médecine vétérinaire et, plus précisément, un vaccin viral vivant cultivé contre l'ecthyma contagieux des races ovines et son procédé de préparation.

- 5 L'ecthyma contagieux (stomatite pustuleuse contagieuse, dermatite pustuleuse, la fausse variole, etc) est une maladie infectieuse d'étiologie virale à évolution aiguë. Dans les conditions naturelles, les moutons, les chèvres et rarement les hommes souffrent de l'ecthyma.
- 10 Dans les conditions expérimentales, on arrive à infecter les lapins et les chiots.

La maladie se caractérise par une lésion vésiculaire pustuleuse des couches superficielles de la peau avec formation ultérieure d'une croûte épaisse et avec 15 apparition des ulcères et des érosions sur la muqueuse de la cavité orale.

- Dans les fermes défectueuses de façon permanente, les jeunes agneaux sont atteints de l'ecthyma contagieux et souffrent cliniquement de l'ecthyma à l'âge de 4 à 5 20 jours. On observe des rechutes enzootiques annuelles et le pic de la morbidité correspond à la période d'agnelage printanier-hivernal, quand les jeunes animaux sont atteints de l'ecthyma dans certains troupeaux de moutons à 80 - 100 %.

25 On a également enregistré des rechutes de la maladie automnales, dues à la conduite des moutons sur les pâturages d'hiver.

- La maladie est observée dans les pays s'occupant de l'élevage des moutons en Europe, Asie, Afrique, Amérique et Australie.

30 L'ecthyma contagieux porte un énorme préjudice économique aux fermes d'élevage des moutons. Les animaux atteints de l'ecthyma voient leur engrangement et leur poids diminuer, ils sont en retard dans la croissance et 35 dans le développement ; leur productivité de viande et de lainage ainsi que leur valeur de race diminuent.

La vaccino-prophylaxie est le moyen efficace dans

la lutte contre l'ecthyma contagieux des moutons et des chèvres. Dans la pratique vétérinaire, on utilise largement un vaccin viral contre l'ecthyma contagieux préparé à partir des souches épizootiques "des rues" du virus de l'ecthyma contagieux.

Pour la première fois, Aynaud M. a préparé en 1921 et utilisé un vaccin dit "croûteux". Pour préparer un tel vaccin, l'auteur a ramassé les croûtes-escarres sur les endroits affectés de la peau des lèvres des moutons atteints de l'ecthyma contagieux, 15 - 20 jours après le début de la maladie ; il les a séchées au-dessus de l'acide sulfurique concentré dans un exciccateur, broyées très finement dans un mortier, maintenues dans le chloroforme pendant 24 heures, séchées de nouveau à l'air et conservées dans les ampoules jusqu'à l'utilisation. Directement avant l'emploi, la poudre contenant la matière virale est broyée dans le mortier et mise en suspension dans du soluté physiologique renfermant 50 % de glycérine (Aynaud M. Comptes Rendus Acad. Scien., 1921, 173, pp. 950-952 ; Aynaud M., Ann. Inst. Pasteur, 1923, 37, pp. 498-527).

Dans les années ultérieures, plusieurs auteurs dans de divers pays se sont servis de la méthode de préparation du vaccin proposée par Aynaud et l'ont largement utilisée (Altara J., Nuova veterinaria, 1925, 3, pp. 4-9 ; Barrat E. Rev. Med. Vet., 1933, 111, pp. 10-12).

Certains auteurs ont perfectionné et modifié d'une manière insignifiante la préparation du vaccin par la méthode d'Aynaud.

Ainsi, pendant plusieurs dizaines d'années, le vaccin vivant, préparé à partir du virus épizootique était le moyen unique de la prophylaxie spécifique de l'ecthyma contagieux des moutons, particulièrement dans les pays étrangers. Le vaccin vivant contre l'ecthyma contagieux étant préparé à partir du virus épizootique "des rues". Tous les animaux non immuns étaient infectés avec la préparation obtenue, pour provoquer la maladie simultanément chez tous les animaux réceptifs avec forma-

tion chez eux de l'immunité. Au cours de l'utilisation du vaccin vivant préparé à partir du virus épizootique dans les conditions d'emploi, il convenait d'être prudent lors de la vaccination. Les animaux inoculés étaient isolés
 5 des animaux non inoculés pendant 3 semaines, les mesures d'assainissement et de désinfection vétérinaires étaient effectuées régulièrement, étant donné que les croûtes-escarres, se détachant des foyers infectés des animaux vaccinés, présentent le même danger que la maladie naturelle.
 10

Le vaccin vivant des croûtes-escarres, ramassées à partir des endroits infectés de la peau des moutons malades, contient la flore bactérienne et le traitement par les antibiotiques n'assure pas la stérilité de la préparation (Alboiu M. di Simon M., Birnaure C.H., Lucrările științifice ale institutului de seruri ai vaccinuri Pasteur, Bucuresti, 1960, 4, 237).

L'utilisation du vaccin contre l'ecthyma contagieux des moutons préparé à partir de souches hautement virulentes, peu étudiées, accidentnelles du virus épizootique rend ce vaccin dangereux pour un emploi étendu. Le vaccin préparé à partir du virus épizootique est doté d'une haute réactogénie et la réaction post-vaccinale chez les animaux inoculés évolue gravement, comme la maladie naturelle, avec toutes les conséquences.
 20
 25

Le vaccin vivant contre l'ecthyma contagieux des moutons, préparé à partir des souches épizootiques du virus, ne répond pas aux exigences imposées aux préparations antivirales modernes, à cause de sa haute virulence, de l'impureté bactérienne et du danger épizootique, vu que la vaccination des animaux crée de nouveaux foyers d'infection.
 30

L'utilisation du vaccin inactivé par la formaline® tué avec l'hydroxyde d'aluminium ainsi que du vaccin préparé par culture de la souche épizootique du virus de l'ecthyma contagieux dans les embryons de poule n'a pas donné de résultats positifs (Pegreff G., Atti. 5 Congr.

naz. Microbiology, 1936, pp. 358-362 ; Olah P. et al., Acta vet. Hung. 1953, p. 237).

La présente invention se propose de créer un vaccin contre l'ecthyma contagieux des races ovines, qui 5 posséderait une haute immunogénie, l'innocuité et ne contiendrait pas de virus étrangers.

Selon le but indiqué, l'invention vise à mettre au point un procédé de préparation du vaccin en utilisant une souche affaiblie du virus de l'ecthyma contagieux, 10 capable d'être cultivée sur un substrat d'accès facile, caractérisé par une haute immunogénie, l'innocuité et l'absence de virus étrangers.

Suivant l'invention, on propose un vaccin viral vivant cultivé contre l'ecthyma contagieux des races ovines, caractérisé en ce qu'il contient une souche atténuée 15 "L-1" du virus de l'ecthyma contagieux, déposée sous le N 8, obtenue à partir du virus "des rues", isolé dans des endroits affectés de la peau de l'agneau atteint de l'ecthyma contagieux, par adaptation de cette souche à la culture primaire 20 des cellules de la peau du foetus du mouton pendant plusieurs passages.

On propose un vaccin qui se caractérise en ce qu'il contient une souche atténuée "L-1" de l'ecthyma contagieux, déposée sous le numéro 8 et adaptée à la culture primaire 25 des cellules de la peau du foetus du mouton âgé de 3-3,5 mois, à une température de 36 à 37°C pendant 4 - 5 jours.

La souche atténuée indiquée du virus, utilisée pour préparer le vaccin contre l'ecthyma contagieux des races ovines, est désignée ici par convention la souche 30 "L-1" du virus de l'ecthyma contagieux.

La souche susmentionnée est une souche de vaccin nouvellement obtenue et déposée sous le N 8 dans Vsesojuznom Gosudar-stvennom nauchno-controlnom institute vетеринарных препаратов Ministerstva selskogo khozjastva 35 SSSR, le 25 Avril 1980.

Conformément à l'invention, la souche "L-1" du virus de l'ecthyma contagieux, déposée sous le N 8, est

isolée chez l'agneau atteint de l'ecthyma contagieux et adaptée à la culture monocouche primaire de cellules de la peau du foetus du mouton, à une température de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 10-20 passages et possède une activité cytopathique avec un titre atteignant $10^{6,5} \text{ DCT}_{50/\text{ml}}$.

La souche de vaccin "L-1" N° 8 possède les propriétés suivantes :

Caractères morphologiques.

Dans la culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton et de l'épithélium de rein du mouton, le virus forme sous la couche d'agar des colonies négatives circulaires à bords réguliers.

Caractères de culture.

La souche "L-1" se multiplie régulièrement à effet cytopathique dans la culture primaire de cellules de l'épithélium de rein des veaux, des moutons et de la peau du foetus du mouton.

Dans les systèmes de cellules, on enregistre après 5 jours de l'incubation des modifications cytopathiques caractéristiques et les accumulations du virus dans le titre jusqu'à $10^{6,5} \text{ DCT}_{50/\text{ml}}$.

Propriétés virulentes.

L'infection avec la souche "L-1" des agneaux nourrissons par application sur la surface scarifiée de la peau de la lèvre supérieure à une dose de 0,2-0,3 ml provoque la formation de 8 à 15 nodules non douloureux, se conservant pendant 5-6 jours qui, sans passer en papules, se résorbent sans laisser de traces. Les nodules sont généralement observés 3-4 jours après l'application. Les animaux ne réagissent pas à l'introduction de la souche du virus par d'autres voies d'infection. Les lapins et les souris blanches ne sont pas sensibles à la souche "L-1" quelle que soit la voie de l'infection.

Caractères immunologiques.

35 L'immunité spontanée stable se forme dans 12-15 jours et la durée de l'immunité est d'au moins 9 mois.

Propriétés antigènes.

La souche "L-1" possède une affinité immunologique avec diverses souches épizootiques du virus d'origine.

Les animaux inoculés avec le virus-vaccin acquièrent 5 une immunité stable contre les souches épizootiques, isolées dans diverses zones géographiques.

Les propriétés immunogènes susmentionnées de la souche de vaccin "L-1" du virus permettent de l'utiliser pour préparer un vaccin viral inoffensif contre l'ecthyma 10 contagieux des races ovines, des moutons et des chèvres, par multiplication dans la culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton et d'inoculer des agneaux dès le premier jour de la naissance, les animaux inoculés ne sont alors pas soumis à des restrictions quelconques.

15 L'invention vise également un procédé de préparation d'un vaccin vivant cultivé contre l'ecthyma contagieux des races ovines, qui, conformément à l'invention, consiste à cultiver dans la culture de cellules de la peau du foetus du mouton la souche atténueée "L-1" N 8 20 d'un virus de l'ecthyma contagieux obtenu à partir du virus "des rues", isolé dans des endroits affectés de la peau de l'agneau atteint de l'ecthyma contagieux.

Il est recommandé de cultiver la souche indiquée dans la culture de cellules de la peau du foetus du mouton âgé de 3 ou 3,5 mois, à une température de 36 à 37°C 25 dans un milieu d'entretien N 199, contenant 2 % de sérum des gros bovidés.

Suivant l'invention, la première récolte de la matière contenant les virus est effectuée après l'infection 30 de 50 à 70 % de cellules de la culture à l'expiration de 3-4 jours, et la deuxième récolte de la matière contenant les virus est réalisée 24-26 heures après la première récolte.

Le procédé de préparation du vaccin viral vivant 35 cultivé contre l'ecthyma contagieux des races ovines est basé sur le système du virus d'ensemencement, qui prévoit la préparation du virus du vaccin en quantité suffisante,

et répondant à toutes les exigences de la souche atténuée, ainsi que la conservation en état congelé et l'utilisation en cas de nécessité pour préparer le vaccin.

Pour préparer le vaccin contre l'ecthyma contagieux
5 des races ovines, on utilise la souche atténuée "L-1" déposée sous le N 8.

La souche indiquée a été obtenue à partir du virus "des rues" épidémique de l'ecthyma contagieux, isolé dans les endroits affectés de la peau de l'agneau atteint
10 de l'ecthyma contagieux. La souche épidémique du virus est atténuée par des passages réitérés dans la culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton. Après 10 passages consécutifs dans la culture primaire de celles de la peau du foetus du mouton à une température
15 de 36 à 37°C, la souche acquiert une activité cytopathique se manifestant nettement, qui permet de contrôler tout le processus de préparation du vaccin, de réaliser les récoltes du virus dans des délais optimaux, de déterminer la spécificité du virus dans la culture du tissu et de
20 constater le titre d'accumulation.

La souche "L-1" du virus obtenue se caractérise par les indices suivants :

1. Innocuité pour les animaux de laboratoire : souris, lapins et également agneaux ;
- 25 2. Activité cytopathique dans la culture de cellules de la peau du foetus du mouton, de l'épithélium de rein du mouton et des gros bovidés ;
3. Activité immunogène sur les animaux naturellement réceptifs : les moutons et les chèvres ;
- 30 4. Absence de virus - contaminants ;
5. Stérilité bactérienne et absence de mycoplasmes ;
6. Stabilité et haute résistance au stockage ;
7. Absence de contagiosité.

On prépare le virus d'ensemencement à partir de la
35 souche "L-1" du virus ayant tous les indices susmentionnés dans la culture de cellules de la peau du foetus du mouton. Le virus d'ensemencement doit avoir toutes les caractéris-

tiques qualitatives propres à la souche atténueée.

On conserve le virus d'ensemencement à l'état congelé à une température de 10 à 20°C et on l'utilise en cas de nécessité.

5 Pour préparer le vaccin, on utilise une culture trypsinisée des cellules de la peau du foetus du mouton. Pour cela, on extrait dans des conditions stériles le foetus du mouton âgé de 3-3,5 mois à partir de l'utérus, on enlève la peau, on broie et on trypsinise par la méthode généralement admise. On met en suspension les cellules obtenues dans un milieu nutritif. La suspension obtenue à une concentration de 600.000-800.000 cellules/ml est ensemencée dans des matras de culture de 1000 ml de capacité avec 200 ml dans chaque matras et on fait incuber 10 dans un thermostat à une température de $36 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la formation de la monocouche entière. A titre de milieu nutritif, on peut utiliser des milieux généralement employés pour cultiver des cellules et des virus, par exemple, le milieu N 199, contenant 10 % de sérum des gros bovidés, de pH égal à 7,2 - 7,4, ou une solution saline de Hanks équilibrée, avec addition de 0,5 % d'hydrolysat de lactalbumine et 10 % de sérum des races bovines à pH de 7,2 - 7,4.

Après la formation de la monocouche de cellules, 25 à l'absence de la dégénération spontanée, on infecte la culture obtenue du tissu par introduction dans chaque matras de 5,0 ml de virus d'ensemencement. Pour cela, on purge le milieu de culture, on introduit 5,0 ml de matière d'ensemencement contenant les virus, on maintient 30 à la température ambiante ($20-22^{\circ}\text{C}$) pendant une heure et puis on verse dans chaque matras 200 ml de milieu d'entretien, c'est-à-dire le même milieu nutritif mais contenant 2,0 % de sérum des races bovines. On fait incuber la culture de tissu infectée à une température de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ 35 et après l'apparition de l'action cytopathique du virus dans 50 - 70 % de cellules (généralement 3 - 4 jours après l'infection), on réalise la première récolte du

- liquide contenant les virus et on ajoute la même quantité de milieu d'entretien frais et on continue d'incuber encore 24-36 heures pendant lesquelles les cellules dans la culture sont infectées à 100 %. On sort tous les matras 5 avec la culture de tissu infectée du thermostat, on refroidit à la température ambiante pendant 3-5 heures et on congèle à une température de - 10-20°C pendant 20-24 heures, pour un détachement complet des cellules à partir du verre.
- 10 Les matras congelés avec la culture du tissu sont faiblement dégelés et en présence de morceaux de glace sont soigneusement agités et versés dans une bouteille. On réunit les deux récoltes de la matière contenant les virus, on mélange avec soin et on obtient de cette façon 15 une série de vaccins, qu'on verse dans les flacons pour le stockage (vaccin liquide) ou pour la lyophilisation (vaccin sec).
- La préparation desséchée présente une humidité résiduaire jusqu'à 3,0 % et une activité cytopathique de 20 $10^{6,0}-10^{6,5}$ DCT_{50/ml}. La durée de validité de la préparation lyophilisée est de plus d'un an à une température de 1 - 20°C dans un endroit obscur. Avant utilisation, pour diluer le vaccin desséché, on utilise du soluté physiologique, de l'eau du robinet ou la solution de Hanks.
- 25 Le vaccin liquide présente une activité cytopathique de $10^{6,0}-10^{6,5}$ DCT_{50/ml}. La durée de validité du vaccin liquide est d'au moins 4 mois lors du stockage dans les conditions de (-)10-20°C. Avant l'utilisation, on dégèle lentement la préparation vaccinale et on agite légèrement.
- 30 On soumet la préparation vaccinale obtenue au contrôle de stérilité, innocuité, activité immunogène, activité cytopathique, et la préparation sèche au contrôle de l'humidité résiduaire. Après cela, le vaccin peut être 35 utilisé pour l'immunisation prophylactique des agneaux et des chevreaux. Une dose moyenne pour la vaccination des agneaux contient au moins 100.000 DCT_{50/dose cytopa-}

thique. L'augmentation de la teneur en virus jusqu'à 5.000.000 DCT₅₀ ne provoque pas de réactions indésirables chez les animaux. On effectue l'immunisation des agneaux et des chevreaux par application de 0,1-0,3 ml de vaccin 5 sur la peau fraîchement scarifiée de la lèvre supérieure.

Le vaccin proposé a passé un large essai de production dans plusieurs républiques et régions d'élevage du mouton, et il a été avec succès utilisé dans les fermes dans lesquelles on a enregistré l'infection. Dans 10 les fermes avec infection stationnaire, après la vaccination des agneaux, on n'a pas observé de rechutes de l'ecthyma contagieux.

Les résultats obtenus après une large utilisation témoignent de la propriété du vaccin préparé à partir de 15 la souche "L-1" N 8 du virus de l'ecthyma contagieux des moutons, de prévenir les rechutes de la maladie dans les fermes avec infection stationnaire. Le vaccin à partir de la souche "L-1" N 8 est efficace et peut être utilisé pour éliminer le foyer de l'infection.

20 Un grand avantage du substrat cellulaire, utilisé pour la préparation du vaccin contre l'ecthyma contagieux, consiste en ce que la culture primaire des cellules de la peau du foetus du mouton est dépourvue des virus étrangers et n'est pas infectée avec les mycoplasmes.

25 Un autre avantage important de la culture des cellules de la peau du foetus du mouton tient au fait qu'elle possède une haute activité de multiplication et la monocouche se forme 2 - 3 jours après l'ensemencement des cellules.

30 Un autre avantage encore de l'invention est une double récolte de la matière contenant les virus dans la culture infectée, ce qui augmente considérablement le rendement en matière vaccinale.

Un avantage essentiel du vaccin proposé contre 35 l'ecthyma contagieux des races ovines est le fait qu'il est absolument inoffensif, stérile et on peut vacciner les agneaux nourrissons dès l'âge d'un jour.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture de la description qui va suivre d'exemples de son exécution, parmi lesquels l'exemple 1 montre la préparation de la souche "L-1" du virus de l'ecthyma contagieux, déposée sous le N 8, l'exemple 2 illustre le procédé de préparation du vaccin vivant cultivé, les exemples 3 - 6 l'utilisation du vaccin pour la vaccination des animaux.

EXAMPLE 1.

- 10 Préparation d'une souche "L-1" atténuee du virus de l'ecthyma contagieux, déposée sous le N 8, à partir du virus épizootique "des rues".

Dans 10 flacons de 50 ml de capacité, contenant une culture monocouche de cellules de la peau du foetus du mouton, on introduit 1,0 ml de suspension de virus stérile du point de vue bactérien dans chaque flacon. Après une heure de contact à la température ambiante, on lave les cultures avec un milieu nutritif trois fois, on introduit dans chaque flacon 10 ml de milieu d'entretien N 199 frais, contenant 2 % de sérum sanguin des races bovines et on fait incuber les cultures à une température de 36,0°C ± 1° jusqu'à la dégénération complète des cellules dans la culture infectée. Généralement, 120 heures après la contagion, on prélève à partir des flacons le liquide contenant les virus qu'on utilise pour infecter une nouvelle portion de culture de cellules de la peau du foetus du mouton.

Pour cela, dans chacun des 10 flacons, contenant la nouvelle culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton, on introduit 1 ml de liquide de culture des virus obtenu et 10 ml de milieu d'entretien, avec addition de 2 % de sérum des races bovines, et on fait incuber les cultures des cellules infectées à une température de 36°C ± 1,0°.

35 Par une méthode d'infection analogue, on réalise 10 passages consécutifs, ce qui suffit pour atténuer et adapter le virus à la culture du tissu. Après le 5° pas-

sage, le virus provoque régulièrement une destruction cytopathique des cellules qu'on observe 3-4 jours après l'infection.

Le virus "L-1" atténué obtenu et adapté à la culture de cellules de la peau du foetus du mouton subit les contrôles suivants de :

- 5 1. Spécificité/identification/ d'après les caractères morphologiques structuraux dans un microscope électronique ;
- 10 2. Innocuité, sur les animaux de laboratoire /souris blanches, lapins et agneaux/ ;
- 15 3. Activité cytopathique dans la culture de cellules de l'épithélium de rein du mouton ou de la peau du foetus du mouton ;
- 15 4. Activité immunogène ;
- 20 5. Stérilité bactérienne et absence de mycoplasmes;
- 20 6. Stabilité et résistance de la préparation au stockage ;
- 20 7. Absence de la contagiosité.

20 EXEMPLE 2.

Préparation du virus d'ensemencement et du vaccin.

a) Préparation du virus d'ensemencement:

On prépare le virus d'ensemencement à partir de la souche "L-1" obtenue suivant l'exemple 1. On utilise alors la peau des foetus de mouton âgés de 3-3,5 mois, fournis par une boucherie après l'abattage des brebis fécondées artificiellement. On trypsinise les morceaux broyés de la peau par la méthode généralement connue et on obtient une suspension de cellules à une concentration de 600.000-800.000 dans 1 ml de milieu nutritif, contenant 10 % de sérum des gros bovidés et des antibiotiques par 100 unités (pénicilline et streptomycine). On verse la suspension de cellules dans des matras de culture de 1 litre de capacité à raison de 200 ml dans chacun et on fait incuber dans des conditions stationnaires, à une température de $36^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}$ jusqu'à la formation de la monocouche complète. 3 à 4 jours après la formation de

la monocouche entière, on élimine le milieu nutritif et on introduit 5,0 ml de virus d'ensemencement, on réalise le contact pendant une heure à la température ambiante et on introduit 200 ml de milieu d'entretien contenant

- 5 2 % de sérum des gros bovidés, et on fait incuber à une température de 36°C ± 1,0°. 4 jours après l'infection, en cas de la lésion à 50 - 70 % de cellules dans la culture, on verse le liquide de culture des virus (première récolte) et on introduit dans les matras 200 ml de milieu
- 10 d'entretien frais dans chaque matras, contenant 2 % de sérum des gros bovidés et on fait incuber dans un thermostat pendant 24-36 heures. 24 à 36 heures après la première récolte du virus, on sort les matras avec la culture infectée du thermostat, on refroidit à la température ambiante et on congèle à une température de (-) 10 à -20°C.
- 15 On décongèle la culture congelée du tissu et en présence de petits morceaux de glace, on secoue les matras pour détacher complètement les cellules du verre et on verse (deuxième récolte). On mélange le liquide contenant les
- 20 virus de la première récolte avec la suspension de culture des virus de la deuxième récolte dans une bouteille commune. Le virus d'ensemencement obtenu de cette façon est soumis au contrôle de spécificité, d'innocuité, d'activité cytopathique, d'immunogénie, de stérilité, d'absence des virus contaminants et de contagiosité. Le virus d'ensemencement, répondant aux exigences indiquées, est conservé à l'état congelé à une température de (-) 10 à -20°C.
- 25 b) Préparation du vaccin.

- 30 On utilise pour cela la peau des foetus de mouton âgés de 3-3,5 mois, fournis par la boucherie. Les morceaux de peau sont trypsinisés par la méthode généralement admise après un broyage soigneux mécanique et on obtient une suspension à une concentration de 600.000 à 800.000
- 35 cellules/ml, dans le milieu nutritif, contenant 10 % de sérum des gros bovidés et par 100 unités de pénicilline et de streptomycine dans un millilitre. On distribue la

suspension de cellules dans les matras de 1 litre de capacité par 200 ml dans chaque matras et on fait incuber dans des conditions stationnaires à une température de $36^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}$ jusqu'à la formation d'une monocouche complète des cellules. Après la formation de la monocouche de cellules, on infecte la culture du tissu par introduction de 5,0 ml de virus d'ensemencement dans chaque matras. Pour cela, on verse le milieu de culture, on introduit 5,0 ml de matière contenant les virus, on met en contact à la température ambiante ($20 - 22^{\circ}\text{C}$) pendant une heure et puis on verse dans chaque matras 200 ml de milieu contenant 2 % de sérum des gros bovidés. On fait incuber la culture de tissu infectée à une température de $36^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}$ et dans le cas d'apparition de l'action cytopathique du virus dans 50 - 70 % de cellules, on réalise la première récolte du liquide contenant les virus et on ajoute de nouveau la même quantité de milieu d'entretien frais et on continue d'incuber encore 24 - 36 heures durant lesquelles les cellules dans la culture infectée sont infectées à 100 %. On sort tous les matras avec la culture infectée du tissu à partir du thermostat, on refroidit à la température ambiante et on congèle ensuite à une température de (-) 10° à -20°C pendant 20-24 heures pour détacher complètement les cellules à partir du verre.

On dégèle lentement la culture congelée dans les matras et en présence des morceaux de glace, on agite bien la suspension contenant les virus et on la coule dans la bouteille commune. On réunit les deux récoltes de la matière contenant les virus, on mélange soigneusement et on compose une série de vaccins qu'on distribue dans les flacons (vaccin liquide).

Le vaccin liquide possède un titre d'activité cytopathique égal à $10^{6,0} - 10^{6,5}$ DCT_{50/ml} et un délai de validité d'au moins 4 mois lors de la conservation à (-)10-20°C. Directement avant l'emploi, le vaccin est lentement dégelé et agité.

La préparation desséchée possède une humidité rési-

duaire jusqu'à 3 % et le titre de l'activité cytopathique de $10^{6,0}$ à $10^{6,5}$ DCT_{50/ml}. Le délai de validité du vaccin lyophilisé est plus d'un an à une température de stockage de (+) 1 à + 20°C dans un endroit obscur. Avant l'emploi,

- 5 le vaccin est dilué. Pour diluer la préparation desséchée, on utilise le soluté physiologique ou de l'eau de robinet ou la solution de Hanks.

La série de vaccin obtenue subit un contrôle de stérilité, d'innocuité, d'immunogénie, d'activité cytopathique, et la préparation sèche subit additionnellement le contrôle de l'humidité résiduaire. Après cela, le vaccin peut être utilisé pour la vaccination prophylactique des agneaux et des chevreaux.

Une série de vaccins peut contenir de 150.000 à
15 500.000 doses à inoculer.

EXEMPLE 3.

Essai d'innocuité du vaccin.

Le vaccin naturel liquide ou le vaccin sec dilué avec le soluté physiologique jusqu'à un volume nécessaire 20 a été administré par voie sous-cutanée aux 5 souris blanches à la dose de 0,2 ml et à deux lapins à raison de 1,0 ml. Pour l'essai d'innocuité, des agneaux non immuns âgés de 5-10 jours ont été également pris et le vaccin à raison de 0,3 ml a été appliqué sur la peau de la lèvre supérieure fraîchement scarifiée. Les animaux expérimentaux ont été en observation quotidienne, pendant 15 jours.

Tous les animaux sont cliniquement restés en bonne santé. On n'a pas observé de réactions pathologiques telles que refus de fourrage, augmentation de la température du corps, dépression, indigestion. Chez les agneaux inoculés, à l'endroit d'application de la préparation, on a enregistré des changements locaux transitoires de la peau caractéristiques de la réaction post-vaccinale.

EXEMPLE 4.

35 Essai d'immunogénie et de durée de l'immunité du vaccin.

a) 50 têtes des agneaux âgés de 1 - 10 jours ont été inoculées avec le vaccin par application de 0,1-0,3 ml

de préparation sur la peau fraîchement scarifiée de la lèvre supérieure. Deux agneaux non immuns du même âge servaient de contrôle. 15 jours après, on a infecté les animaux vaccinés et ceux de contrôle avec le virus virulent épizootique par application de 300 DI (dose infectante sur la peau scarifiée de la lèvre supérieure). Les animaux ont été quotidiennement observés. Les animaux de contrôle (non inoculés) sont tombés malades avec apparition des signes caractéristiques de la lésion de la peau des lèvres et de la muqueuse de la cavité orale. La réaction à l'application du virus épizootique chez les agneaux inoculés s'était manifestée par une apparition de courte durée (pendant 2-3 jours) de petits modules directement à l'endroit d'application et puis, ils ont disparu sans laisser de traces en 5 jours, et les animaux restaient cliniquement en bonne santé.

b) 3, 6, 9, 12 mois après l'inoculation, les agneaux ont été également infectés du virus épizootique. Tous les animaux vaccinés n'étaient pas atteints de l'ecthyma contagieux, sauf les agneaux infectés 12 mois après la vaccination. On a enregistré chez ces derniers les changements locaux de la peau immédiatement à l'endroit de l'application de la préparation, mais le processus pathologique a rapidement et facilement évolué par comparaison avec les animaux non inoculés. Ainsi, l'immunité stable chez les agneaux inoculés dure au moins 9 mois.

EXAMPLE 5.

Essai du vaccin dans les conditions réelles.

Pendant plusieurs années, plus de 32 millions de têtes d'agneaux à l'âge de 1 - 30 jours ont été inoculés directement dans les troupeaux de moutons. Aucun des animaux inoculés n'était malade de l'ecthyma contagieux dans la période de rechute enzootique de la maladie dans le cheptel non inoculé.

35 EXAMPLE 6.

Essai du vaccin dans les fermes où a été enregistré l'ecthyma contagieux.

Dans ces fermes, chaque année pendant plusieurs ans, on a effectué la vaccination des agneaux nouveaux-nés. Aucun cas de l'infection n'a été enregistré dans les troupeaux de moutons vaccinés pendant l'année en cours.

REVENDICATIONS

1. Vaccin viral vivant cultivé contre l'ecthyma contagieux des races ovines, caractérisé en ce qu'il contient une souche "L-1" atténueée du virus de l'ecthyma
- 5 2. Vaccin suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient une souche "L-1" atténueée N 8 adaptée par 10-20 passages à la culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton.
- 10 3. Procédé de préparation d'un vaccin viral vivant cultivé contre l'ecthyma contagieux des races ovines, caractérisé en ce qu'on cultive sur une culture de cellules de la peau du foetus du mouton la souche "L-1" atténueée du virus de l'ecthyma contagieux, déposée sous le N 8 obtenue à partir du virus "des rues", isolé dans les endroits infectés de la peau de l'agneau atteint de l'ecthyma contagieux, adapté par plusieurs passages à la culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton.
- 15 4. Procédé de préparation du vaccin suivant la revendication 3, caractérisé en ce qu'on utilise la souche "L-1" N 8 adaptée par 10-20 passages à la culture primaire de cellules de la peau du foetus du mouton âgé de 3-3,5 mois, à une température de + 36 à + 37°C.
- 20 5. Procédé de préparation du vaccin suivant les revendications 3 ou 4, caractérisé en ce qu'on cultive la souche "L-1" N 8 sur la culture primaire de cellules de la peau du foetus à l'âge de 3 mois du mouton, sur un milieu d'entretien, à la température de + 36°C.
- 25 6. Procédé de préparation du vaccin suivant la revendication 3 à 5, caractérisé en ce qu'à titre de milieu d'entretien, on utilise le milieu N 199 contenant 2 % de sérum des gros bovidés.