I. E. M. V. T. - CIRAD

PROGRAMME PRIORITAIRE
DE COOPERATION TECHNIQUE
ENTRE LE MAROC ET LA FRANCE

PRODUCTION DE VACCIN ANTIRABIQUE A USAGE VETERINAIRE

Nicole FASSI-FEHRI

Année 1988

I. E. M. V. T. - CIRAD

PROGRAMME PRIORITAIRE
DE COOPERATION TECHNIQUE
ENTRE LE MAROC ET LA FRANCE

PRODUCTION DE VACCIN ANTIRABIQUE A USAGE VETERINAIRE

Nicole FASSI-FEHRI

Année 1988

S O M M A I R E

Rapport d'activité ..... P. 4 à 9

Annexe ..... Rapport de Mission effectué à Rabat par le Docteur P. RECULARD du 17/02/88 au 06/03/88

Rapport de Mission effectué à Rabat par le Docteur J. BLANCOU du 18/01/88 au 22/01/88

RAPPORT D'ACTIVITE

INTRODUCTION

Au cours de l'année 1988, la poursuite des essais expérimentaux de production de vaccin antirabique a permis le choix d'un système de production.

L'équipement complet du laboratoire de production de vaccin antirabique a été obtenu.

Les travaux d'aménagement du laboratoire ont été terminés.

Etat d'avancement des travaux de construction, d'aménagement et d'équipement:

Les travaux de construction ont été terminés dès 1987.

L'aménagement a été également achevé au cours de l'année 1988; les branchements de l'eau déminéralisée et de la vapeur restent à faire.

Les équipements des deux chambres étuves et de la chambre froide sont en cours de réalisation, grâce à un financement C. E. E.

La fourniture et l'installation du matériel de laboratoire sont réalisés grâce à un financement C. E. E. Le laboratoire sera ainsi totalement équipé et installé à la fin du printemps 1989.

L'appel d'offres N° 1/CEE/88, dont l'ouverture des plis a eu lieu à Biopharma en septembre 1988, a permis la commande du matériel de laboratoire dont le montant s'élève à 372.292,64 ECU.

A noter que sur neuf lots, cinq sont attribués à des fournisseurs français.

Participation de la France au projet.

- Les sommes engagées par l'Assistance Technique Française et mises à la disposition du projet pour l'année 1988 s'élèvent à 110.000 F, répartis de la façon suivante:

  * 80.000 F pour le petit matériel et réactifs
  * 10.000 F d'appui sur place
  * 20.000 F pour la documentation

- Un stage d'un mois au CNER de Nancy a été effectué en Juillet 1988 pour l'étude des méthodes de contrôle de vaccin antirabique et l'interprétation de leurs résultats.

- La mission du Dr. J. BLANCOU, directeur du CNER de Nancy, expert OMS, prévue en 1987, a été reportée en Janvier 1988. Elle s'est déroulée du 19/01/88 au 21/01/88 et à porté sur les méthodes actuelles de contrôle des vaccins antirabiques, leurs applications et leurs interprétations. Les tests NIH, de la pharmacopée Européenne et les contrôles sur espèces cibles (sérologie, épreuve...) ont été plus particulièrement envisagés et traités.

Participation de l'O. M. S.

La mission du Dr. P. RECULARD, conseiller O. M. S, Institut Pasteur Paris, s'est déroulée du 17/02/88 au 06/03/88. Au cours de cette mission ont été réalisés:

- des sensibilisations de plaques pour le titrage des glycoprotéines
- des titrages d'activité hémagglutinante
- des titrages par la méthode des plages
- des inoculations de BHK21, fournies par l'Institut Pasteur
- des essais d'inactivation à la β propiolactone

Poursuite des essais expérimentaux de production:

Ils se déroulent dans les locaux de Biopharma avec la collaboration du Laboratoire National de Diagnostic et d'Epidémiologie de la Rage de Rabat.

Les essais expérimentaux de production ont été poursuivis sur les six systèmes mis à la disposition du projet:

C \ V	CVS	P V	I P
BHK	1	2	3
BSR	6	5	4

Tableau I = Systèmes testés

Toutefois, les difficultés rencontrées dans les cultures des cellules BHK (décollement de tapis...), l'impossibilité d'effectuer des récoltes successives, et les faibles titres infectieux et glycoprotéiques des récoltes virales obtenus avec les trois virus (PV, CVS, IP2061) les ont fàits abandonner.

La souche CVS a été également abandonnée malgré ses bons résultats sur BSR, en raison du manque d'information la concernant.

Les essais expérimentaux des systèmes PV/BSR et IP2061/BSR ont été poursuivis parallèlement sur flacons roulants après amplification cellulaire sur "multi-tray". Les titres infectieux et les titres en glycoprotéines des récoltes successives (J5, J8, J11, J14) séparées et mélangées, avant et après filtration, après concentration, associés aux résultats des tests NIH après inactivation, nous ont permis d'opter pour le système IP2061/BSR.

(Tableaux II, III et IV)

Quelques exemples des résultats obtenus avec le système IP/BSR:

Récoltes	Titres en glycoprotéines mg/ml	Log des titres infectieux DL50/ml
J5	23.200	7
J8	17.920	6,5
J12	6.960	6,75
J15	3.440	7
J5 + J8		
filtré	17.600	7,2
concentré	31.040	7,2
inactivé tamponné	27.680	
J12 + J15		
filtré	6.300	8,6
concentré	6.980	7,8

Tableau II - IP/BSR40 - P3

Récoltes	Titres en glycoprotéines mg/ml		Log des titres infectieux DL50/ml
J5	7.600		7,65
J8	3.500		6,8
J11	3.160	11.520	6,6
filtré		5.920	4,9
concentré		9.800	5,9
inactivé		8.200	
J14	3.900	9.000	6
filtré		7.120	
concentré		8.500	5,4
inactivé		7.200	
J5 + J8			
filtré	6.000		7,1
concentré	7.500		7,65
inactivé	7.000		

Tableau III - IP/BSR41 - P3

Vaccins	Titres en glycoprotéines mg/ml	Titres infectieux	NIH U.I. (Rabat)	T. Pharmacopée Européenne (Nancy)
PV/BSR41 P2 J8	5700, 4000, 7000	7,2	3,2	
PV/BSR43 P3 J4	7500, 4000, 3000	8	12,6 1	
PV/BSR43 P3 J7	14400, 11000, 7000	7	5 7,9 2	non adjuvé ≥ 1 UI adjuvé = 1,02
PV/BSR38 P3 J7	2400	3,7	0,5	
IP/BSR41 P3 J5	10000 - 7000	8,2	5	
IP/BSR43 P3 J4	8600 - 8000	7,6	14,2	non adjuvé = 0,3< <2,1 adjuvé = 0,7< < 5,7

Tableau IV = comparaison des titres obtenus avec les tests d'activité

<u>Remarques:</u>

* La baisse des titres des récoltes après filtration sur des filtres de 1,2 est compensée par les effets de la concentration (2 à 4 fois) sur Minitan ultrafiltration.

Les titres infectieux et en glycoprotéines baissent au cours des récoltes successives et le mélange des récoltes fait chuter les titres des bonnes récoltes (Tableaux II et III).

Les N. I. H. réalisés sur des "vaccins" dont les titres glycoprotéiques et infectieux sont bons, sont également élevés. A l'inverse, un mauvais N. I. H. correspond à des vaccins dont les titres en glycoprotéines et infectieux sont faibles (Tableau IV). Les résultats des tests simplifiés à une seule injection, réalisés à Nancy, confirment le niveau d'activité des vaccins produits.

L'élevage des souris blanches, implanté dans la ferme expérimentale de Biopharma, permet de subvenir actuellement aux essais expérimentaux (titrages infectieux, inactivation, N. I. H...).

L'aménagement d'une animalerie chiens pour le contrôle sur espèce cible est en cours dans la ferme expérimentale de Biopharma. Elle doit permettre, dans des conditions de sécurité totale, le maintien des chiens pendant trois ans, vaccinés et éprouvés avec une souche rabique locale.

En conclusion,

- La poursuite des essais expérimentaux a abouti au choix d'un système unique dont l'activité correspond aux normes O. M. S.

- Au cours de l'année 89, l'installation et la mise en route du matériel de laboratoire va permettre la production de lots pilotes industriels.

- L'aménagement d'une animalerie chiens permettra les contrôles sur espèces cibles dont la durée est de trois ans, tests recommandés par l'O. M. S. et imposés par certaines réglementations internationales.

ANNEXE I

6/3/88

RAPPORT DE MISSION A RABAT

Effectué du 17/2/88 au 6/3/88 par P. RECULARD

I - Résultats Essais Expérimentaux en cours pour la Production de Vaccin Antirabique

Sur trois souches x deux cellules, plusieurs essais ont été réalisés dans chaque système, sur deux passages en série à partir des souches virales d'origine PV pur, P2061 (Institut Pasteur) NX (C. E. R. Rage Nancy France). Nota: les caractères antigéniques du virus NX devront être précisés.

1 - Titres infectieux, GP mesurée par EIA, et activité hémagglutinante sont en faveur du système PV/cellule BSR.

2 - La souche TP/2061/cellule BSR bien qu'ayant un faible titre infectieux semble, au second passage productrice de GP en quantité importante.

3 - La souche NX produit de bons titres infectieux, et de la GP en quantité comparable à PV/cellule BSR, mais n'a pas d'activité hémagglutinante.

4 - Aucune des trois souches passées sur cellule BHK n'a donné de résultats satisfaisants.

Ce constat est très étonnant, car il s'agit là du système de Référence éprouvé depuis de nombreuses années, et qui de plus sert à la préparation de vaccins rabiques ayant fait leur preuve. Hypothèse: croissance trop rapide des cellules, temps de maintien après infection insuffisant, modalités d'infection inadaptées.

5 - Même si l'on disposait de résultats complets (y compris cultures virales/cellule BHK acceptables), le choix d'un système ne peut être qu'après épreuves du NIH selon l'O. M. S. sur au moins deux lots de chaque système (aliquots de chaque culture inactivés par la BPL).

6 - Ces essais en NIH permettront de calculer pour chaque système une corrélation GP/VI et surtout permettront de classer les différents produits selon leur activité rapportée à la GP (possibilité de différences sensibles de l'immunogénécité / pour une même quantité de GP en fonction et de la souche et de la cellule hôte.

7 - Pour le choix, on tiendra compte également du système offrant les meilleures facilités pour la production, soit par exemple facilité d'entretien et de démultiplication des cellules, possibilité de récoltes successives sur un même lot de culture.

En ce qui concerne la souche virale, sauf impossibilité majeure, la souche PV devra être préférée à toute autre pour les raisons données ci - dessus.

VIRAL STRAIN	CELL LINE	PASSAGE N°	TIME AFTER INFECTION (in days)	INFECTIONS TITER DL50/ml	VIRAL GLYCOPROTEIN ng/ml	HEMAGGLUTININ ACTIVITY
Rage PASTEUR PV pur 3-231184	BHK	1	4	–	90	
			5	$10^{7.2}$	146	0
			7	–	460	2
		2	7	$10^{6.2}$	300	>
	BSR	1	3	–	300	
			4	–	900	
			5	$10^{7.0}$	1100	8
			6	–	900*	0 *
			7	$10^{7.8}$	2320	>32
			8	$10^{7.6}$	4220	> 32
		2	5	> $10^{7.8}$	2500	16
			6	–	3560	
			7	$10^{7.8}$	10000	16
		1	5	$10^{7.8}$	2400	> 32
			6	–	800 *	
			7	$10^{7.2}$	2680	16

VIRAL STRAIN	CELL LINE	PASSAGE N°	TIME AFTER INFECTION (in days)	INFECTIONS TITER DL50/ml	VIRAL GLYCOPROTEIN ng/ml	HEMAGGLUTININ ACTIVITY
PASTEUR 2061 p 18	BHK	1	5	$10^{6.2}$	92	0
			7	$10^{6.0}$	164	
		2	4	–	> 20	0
			5	$10^{5.4}$	> 20	
	BSR	1	5	$10^{5.8}$	560	0
			8	–	10000	0
		2	5	–	2400	
			7	–	6500	
			8		9900	0

VIRAL STRAIN	CELL LINE	PASSAGE N°	TIME AFTER INFECTION (in days)	INFECTIONS TITER DL50/ml	VIRAL GLYCOPROTEIN ng/ml	HEMAGGLUTININ ACTIVITY
NX	BHK	1	5	$10^{6.3}$	450	0
			6	$10^{6.8}$	370	
		2	5	$10^{7.0}$	940	0
	BSR	1	5	$10^{6.4}$	2900	
			6	–	1600*	
			7	$10^{7.0}$	4600	0
			8	–	4700	8
		2	4	–	3400	0
			5	$10^{7.2}$	6040	0
			6	–	2100 *	0
			7	$10^{6.2}$	6000	0

II - Plan de travail pour la période Mars - Août 1988

= première approche du pouvoir protecteur par épreuve du NIH "simplifiée"

1°/ Sur des échantillons de récoltes effectuées en 1987, et conservées congelées à - 80°C.
Dans les trois systèmes PV/cellule BSR
NX/cellule BSR
LP2061/cellule BSR

1 - 1 choisir dans chacun des systèmes le ou les récoltes (volume > 10 ml) ayant donné les meilleures valeurs en GP par EIA.
Exemple: pour PV/BSR:

P1 + 8 # 4200 ng GP (échantillon 12)
\+ P2 + 7 # 15000 ng GP (échantillon 15)
P1 + 7 # 2680 ng GP (échantillon 24)

1 - 2 Après décongélation rapide, faire un mélange homogène des récoltes, s'il y en a plusieurs (comme dans l'exemple précédent). Centrifuger pour déposer les débris cellulaires.

1 - 3 Procéder ensuite immédiatement à l'inactivation par une technique simplifiée (réservée à de très petits volumes).

Exemple: soit 20 ml d'une récolte, ou d'un mélange de récoltes, placés dans un flacon de 50 ml + petit barreau aimanté. Préparer une solution de BPL (gardée à - 15°C) au 1/40 dans l'eau distillée refroidie à + 4°C (soit 1 ml + 39 ml eau).
Bien mélanger et prélever 0,2 ml (200 l) que l'on ajoute au 20 ml de suspension virale (dilution finale de la BPL = 1 pour 4000).

- Placer le flacon de virus + BPL, sur agitateur magnétique vitesse lente, à la t° du laboratoire, laisser en agitation # une heure.

- Après une heure, rectifier le pH si acidification au dessous de 7 --> ramener à 7,3 ± 0,1.

- Transférer à l'aide d'une pipette le contenu du flacon dans un second flacon de 50 ml (pour éliminer toute goutte de virus sur les parois qui n'aurait pas été en contact avec la BPL).

- Placer le flacon à l'étuve à 37°C pendant une heure. Agitation douce, manuelle après 15', 30' et 45'.

- Après une heure enlever le flacon de l'étuve, le refroidir rapidement (dans la glace), ajouter 1,5 ml de BSA à 4% dans tampon PBS pH 7,3 dans les 20 ml de virus inactivé, et placer à + 4°C dans l'attente du contrôle.

1 - 4 Réaliser l'épreuve du NIH "simplifié" le plutôt possible après la préparation des échantillons.
- Prélèvements à J+3, J+4, J+5, J+6 après le jour de l'infection.
- Sur ces prélèvements: analyses habituelles: DL50 ou plages, EIA et hémagglutination.

2 - Expériences complémentaires pour la définition des paramètres de cultures virales.

2 - 1 Système PV/cellule BHK: prioritaire, puisque les résultats obtenus antérieurement sont très décevants, et non conformes aux rendements habituels de cette souche adaptée à la cellule BHK. Hypothèse pouvant expliquer l'échec:
a) croissance trop rapide des cellules dans un milieu trop riche
b) milieu également défavorable pour la réplication virale, et surtout pour la formation de virus complet bien glycosé.

Plusieurs paramètres peuvent être pris en considération et faire l'objet d'essais en petits volumes: - Ensemencement moins riche en cellules à to - Comparaison de la croissance cellulaire (sans virus) en milieu à la lactalbumine, et en milieu DMEM + glutamine + tricine (pH 7,3) additionné de 8 ou de 5% de S. veau foetal.
- Infection sur tapis développé (ou presque confluent) à t compris entre 24 et 48 heures par le virus PV (MOI 1/2 calculé sur N cellule ensemencées à to).
- Pour la production virale (changement de milieu), comparer le milieu MEM normal, en milieu MEM déficient + 0,5% BSA.
- Changer la température d'incubation de 37°C à 33°C après deux heures de contact cellule + virus en volume réduit (1/2 volume) dans le milieu de changement (ramené à un volume).

Prélèvements à J+3, J+4, J+5, J+6 après le jpur de l'infection.
- Sur ces prélèvements: analyses habituelles: DL50 ou plages, EIA et hémagglutination.

2 - 2 Au moins sur l'un des autres systèmes ayant donné de bons résultats, et de préférence dans le système PV/cellule BSR. Comparer les résultats (titre infectieux, EIA, Ha) sur des cultures, réalisées selon le même protocole que celui mis en oeuvre en 1987, mais en utilisant deux milieux de changement:

a) milieu MEM normal + 0,5% BSA

b) milieu MEM déficient et dilué (trois parties pour une partie solution de Earle). + 0,5% BSA pH 7,3 - 7,4 -

--> favoriser la pénétration du virus en ajoutant 20 microgrammes de DEAE - dextrau dans le milieu de contact virus/cellule.

Ces essais seront déterminants pour fixer les conditions optimales de préparation des lots "pilotes", ainsi que des lots expérimentaux qui conduiront au choix définitif (voir 3).

3 - Cultures pour le choix définitif du système de production

N. B. Il est souhaitable de réaliser les cultures cellulaires et virales pour cette étape décisive en utilisant la technologie de production, c. a. d. des cultures dynamiques en flacons roulants.

3 - 1 Objectif: obtenir au moins 500 ml de récolte(s) virale(s) par système, en utilisant au minimum 4 flacons par lot de cultures (- car il y a souvent des différences sensibles dans les rendements d'un flacon à l'autre, compensées par le nombre de flacons mis en jeu dans la production (8 flacons par lot serait préférable).

3 - 2 Réactifs: cellules et souches virales.

Au vu des résultats actuels, il est important de comparer les résultats des systèmes:

PV / cellule BSR
NX / cellule BSR
TP 2061 / cellule BSR

auxquels il faudra joindre le système PV / cellule BHK quand le problème des cultures sera résolu, car c'est le système de référence, qui a fait ses preuves d'efficacité depuis plusieurs décennies pour la prophylaxie (chiens, chats et bovins).

- cellules: démultiplication par passages successifs, d'abord en flacons statiques, puis dynamiques pour la préparation finale de 8 rollers, destinés a être infectés.

- virus: en partant des semences d'origine (PV, NX, 2061) préparer une semence "initiale en quantité et titres infectieux suffisants pour:

1) préparer ces lots de sélection
2) préparer des lots "pilote" lors de l'étape ultérieure.

Ne retenir que des récoltes titrant > à 10 DL50/ml.
Exemple: récolte titrant 10 /ml: il faudra préparer environ 800 ml de semence, qui permettront d'ensemencer # 300 rollers de 800 cm . (# 10 rollers pour le lot de "sélection", puis trois lots pilote de # 100 rollers).

- Protocole de cultures: ce sera celui défini pour chaque système après analyse des résultats des expériences antérieures.

- Filtration des récoltes: 8 rollers produiront # 900 ml pour 1 récolte, ou 1800 ml pour 2 récoltes - (additionnées de 5% de saccharose) utiliser des filtres à membranes (O 142 ou 293 m/m) montés avec membranes de porosités en cascade:

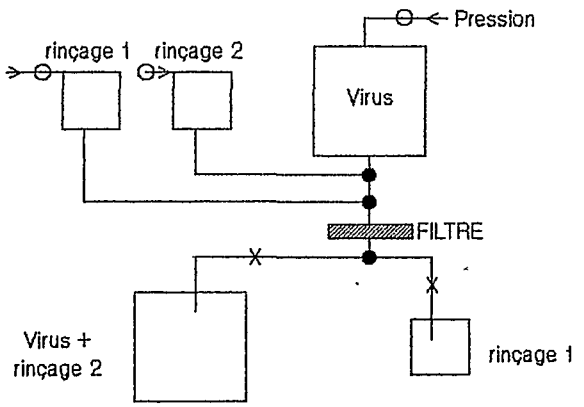
- préfiltre
- 15 µ
- 3 µ
- 0,8 µ

- rincer le filtre avec le milieu de changement (sans BSA) et additionné de tampon citrate en PBS (0,5 gramme citrate trisodique dans 100 ml PBS). Ajouter 100 ml de cette solution de citrate dans 900 ml du milieu de rinçage.

- éliminer le liquide de rinçage par une dérivation.

- passer la récolte virale par le filtre dans le flacon de réception.

- rincer le filtre, avec le milieu de rinçage, sans BSA, sans citrate, mais additionné de 5% de saccharose - soit 20% en volume du volume de virus filtré. Exemple: 2 litres de récolte --> rincer avec 400 ml.



- Inactivation des récoltes

- Inactiver 500 ml de récolte (sur 1 récolte ou prélevés sur le mélange de 2 récoltes).

- Préparer comme précédemment une solution de BPL au 1/40 dans l'eau distillée.

- Dans le produit à inactiver, maintenu entre 4°C et 10°C ajouter 5 ml de la solution de BPL, au goutte à goutte (10 gouttes / minute) dans le flacon + barreau aimanté, sous agitation lente. Opérer après une heure un premier transfert dans un second flacon, placer une nuit en chambre froide sous agitation lente.

- Le lendemain contrôler le pH, rectifier s'il est inférieur à 7,1 --> ramener à 7,4.

- Placer le flacon dans une enceinte chauffante pour amener la suspension virale progressivement à 37°C (si l'on a pas de sonde, placer un thermomètre dans un flacon semblable contenant le même volume d'un liquide "témoin").
Quand la température de 37°C est atteinte dans le liquide, laisser incuber 5 minutes, puis transporter immédiatement le produit dans un bain réfrigérant --> + 4°C.

- Contrôler à nouveau le pH (mêmes corrections si nécessaire).

- Opérer un deuxième transfert dans un récipient stérile et ajouter 16 ml d'une solution de BSA à 10% en tampon PBS à pH 7,3.

- Garder à + 4°C après répartition en plusieurs flacons pour les différents contrôles. - EIA, Ha et NIH selon méthode de l'OMS.
Il est souhaitable de faire ces contrôles, dans le mois qui suit la préparation du vaccin.

4 - Plan prévisionnel de l'étape pilote

1 - Rappel -
Choix d'un système unique en fonction des résultats du III
N. B. cette étape pourrait en fait être conduite avec deux systèmes mais:
1) allongement du temps nécessaire à la mise au point du protocole de production
2) énorme charge de travail, compte tenu de l'équipe telle qu'elle est actuellement formée à BIOPHARMA.

4 - 2 Dimension des lots pilotes.
Sur la base d'une production Vx/cellule y qui nécessiterait l'utilisation de 2 ml de récolte pour une dose de vaccin final, le lot pilote devrait permettre l'obtention de 15 litres de virus clarifié, au minimum, en une récolte pour la transformation en vaccin fini (concentré, inactivé, stabilisé, adsorbé).
soit 100 rollers (4 # 800 cm)

--> # 12 litres récolte "brute"

15 litres récolte "clarifiée"

3,5 l de concentrat

6,00 l de vaccin final adsorbé <-- # 5,500 l de virus inactivé, concentré --> dilué en stabilisant

- il est évident que, si le système choisi, permet deux récoltes, traitées en mélange, cela ne peut être que mieux (résultats d'autant plus fiables que l'on tend vers la dimension des lots de production). Soit dans ce cas pour 100 Rollers --> 24 litres de récoltes brutes aboutissant à 12 litres de vaccin final.

4 - 3 Schéma du procédé de fabrication des lots pilotes, et des contrôles à prévoir.

Schéma: fabrication et contrôles / lots pilotes

	CONTROLES
A) Phase de cx cellulaire. 100 rollers (+ 2 témoins) de 800 cm² # 8 X 10 cellulaires. 25 litres Milieu + 5l	cellules de production cf. OMS
B) Phase de production virale (pour 1 récolte) # 12 litres de milieu. # 2 (de 0,4 à 4) 10^9 DL50 inoculum	cultures infectées: cf. OMS cultures témoins: cf. OMS inoculum viral: cf. OMS
C) Récolte "brute" # 12 litres	titre infectieux (TI) stérilité UHA, GP/EIA (échantillon centrifugé)
D) Récolte clarifiée (filtres 40 --> 0,45 + rinçage --> # 15 litres	TI, UHA, GP/EIA (NIH sur aliquot + B PL)
E) Concentration / Pellicon + 1 cassette PTHK 100.000 concentrat # 3,500 litres	UHA, GP/EIA stérilité
F) Inactivation du concentrat par BPL 1 pour 4000 (en 3 étapes) et transferts # 3,500 l	contrôle inactivation méthode amplification selon OMS NIH selon OMS
G) Dilution appropriée en milieu stabilisateur (hypothèse pour Cx 2, finale) # 5,500 litres	UHA, GP/EIA stérilité
H) Addition du gel d'albumine tamponné et adsorption vaccin final # 6 litres répartition	GP/EIA sur surnageant après centrifugation stérilité innocuité et activité / espèces cibles
stockage + 4°C	contrôle inactivation, NIH stérilité - stabilité dans le tepms animaux cibles: cinétique Ac épreuves + 1 an - + 2 ans

ANNEXE II

MINISTERE DE L'AGRICULTURE
Direction de la Qualité
Services Vétérinaires

CENTRE NATIONAL D'ÉTUDES SUR LA RAGE
ET LA PATHOLOGIE DES ANIMAUX SAUVAGES

Domaine de Pixérécourt
B. P. N° 9
F - 54220 MALZÉVILLE - France

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MALZÉVILLE, LE 25 Janvier 1988

TÉL. 83.29.26.08

RAPPORT DE MISSION A RABAT

Effectuée du 18 au 22 Janvier 1988 par J. Blancou

Du 18 au 22 Janvier 1988, je me suis rendu en mission de consultant technique à Rabat, à la demande du Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire (M A R A) du Maroc (prenant en charge mon séjour) et avec l'accord du Ministère des Affaires Etrangères de France (prenant en charge mon voyage).

1. OBJECTIF DE LA MISSION

Cet objectif avait été défini par accord préalable entre le M A R A et l'Ambassade de France au Maroc (Note 6212 - 13 - 10 - 87). Il était de documenter les laboratoires producteurs de vaccin antirabique (" Biopharma ") ainsi que les laboratoires d'Etat du M A R A, sur l'ensemble des méthodes actuelles de contrôle des vaccins antirabiques. Il était aussi d'informer ces laboratoires des dernières réglementations nationales et internationales dans ce domaine.

Ce voyage faisait suite à cinq missions antérieures effectuées par des agents du Centre National d'Etudes sur la Rage et la Pathologie des Animaux Sauvages (Drs Artois, Barrat et moi même) ainsi qu'à la formation de sept stagiaires marocains en vue du renforcement du programme de lutte contre la rage au Maroc.

2. DEROULEMENT DE LA MISSION

Lundi 18 Janvier : Voyage Nancy - Paris - Casablanca* - par vol AT 781. Accueil à Casablanca puis transfert à Rabat par le Dr F. Bertin directeur de la production à " Biopharma ". (* L'aéroport de Rabat est fermé en janvier pour cause de travaux).

Mardi 19 Janvier : *Matinée*

- Accueil à la Direction de l'Elevage au M A R A par le Dr Fikri, Chef de la Division Santé Animale et entretien sur la situation épidémiologique et sur l'état d'avancement du programme national de lutte contre la rage.

- Accueil à la Société " Biopharma " et premiers entretiens techniques avec le Dr Bertin, M. El Harak, A. Ouchene et Nicole Fassi Fehri, responsable du Laboratoire National de Diagnostic et d'Epidémiologie de la Rage (L N D E R) au M A R A. Remise d'une souche de cellules Neuroblastomes " N2A " à Biopharma.

- Accueil et entretien au L N D E R avec les responsables du laboratoire (Dr Nicole Fassi Fehri, et Khadija Id Sidi Yahia) et avec le Professeur M. Fassi Fehri (Chef du Département de Microbiologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II). Remise de trousses de réactifs de contrôle des antigènes et des anticorps de la rage (tests " I F " et tests " E I A ") ainsi que de " kits " d'envoi de prélèvements fabriqués à Nancy.

Après-midi

• Retour à " Biopharma " et accueil par le Dr M. Bakkali, Directeur.

• Exposé par les responsables de Biopharma et du L N D E R des résultats du contrôle des lots expérimentaux de vaccins déjà produits en 1987. Discussion de ces résultats et proposition d'amélioration de la production et du contrôle ainsi que d'un plan et d'un calendrier de travail, dans le cadre de la coopération bilatérale ou avec l'Organisation Mondiale de la Santé (O M S), notamment dans le cadre de la prochaine mission du Dr Reculard.

Mercredi 20 Janvier : *Matinée* : Exposé illustré sur les techniques et les réglementations actuelles en matière de contrôle des vaccins de la rage animale avec le Directeur et les chefs de services responsables de Biopharma, du L N D E R et du Laboratoire d'Analyses et de Recherches Vétérinaires de Rabat (L A R V R).

Après-midi : Complément d'information sur le contrôle des vaccins aux responsables du L N D E R et du L A R V R. Etude de deux dossiers techniques sur trois cas de rupture d'immunité post-vaccinale chez le Chien et sur les études écologiques de la population canine au Maroc (projet de thèse de M. Fayda).

Jeudi 21 Janvier : *Matinée*

• Accueil et entretien au L A R V R avec le Dr M. Rhannam, Directeur, le Dr A. Grini responsable du contrôle des vaccins de la rage et le Dr F. Bertin.

• Retour à la Direction de l'Elevage et entretien avec le Dr Fikri représentant le Dr A. El'Hafi , Directeur.

Après-midi

• Réunion de travail au L N D E R avec les responsables du Laboratoire et le Dr M. El Harak.

• Entretien avec M. Manno, représentant le Conseiller Culturel et de la Coopération Scientifique et Technique français au Maroc, avec le Dr Bertin et N. Fassi Fehri.

Vendredi 22 Janvier : Voyage Rabat - Casablanca - Paris (par vol AT 780) - Nancy.

3. RESULTATS

Ils concernent deux domaines différents.

CONTROLE DES VACCINS DE LA RAGE

1. Situation actuelle

Le contrôle de vaccins de la rage au Maroc s'exerce, actuellement, à deux niveaux :

• *Sur les produits finis* déjà autorisés sur le marché international et importés au Maroc, le contrôle d'activité est effectué par le test des National Institutes of Heath (N I H) ou Pharmacopée Européenne, dans des Laboratoires d'Etats étrangers (Belgique, France, Suisse) à la demande du M A R A.

• *Sur les lots expérimentaux produits à Biopharma* (et non encore autorisés sur le marché). Les contrôles en cours de fabrication (titrage du virus avant inactivation) ou après inactivation sont effectués à Biopharma, ou au L N D E R, et/ou dans des laboratoires étrangers. Deux lots de vaccins produits en 1987 m'ont été remis pour titrage à Nancy.

2. Situation à venir - Propositions

A partir de 1988, les besoins du Maroc en matière de contrôle des vaccins de la rage devraient évoluer quantitativement et qualitativement. Il faudra alors distinguer deux cas différents.

(a) *Cas des vaccins déjà autorisés sur le marché international*

Ces vaccins continuent à être achetés par le Maroc pour les besoins du programme national de lutte contre la rage. Il est souhaitable qu'ils puissent être contrôlés pour s'assurer de leur conformité à l'appel d'offre. Ce contrôle qui ne peut être indéfiniment demandé à des Laboratoires d'Etats étrangers pourrait être assez rapidement assuré, au Maroc, par les Laboratoires du M A R A (L N D E R/ et/ou L A R V R) avec l'appui technique de Biopharma si nécessaire. Deux conditions devraient cependant être remplies pour cela :

- qu'il existe un volume suffisant de lots à contrôler (vaccins importés et/ou lots expérimentaux de " Biopharma ") justifiant l'existence et assurant la valeur d'un service spécialisé.
- que le (s) laboratoire (s) de contrôle dispose (nt) du matériel nécessaire pour les tests " in vitro " et " in vivo ", et surtout d'un approvisionnement régulier en souris "Swiss " répondant aux recommandations de l'O M S (1973).

Les tests à effectuer concerneraient alors uniquement l'innocuité, la stérilité et l'activité sur souris de chaque lot contrôlé.

(b) *Cas des vaccins produits par Biopharma, non encore autorisés sur le marché**

En vue de la délivrance d'une autorisation de mise sur le marché - A M M - , les contrôles des vaccins antirabiques sur l'espèce cible (sérologie, épreuve), sont beaucoup plus lourds que les contrôles lot par lot des vaccins déjà autorisés sur le marché (innocuité, stérilité et activité sur souris). Ils sont vivement recommandés par les textes internationaux (O M S) et souvent imposés par les réglementations nationales (Europe - U S A). Mais ils sont surtout utiles au producteur comme argument de la qualité (innocuité - efficacité - performance) du produit qu'il va proposer sur le marché national ou international.

Les détails de ces contrôles ont été exposés aux cours des réunions techniques des 19, 20 et 21 Janvier et rassemblés dans un dossier complet de 20 notes documentées remises à " Biopharma " le 20 Janvier. Ils peuvent être ainsi réumés :

- niveau minimum du contrôle : titrages sérologiques effectués à partir de prélèvements de sang réalisés 1, 6, 12, 24 ou 36 mois après vaccination de 10 à 20 animaux de l'espèce cible. Les titres moyens d'anticorps doivent être > 0,5 U I/ml de sérum (par la méthode de titrage sur souris).
- niveau optimum : épreuve virulente de 10 animaux vaccinés et 10 témoins non vaccinés de l'espèce cible 1, 12, 24 ou 36 mois** après vaccination, selon la valeur estimée des vaccins. Au moins 80 % des vaccinés doivent résister et 80 % des témoins doivent mourir.

Ceci nécessite donc ,soit la prévision d'une infrastructure appropriée d'animalerie, la formation d'un personnel spécialisé et l'obtention d'animaux d'expériences au Maroc, soit la recherche d'une " sous traitance " auprès d'un Laboratoire spécialisé étranger.

---

* La réglementation d'autorisation de mise sur le marché n'est pas encore en vigueur au Maroc, mais devrait s'inspirer des recommandations internationales O M S/O I E en ce qui concerne le vaccin de la rage animale.

** Des résultats favorables de la sérologie ou de l'épreuve un mois après vaccination permettent dans la plupart des réglementations nationales, la délivrance d'une A M M aux vaccins qui ne revendiquent qu'une durée d'immunité de une année.

AUTRES SUJETS ETUDIES

Au cours de ma mission, plusieurs autres sujets ont été abordés avec les responsables du M A R A, notamment :

1. Epidémiologie et prophylaxie de la rage au Maroc

D'après le Dr Fikri, l'exécution du programme national de lutte contre la rage se poursuit selon le plan prévu en 1985, à savoir :

- *En 1986 :* Actions de prophylaxie sanitaire uniquement dans les provinces de Rabat et Casablanca.

- *En 1987 :* Extension de cette prophylaxie sanitaire aux 5 provinces voisines et actions de prophylaxie médicale débutant à Rabat et Casablanca. Malgré les efforts consentis (importation de vaccins) la couverture vaccinale des chiens ne semble pas avoir atteint 70 %.

- *En 1988 :* Extension des actions de prophylaxie sanitaire à 13 autres provinces voisines des 7 précédemment traitées. Poursuite des actions de prophylaxie médicale. Une aide technique sera demandée à Nancy, par l'intermédiaire de l'O M S, pour le contrôle des vaccins importés en vue de la campagne 1988 ainsi que pour la formation d'un spécialiste de la prophylaxie sanitaire.

2. Rupture d'immunité post-vaccinale chez les Chiens au Maroc

Trois cas bien documentés de rupture d'immunité confirmée, après plusieurs vaccinations à l'aide de vaccins importés, ont été rappportés. Une des souches isolées d'un animal mort de rage malgré une pluri-vaccination annuelle a été rapportée à Nancy pour étude approfondie et recherches éventuelles des causes des échecs de vaccination.

CONCLUSION

1. Concernant la production de vaccins antirabiques à Biopharma

Nous ne pouvons que reprendre les conclusions de notre mission du 30 Juin 1986, à savoir : " que la technologie de production des vaccins antirabiques sur cultures cellulaires apparaît comme un choix raisonnable au Maroc, ayant toute chance de réussir dans un proche avenir (...) vu les conditions d'infrastructure générale , d'équipement, de financement, de fonctionnement, de formation et d'encadrement des personnels qui apparaissent, actuellement, parmi les meilleures d'Afrique ".

2. Concernant le contrôle des vaccins de la rage importés ou produits au Maroc

Ces contrôles devraient être réalisés dès que possible, et de façon indépendante, par les services du M A R A :

(a) *Dans le cas des vaccins importés* (déjà autorisés sur le marché international), les tests de stérilité, d'innocuité et d'activité (N I H), lot par lot, peuvent d'ores et déjà être réalisés au L. N D E R avec l'aide matérielle de Biopharma (cession de souris Swiss) et sous le contrôle du L. A R V R. Durant une période probatoire de 2 ans ou en cas de difficultés ultérieures éventuelles, un second contrôle peut être réalisé, sur les mêmes lots, par le Centre Collaborateur de l'O M S à Nancy. Ce dernier fournira les vaccins de référence nécessaires pour les contrôles réalisés au Maroc.

(b) *Dans le cas des vaccins produits par Biopharma*, la procédure de contrôle lot par lot peut être la même que pour les vaccins importés, une fois qu'ils seront autorisés sur le marché. Par contre, pour obtenir cette autorisation, ou l'obtenir " a posteriori ", si une telle autorisation n'était pas encore exigée par la réglementation marocaine au momentde la présentation officielle de produits , les procédures seront plus lourdes. Si les vaccins " Biopharma " veulent être valablement considérés comme l'équivalent des meilleurs vaccins de cultures cellulaires du marché international, ils devront apporter les preuves exigées par les contrôleurs d'Etat américain ou européen les plus sévères. Ces preuves étant longues à réunir (2 à 3 ans), il convient de prévoir, dès maintenant, les moyens de les apporter.

Le Directeur

J. BLANCOU