

752

**Recommandation
du Comité de Ministres
de l'Union économique Benelux
relative aux exigences minimales pour les principaux
sérum et vaccins vétérinaires qui pourraient constituer
des risques de zoonoses et qui tombent
sous une réglementation prévue pour le contrôle,**

M (67) 18

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article 6 du Traité d'Union et l'article 9 de la Convention transitoire,

Considérant qu'en attendant l'établissement d'une réglementation plus générale sur l'ensemble des produits thérapeutiques et prophylactiques, il est déjà indispensable dès à présent d'exiger pour les sérum et vaccins à usage vétérinaire des normes communes de pureté, d'innocuité et d'efficacité,

Recommande :

Article unique

Les Gouvernements des trois pays du Benelux sont invités à appliquer à partir du 1^{er} janvier 1968 au plus tard, les dispositions du Règlement annexé à la présente Recommandation concernant les exigences minimales pour les principaux sérum et vaccins vétérinaires qui pourraient constituer des risques de zoonoses et qui tombent sous une réglementation prévue pour le contrôle.

Fait à Bruxelles, le 22 septembre 1967.

Le Président du Comité de Ministres,

H.J. de KOSTER

753

Règlement
concernant les exigences minimales pour les principaux
sérums et vaccins vétérinaires qui pourraient constituer
des risques de zoonoses et qui tombent
sous une réglementation prévue pour le contrôle,

M (67) 18, Annexe

I. Pureté

A. Sauf dans les cas exceptionnels repris sous B ou C, les vaccins ne pourront contenir des micro-organismes différents de ceux qui sont annoncés sur l'étiquette du flacon ou de ceux qui sont les agents de la maladie mentionnée sur l'étiquette, selon les exigences des réglementations nationales intéressées :

- a. La recherche des bactéries et des champignons parasites sera faite selon les techniques microbiologiques appropriées.
- b. Les vaccins à virus « vivants » seront, en outre, examinés au point de vue de la présence éventuelle d'autres virus.

B. Dans les cas des vaccins dont la préparation ne peut normalement aboutir à des produits purs ou stériles, l'examen microbiologique peut se limiter à constater l'absence des micro-organismes pathogènes ou susceptibles de l'être.

C. Dans les vaccins lyophilisés destinés à être administrés par os ou sur la peau, la présence éventuelle de rares germes non pathogènes pourra être tolérée (maximum 100 germes banals par ml de vaccin reconstitué).

D. Les contrôles prévus en A seront étendus aux liquides de dilution fournis pour remettre en suspension les vaccins lyophilisés. Ces liquides de dilution devront être stériles.

E. Les sérums devront être stériles.

II. Innocuité

A. Sérums

L'épreuve d'innocuité des sérums ne devra pas nécessairement être faite sur les espèces animales pour lesquelles ces sérums sont préparés. On pourra se limiter, mais il s'agit là d'un minimum, à une épreuve sur souris ou sur cobayes en procédant de la façon suivante :

6 souris en bonne santé, d'un poids de 16 g recevront en injection sous-cutanée 0,5 ml du sérum à contrôler ;

2 cobayes de 350 à 400 g recevront en injection sous-cutanée 5 ml de sérum à contrôler.

Ces animaux seront observés quotidiennement pendant 10 jours.

Pendant ce laps de temps, aucun symptôme clinique ne devra être observé, qui soit attribuable à l'injection de sérum.

B. Vaccins

En plus des épreuves sur animaux de laboratoire, des contrôles seront effectués sur des sujets réceptifs des espèces animales auxquels les vaccins sont destinés, sauf lorsque l'emploi exclusif des animaux de laboratoire permet d'obtenir des résultats satisfaisants et suffisants.

a. Vaccins inactivés

L'injection d'une dose adéquate de vaccin ne peut être suivie de manifestations pathologiques graves.

On peut admettre une réaction locale modérée (oedème, induration sans abcédation au nécrose) et une réaction thermique n'excédant pas 48 heures et n'altérant pas sensiblement l'état général.

En ce qui concerne le cas particulier des vaccins antirabiques inactivés le contrôle suivant sera d'application :

1) *Vaccins type Fermi à base de tissu nerveux dont l'inactivation est partielle*

Outre le contrôle habituel de stérilité, il sera procédé à un contrôle d'innocuité conformément aux indications relatives à la virulence résiduelle du vaccin terminé, citées dans la 2^e édition des Techniques de laboratoire pour la rage (monographie n° 23 de l'O.M.S.), dont le texte est repris à l'Addendum, point I.

Le titre sera calculé suivant la méthode de REED et MUENCH et devra être supérieur à 10^{-1} et inférieur à 10^{-2} .

2) *Vaccins à base de tissu nerveux dont l'inactivation est totale*

Outre le contrôle habituel de stérilité, il sera procédé à une épreuve d'innocuité conformément à la technique décrite dans la monographie n° 23 de l'O.M.S. précitée dont le texte est repris à l'Addendum, point II.

b. **Vaccins « vivants »**

Pour les vaccins « vivants » les dispositions particulières détaillées ci-dessous seront d'application :

1. *Vaccin antibrucellique*

On injecte à deux cobayes, par voie intramusculaire 1 ml d'émulsion contenant 5 milliards de *Brucella* du vaccin.

Au cours d'une observation de 10 jours, aucune manifestation pathologique grave ne devra se produire.

Le 11^e jour, les cobayes seront sacrifiés. La rate pourra contenir au maximum 500.000 *Brucellas* par gramme, la numération étant faite sur milieu solide.

2. *Vaccin contre le charbon bactérien*

a. *Vaccin Pasteur*

L'atténuation de la souche de bactériidies charbonneuses sera telle que l'injection sous-cutanée d'une dose normale de

vaccin par bovin soit parfaitement tolérée par le lapin pesant 1,5 kg. L'animal sera observé pendant 8 jours.

b. *Vaccin Sterne*

On prépare une suspension contenant 200.000.000 spores par ml.

On injecte par voie sous-cutanée à 6 cobayes 0,001 ml de cette suspension, c.-à-d. 200.000 spores. On observe les animaux d'épreuve pendant 10 jours : on ne devra noter qu'une faible réaction locale sans symptômes généraux. Accessoirement la méthode suivante pourra être appliquée : deux moutons ou deux chèvres recevront sous la peau 2 doses de vaccin pour bovin (20 millions de spores).

Au cours d'une observation de 10 jours il ne pourra se produire des réactions graves, locales ou générales.

3. *Vaccin contre la rage (LEP-HEP)*

On injecte à 8 souris de 20 gr, par voie sous-cutanée, une quantité de vaccin correspondant au 1/6^e de la dose prévue pour le chien. On observe les souris pendant 7 jours au moins. 7 souris au moins doivent survivre sans présenter aucun symptôme de maladie.

4. Pour d'autres vaccins à microbes ou à virus vivants, dont la mise au point ultérieure pourrait justifier des mesures de sécurité, l'injection d'une dose normale à des animaux des espèces auxquelles ces vaccins sont destinés ne pourra déclencher au maximum que des symptômes très frustes de la maladie que l'on veut combattre.

Toutefois ce contrôle sur animaux des espèces auxquelles ces vaccins sont destinés, ne s'effectuera obligatoirement que jusqu'à ce que des méthodes de laboratoire valables puissent leur être substituées.

III. Efficacité

A. Vaccin antibrucellique B 19

On injecte à 12 cobayes de 350 à 450 g par voie intramusculaire, 1 ml de vaccin, dilué de façon à contenir 5 milliards de germes par ml.

Après 9 semaines, on les éprouve par injection intramusculaire de 5.000 *Brucella* virulentes dans 1 ml. On pratique la même injection à 12 cobayes non vaccinés. Tous les cobayes sont sacrifiés 6 semaines après l'injection expérimentale.

Pour que le vaccin éprouvé soit valable, il faut que l'on ne trouve pas de *Brucella* dans la rate de plus de 6 cobayes des 12 vaccinés, tandis que tous les cobayes non vaccinés seront trouvés infectés.

B. Vaccin contre le charbon bactérien

On injecte par voie sous-cutanée à 8 cobayes, une dose de 0,01 ml de la suspension concentrée de spores (200 millions de spores par ml) 14 jours plus tard les cobayes qui ont résisté sont infectés par injection de 0,1 ml d'une culture de 24 h en bouillon de la souche Pasteur II qui contiendra $\pm$ 200 doses léthales.

Plus de la moitié des cobayes vaccinés doivent résister.

C. Vaccin antirabique

a. Contrôle de l'efficacité d'un vaccin antirabique inactivé

Le virus d'épreuve sera la souche CVS.

Le contrôle sera effectué selon la technique du test de Habel (voir Addendum point III).

b. Efficacité des vaccins antirabiques à virus vivant modifié

1. HEP et KELEV

- a) Le contrôle sur souris sera effectué selon la modification de la technique de K. HABEL applicable aux vaccins vivants ou atténués (voir Addendum point IV).
- b) Le contrôle sur cobayes sera effectué selon le test de KOPROWSKI (voir Addendum point V).

2. LEP

Le contrôle sera effectué sur cobayes selon la technique signalée sub 1. a) et éventuellement sur souris.

I. Contrôle de la virulence résiduelle du vaccin anti-rabique type Fermi

La virulence résiduelle devra être évaluée sur la souris, pour chaque lot de vaccin terminé, 9 jours après l'addition du phénol. S'il y a urgence, ce contrôle pourra être effectué plus tôt, mais en aucun cas moins de deux jours après l'addition du phénol.

Un échantillon de vaccin sera soumis à une centrifugation lente et le surnageant dilué à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} avec du soluté physiologique à pH 7. Chaque dilution sera inoculée par la voie intracérébrale à un lot d'au moins cinq souris (et de préférence 10 souris) à raison de 0,03 ml par animal. Les trois lots de souris seront maintenus en observation pendant 15 jours et l'on notera le nombre des animaux qui mourront paralysés à partir du 3^e jour suivant celui de l'inoculation.

II. Épreuve d'innocuité du vaccin anti-rabique à base de tissus vivants ou atténués

Une épreuve d'innocuité est effectuée sur le lapin (1) et sur la souris pour vérifier l'absence de virus viable dans le vaccin totalement inactivé. On doit pratiquer cette épreuve sur un échantillon représentatif de chaque récipient de vaccin en vrac.

Au moins deux animaux de chaque espèce seront choisis pour chaque épreuve. Chaque lapin recevra par voie intracérébrale au moins 0,25 ml de vaccin contenant au moins 5 % de tissu cérébral, et chaque souris (pesant de 18 à 20 g) au moins 0,03 ml du même vaccin. Tous les animaux d'épreuve seront gardés en observation au moins 14 jours ; pendant cette période, aucun animal ne devra présenter de symptômes de la rage ou d'une autre atteinte du système nerveux central.

III. Test de Habel pour contrôle d'efficacité de vaccins anti-rabiques partiellement ou totalement inactivés

a) *Souris*

On utilise des souris suisses blanches, âgées de 4 à 6 semaines et d'un poids uniforme ; on peut employer indifféremment des animaux d'un sexe et de l'autre, ou du même sexe si l'on préfère.

b) *Technique d'immunisation*

Soixante souris reçoivent 0,25 ml d'un vaccin dilué de façon à obtenir une émulsion à 0,5 % du tissu cérébral de départ (en

(1) Si un autre animal est utilisé pour la préparation du vaccin, cette épreuve sera effectuée sur cette espèce et sur la souris.

poids humide). Les inoculations sont faites par voie intrapéritonéale les lundi, mercredi et vendredi, pendant deux semaines consécutives (six inoculations au total). Trente souris mises à part au début serviront de témoins au moment de l'inoculation d'épreuve. Quand l'épreuve est effectuée sur des vaccins préparés à partir de matériel autre que le tissu cérébral, le vaccin doit être dilué à 1 : 10 avant l'inoculation des doses de 0,25 ml.

c) *Epreuve*

L'inoculation d'épreuve est effectuée le 14^e jour après la première injection de vaccin. A ce moment, on décongèle deux ampoules du virus fixe d'épreuve standard et on les dilue de façon à obtenir une suspension à 10^{-1} . Des dilutions en série de raison 10, de 10^{-1} à 10^{-7} , sont alors faites, en utilisant comme diluant une solution à 2 % dans l'eau distillée de sérum de lapin ou de cheval inactivé par la chaleur. Il est recommandé de maintenir les dilutions du virus d'épreuve dans un bain d'eau glacée pendant toute la durée du test afin d'éviter une chute du titre virulent. Pour transférer et mélanger le matériel dans la préparation de la série de dilutions, on changera de pipette à chaque étape.

Des groupes de 10 souris vaccinées sont alors éprouvées par voie intra-cérébrale avec 0,03 ml des dilutions à 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} et 10^{-1} , dans cet ordre. On peut employer une seule seringue et une seule aiguille pour toutes les inoculations, à condition que la seringue vide soit rincée plusieurs fois dans la dilution suivante avant d'être remplie de nouveau.

On prend ensuite une autre seringue pour inoculer les souris témoins avec les dilutions 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} du virus, afin de déterminer quelle dilution représente la DL_{50} . Si le virus d'épreuve est pleinement actif, ces trois dilutions donneront généralement de 100 % à moins de 50 % de survivants. Des morts dispersées pour chacune des trois dilutions doivent être considérées avec suspicion car elles sont l'indice d'erreurs dans la dilution du virus. Pour que l'épreuve du pouvoir immunisant soit considérée comme valable, il faut que le point 50 % (dilution correspondant à 50 % de mortalité par rage) soit situé au-delà de la dilution 10^{-5} chez les souris témoins.

Toutes les souris sont observées pendant 14 jours, et seules les morts survenant après le cinquième jour sont considérées comme dues à la rage. Les souris doivent être observées quotidiennement et les symptômes enregistrés. Les souris survivant à la fin des 14 jours, mais montrant des symptômes nets de rage sont à considérer, pour le calcul du pouvoir protecteur du vaccin, comme des souris mortes de rage.

d) *Détermination du pouvoir protecteur*

Les points 50 % sont déterminés par la méthode de Reed & Muench. On obtient ainsi, à partir des résultats réels de l'épreuve, les dilutions auxquelles, théoriquement, 50 % des souris vaccinées et 50 % des témoins mourraient de rage. En soustrayant le logarithme du point 50 % des animaux vaccinés de celui du point 50

des témoins, on obtient le logarithme du nombre de doses DL_{50} contre lesquelles la protection est assurée ou « log DL_{50} -protection ». Pour atteindre la norme minimale, la différence doit être de 3, soit log 1000, ce qui signifie que le vaccin protège contre 1000 DL_{50} .

IV. Modification de la technique dans le cas de contrôle de vaccins vivants ou atténués

Si le schéma de vaccination exige des doses progressivement croissantes, comme c'était le cas avec le vaccin de Pasteur, les 6 inoculations intrapéritonéales de 0,25 ml de l'émulsion à 0,5 % doivent être faites en partant de la dose de vaccin la moins virulente et en remontant jusqu'à la plus virulente. Si toutes les doses prescrites par le schéma sont les mêmes, il n'est pas nécessaire d'apporter de modification au mode opératoire.

*
**

V. Epreuve sur le cobaye du vaccin préparé sur embryon de poulet

Le test consiste à inoculer des cobayes par voie intramusculaire avec le vaccin préparé sur embryon de poulet, puis trois semaines après, à titre d'épreuve, avec le virus des rues ou le virus fixe.

a) *Les cobayes*

Il est bon d'utiliser des cobayes ne pesant pas moins de 350 g au début de l'épreuve. L'emploi d'animaux d'un poids inférieur est déconseillé.

b) *Technique d'immunisation*

Le contenu de deux flacons de vaccin pour chaque série ou sous-série de récipients définitifs est reconstitué (indépendamment de la dose recommandée par le fabricant) avec de l'eau distillée stérile contenant 2 % de sérum de cheval normal (3 ml de diluant par dose chien de vaccin desséché). Mélanger les deux doses de vaccin reconstitué, prélever une dose chien entière (3 ml) et l'ajouter à 17 ml d'eau distillée contenant 2 % de sérum de cheval. On obtient ainsi une suspension de tissu à 5 %.

Au moins 10 cobayes sains sont marqués et inoculés avec 0,25 ml de vaccin dilué dans le muscle gastrocnémien, sur la face interne de la patte, aussi près du nerf que possible. En même temps, au moins 5 cobayes sains sont marqués et mis de côté comme témoins.

c) *Préparation du matériel d'épreuve*

1° *Virus des rues*

Des chiens adultes sont inoculés avec 0,1 ml d'une suspension de tissu de glande sous-maxillaire de chien conservée congelée à — 70°C.

L'injection dans le muscle masséter est bilatérale ; on emploie une seringue de 1 ml avec une aiguille de $0,90 \times 25$ mm. Lorsque les animaux succombent après avoir présenté des signes de rage, ou quand ils sont sacrifiés moribonds, les glandes sous-maxillaires sont prélevées, un petit fragment en est détaché avec des ciseaux et le reste est congelé dans une grande boîte de Petri et conservé au réfrigérateur entre -50° et -70°C . Le fragment détaché est broyé dans un mortier avec du sérum de lapin à 10 % dans le soluté physiologique en quantité suffisante pour réaliser une suspension à 10 % en poids. La suspension est alors centrifugée dans une centrifugeuse angulaire pendant une minute à 1000 tours-minute, et le liquide surnageant est prélevé. Des dilutions de 10 en 10 en sont faites dans le sérum de lapin normal à 10 % en soluté physiologique, et des doses de 0,03 ml de ces dilutions injectées par voie intracérébrale à des souris suisses blanches âgées de 28 à 35 jours. Ces souris sont observées pendant 21 jours et le nombre de celles qui succombent est enregistré quotidiennement. Après la période d'observation, le titre DL_{50} de chaque préparation est calculé.

Lorsqu'il s'agit d'obtenir un pool de virus important, seules les glandes dont le titre dépasse $10^{-4,5} \text{DL}_{50}$ sont versées à la masse. Les glandes sont retirées du réfrigérateur, décongelées, coupées en petits fragments avec des ciseaux et placées dans un Waring blender avec du sérum de lapin normal à 10 % dans le soluté physiologique en quantité suffisante pour réaliser une suspension à 20 % en poids. Le broyeur est mis en mouvement pendant 2 à 3 minutes seulement, ce qui évite l'échauffement du matériel. Il est alors immergé dans l'eau glacée jusqu'à ce qu'il soit bien refroidi, et le broyage est recommencé pendant 2 ou 3 minutes. L'opération est répétée quatre ou cinq fois et la préparation finale est filtrée sur une épaisseur de gaze.

Le matériel filtré est réparti dans des ampoules en verre Pyrex, par quantité de 1 ml. Les ampoules sont scellées et le matériel est congelé en coquille dans un bain d'alcool- CO_2 . Les ampoules sont ensuite conservées à une température comprise entre -50°C et -70°C .

2° Virus fixe

Le virus d'épreuve standard (CVS) peut également être utilisé pour éprouver les cobayes.

Afin d'augmenter le pouvoir pathogène de cette souche pour les cobayes inoculés par voie intramusculaire, on peut faire plusieurs passages intracérébraux sur de jeunes cobayes (150-200 g) et utiliser pour l'épreuve le virus obtenu sur cerveau de cobaye au lieu du virus obtenu sur cerveau de souris.

d) Épreuve des cobayes

Trois semaines après la vaccination, les cobayes vaccinés et les témoins sont éprouvés par injection intramusculaire d'une souche canine de virus des rues ou de virus fixe.

On injecte par voie intramusculaire 0,5 ml d'une dilution convenable de suspension de virus dans la patte opposée à celle qui a servi pour la vaccination. La dilution à utiliser doit être la moitié de celle qui a tué 100 % des cobayes au cours d'un titrage préliminaire ; par exemple, si la dilution à 1 : 160 tue 100 % des cobayes, il faut utiliser comme virus d'épreuve une dilution à 1 : 80.

e) *Interprétation des résultats*

Un exemple des résultats obtenus avec les vaccins qui ont satisfait à l'épreuve du pouvoir immunisant est exposé dans le tableau ci-après. On verra que dans le laboratoire en question le vaccin a fait la preuve de sa valeur antigénique chez les chiens éprouvés avec le virus des rues. On peut également observer que, dans la plupart des cas, les chiens étaient protégés contre le virus d'épreuve (virus des rues) par une préparation vaccinale qui immunisait le cobaye et qui était constituée par une suspension de tissu d'embryon de poulet à 5 %. Comme il a été dit plus haut, le virus d'épreuve doit être assez virulent pour causer la mort de la plupart sinon de tous les témoins. On a observé qu'un tel virus éprouvé sur la souris doit avoir un titre égal ou supérieur à $10^{-5,50}$ DL₅₀ pour être suffisamment envahissant et causer la mort de la plupart des témoins.

Dans le test, 80 % des animaux témoins doivent mourir de rage et 70 % des cobayes vaccinés doivent survivre à l'inoculation d'épreuve sans présenter aucun symptôme de rage. Ce test constitue une bonne réplique des conditions naturelles et peut être effectué assez facilement. Il n'exige qu'une seule inoculation de vaccin et une seule inoculation d'épreuve. En utilisant comme virus d'épreuve des souches de virus des rues isolées à des endroits différents, on peut l'appliquer à l'évaluation du pouvoir protecteur de vaccins à base d'embryon de poulet provenant de différentes régions du monde vis-à-vis de différentes souches de virus rabique.

Récemment, des tests effectués sur des cobayes avec des lots importants de vaccin Flury LEP en utilisant le virus CVS pour l'épreuve des animaux vaccinés, ont montré que les résultats ainsi obtenus sont comparables à ceux du titrage du virus sur la souris par voie intracérébrale. Les symptômes de paralysie observés du quatrième au dixième jour après l'inoculation de la dose d'épreuve correspondent bien au titre virulent du vaccin et peuvent, par conséquent, faciliter la sélection de produits actifs.

RESULTATS DE L'EPREUVE D'ACTIVITE DU VACCIN PREPARE SUR EMBRYON DE POULET

Lot de vaccin	Titre DL ₅₀ souris	Mortalité après épreuve intramusculaire avec le virus des rues								
		Cobayes							Chiens	
		Immunisés avec les dilutions suivantes de vaccin : a)						témoins non vaccinés	vaccinés b)	témoins non vaccinés
		1 : 5	1 : 20	1 : 80	1 : 320	1 : 1280	1 : 5120			
A	10 ^{-2,75}	0/8	0/9	0/6	0/10	0/8	—	10/10	0/5	3/6
B	10 ^{-2,85}	0/9	0/10	5/10	5/10	9/10	—	10/10	0/6 0/3	3/5 10/10
C	10 ^{-2,95}	0/8	0/8	2/7	6/8	—	—	10/10	0/9 0/6	8/9 6/10
D	10 ^{-3,00}	0/8	0/6	1/10	4/5	0/9	—	8/8	0/10	10/10
E	10 ^{-3,90}	—	—	1/4	1/6	4/5	0/4	8/9	0/6	18/25
F	10 ^{-5,00}	—	—	0/5	0/3	1/4	1/5	8/9	0/8	18/25
G	10 ^{-3,90}	—	3/15	—	—	—	—	13/16	0/7	3/5

a) Dans le cas des lots A et D, on a injecté 1 ml de suspension de tissu à 5 % ; dans tous les autres cas, on a inoculé 0,5 ml. (Note : On utilise maintenant 0,25 ml d'une suspension de tissu à 5 % pour les épreuves courantes).

b) On a utilisé pour la vaccination 5 ml d'une suspension de tissu à 20 % .