

Conservation du vaccin antipéripleurmonique lyophilisé, souche KH₃J Sr⁺

par J. DOMENECH (*), C. HOSTE (**), et M. VIGIER (*)
(Veterinary Institute, DEBRE-ZEIT, ETHIOPIE)

RÉSUMÉ

Une expérience de conservation d'un vaccin antipéripleurmonique lyophilisé, souche KH₃J Sr⁺, aux températures usuelles, a été menée avec, au total, le titrage de quelque 700 flacons, à raison d'une mesure par flacon.

Un aussi grand nombre de données a été jugé nécessaire pour pouvoir effectuer une analyse statistique des résultats car le problème essentiel de ce genre d'étude réside dans l'importance des écarts entre les résultats des différentes numérations.

INTRODUCTION

La péripleurmonie bovine est une maladie sévissant dans de nombreux pays africains en voie de développement. Les programmes d'éradication par des mesures sanitaires strictes étant actuellement trop coûteux pour être menés à bien, c'est vers la vaccination massive qu'on doit, dans un premier temps, se tourner ; elle aboutit à une disparition des foyers épizootiques, et à une baisse progressive des porteurs de germes par la réforme des animaux âgés.

De nombreux vaccins ont été proposés (11), mais les présentations sous forme lyophilisée semblent les mieux adaptées aux conditions africaines tropicales (8, 11).

Les résultats obtenus dans la conservation de ces vaccins sont variables suivant les procédés de lyophilisation (4, 9), et selon les souches employées ; aussi avons-nous cherché à connaître quelle est celle du vaccin souche KH₃J produit dans notre laboratoire et utilisé dans le cadre de la campagne conjointe contre la peste bovine (JP 15, PC 15).

L'interprétation statistique des résultats expérimentaux nous permet également d'envisager l'importance des divers facteurs en cause et de discuter la méthodologie à suivre dans ce type d'étude.

I. VACCIN UTILISÉ

— Souche KH₃J Sr⁺, à son 90^e passage, choisie pour sa parfaite innocuité.

— La culture a lieu en milieu F 66 de PROVOST (5), la digestion papaïnique de cœur de bœuf remplaçant sa simple macération (6, 15).

Les cultures, avant lyophilisation, ont des opacités de 15 à 25 (mesurées au photomètre de VERNES, BRICQ et CONSTANT), un pH variant de 6,7 à 7,3 (70 p. 100 des lots ont un pH supérieur à 7), et un titre en mycoplasmes viables de 5 à 20.10⁹ par ml.

— Lyophilisation : la culture est mélangée à du lait écrémé en poudre (40 g par l) comme agent protecteur (2). 3,5 ml de suspension, lyophilisés dans un flacon de 20 ml, constitueront 100 doses.

Le lyophilisateur est un appareil SOGEV-FROILABO, à pompe à palette, et condenseur dans la même enceinte que les produits à lyophi-

(*) Veterinary Institute et Mission Vétérinaire Française en Ethiopie. P. O. Box 19. Debre-Zeit, Ethiopie.

(**) Centre International pour l'Élevage en Afrique (CIPEA), P. O. Box 5689. Addis Ababa, Ethiopie.

liser. La température du piège est de -60 à -70 °C, le vide obtenu de 2 à $3 \cdot 10^{-2}$ mm Hg.

La lyophilisation primaire dure environ 14 h, et se termine à -25 , -35 °C.

La durée de post-lyophilisation, à 37 °C, est de 18 à 20 h.

— Produit fini :

- humidité résiduelle (KARL FISHER) de 1 à 1,5 p. 100 ;

- le pourcentage de pertes en germes viables durant la lyophilisation atteint 60 à 65 p. 100, mais peut descendre parfois jusqu'à 50 p. 100. Les titres obtenus, compte tenu du fait que 100 doses proviennent de 3,5 ml de culture, sont de 5 à $30 \cdot 10^7$ mycoplasmes viables par dose vaccinale ;

- ce vaccin, remis en suspension dans un diluant physiologique bicarbonaté, ou en solution molaire de sulfate de magnésium (12), reste stable pendant 4 heures au moins, à 4°, 28° et 37 °C. L'utilisation d'eau distillée provoque, en revanche, une diminution des mycoplasmes vivants trop rapide pour que ce procédé soit utilisable dans les conditions pratiques du travail en milieu africain.

II. MÉTHODES UTILISÉES

1. Schéma expérimental

Dans chacun des 7 lots étudiés, 90 flacons ont été pris au hasard. 10 ont été utilisés pour connaître le titre après lyophilisation. Pour les lots n° 1 et 2, on a ensuite placé 40 flacons à $+4$ °C (chambre froide) et 40 flacons à 46 °C (bain-marie). Pour les lots n° 3 à 7, 40 flacons ont été mis à $+28$ °C (température ambiante) et les 40 autres à $+37$ °C (étuve).

2. Technique de numération des mycoplasmes

— Pour les 7 lots étudiés, on opère sur une dose vaccinale (pastille lyophilisée mise en suspension dans 100 ml de solvant physiologique bicarbonaté, et numération de 1 ml).

— Numération par la méthode du MOST PROBABLE NUMBER (M. P. N.) de TAYLOR (14).

Pour chaque lot, et à chaque temps donné, on effectue 1 numération par flacon, et ce sur 10 flacons.

— Le milieu utilisé est celui de MAC LEOD, variante de GOURLAY (3), car il est facile à

préparer, de composition constante, et donne depuis longtemps entière satisfaction pour les essais effectués sur les vaccins produits dans notre laboratoire.

3. Analyse statistique des résultats

Selon les méthodes statistiques habituelles, telles qu'on peut les trouver décrites dans les manuels spécialisés (7, 13) :

- transformation logarithmique des données pour parvenir à une distribution gaussienne ;

- caractère gaussien des données démontré, pour chaque lot, et chaque température, par le tracé des droites de HENRY et le calcul de leur coefficient de corrélation (r) ;

- étude des facteurs temps, température et lot, ainsi que leurs interactions, par l'analyse factorielle, avec 10 répétitions (10 numérations par condition expérimentale) ;

- test de BARLETT, ou test d'homogénéité des variances, pour comparer les variances obtenues, sur un lot et une température donnés, à tous les temps, et celles obtenues à un temps et une température donnés, sur tous les lots ;

- droites de régression selon la formule $y = a - bx$ pour estimer les variations du titre $y(\log)$ en fonction du temps x . Les coefficients de corrélation r de ces droites ainsi que l'amplitude de variation des pentes b sont également calculés.

III. RÉSULTATS

1. Caractère gaussien des données

Les tableaux I, II, III et IV, qui donnent pour chaque temps, température et lot la moyenne arithmétique des titres $\log y$ et l'erreur sur la

moyenne $s_{\bar{y}} = \left(\frac{s_y}{\sqrt{n}} \right)$, montrent combien les numérations peuvent être variables.

Malgré cela, on peut prouver le caractère gaussien des données en construisant les droites de HENRY de chaque lot. L'alignement des points est en effet suffisamment correct et les coefficients de corrélation (r) de ces droites sont toujours hautement significatifs (tabl. V).

2. Homogénéité des variances

Le test de BARTLETT a été utilisé pour comparer les variances obtenues dans les 10 numérations pour chaque lot, à chaque temps de

l'expérience et à toutes les températures. Les 24 tests réalisés s'avèrent non significatifs à 2 exceptions près (cas du lot n° 3 à 37 °C et du lot n° 7 à 28 °C).

3. Conservation du vaccin

Le tableau V présente les éléments nécessaires pour juger la régression du titre des vaccins placés aux différentes températures et notamment :

- valeur des droites $y = a - bx$ et leur coefficient de corrélation (r) ;
- demi-vie de chaque lot, calculée à partir de la pente b :

- 4° : 29 et 41 semaines,
- 28° : 2,8 ; 2,9 ; 3,1 ; 3,4 ; et 4,6 semaines,
- 37° : 1,6 ; 1,7 ; 2,4 ; 2,8 et 3,8 semaines,
- 46° : 4,1 et 4,3 jours ;

— erreur sur la pente (b) ($= s_b$), et amplitude de la demi-vie qui en découle ;

— délai au bout duquel on atteint le titre de 10^7 germes par dose vaccinale, qui varie selon la pente de la droite de régression et selon le titre de départ.

Les variations des titres des vaccins en fonction du temps pour les différentes températures expérimentales sont représentées graphiquement (fig. I à VI).

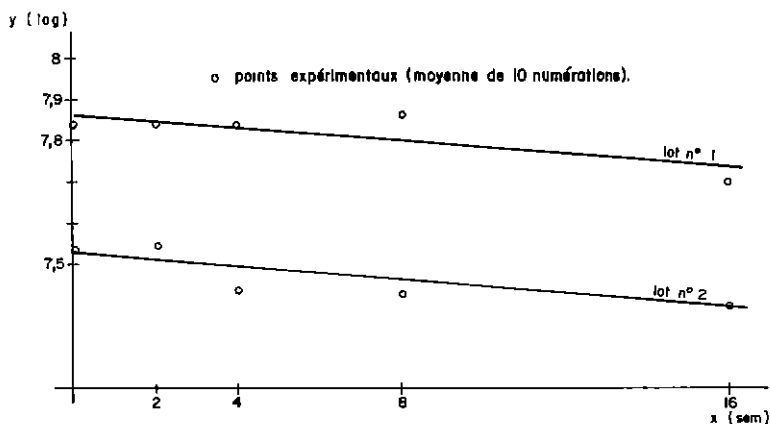


Figure I - Droites de regression des lots n° 1 et 2 à + 4° C .

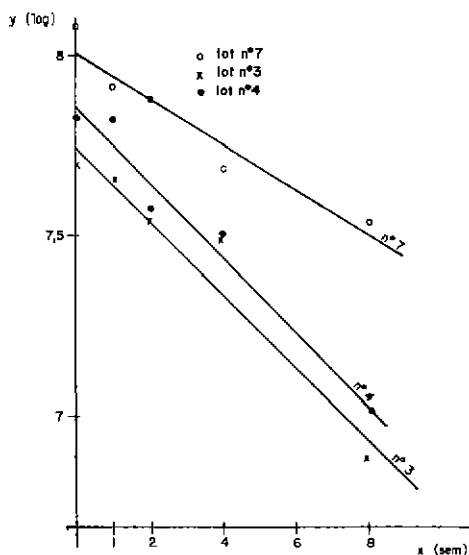


Figure II - Droites de regression des lots n° 3, 4 et 7 à + 28° C .

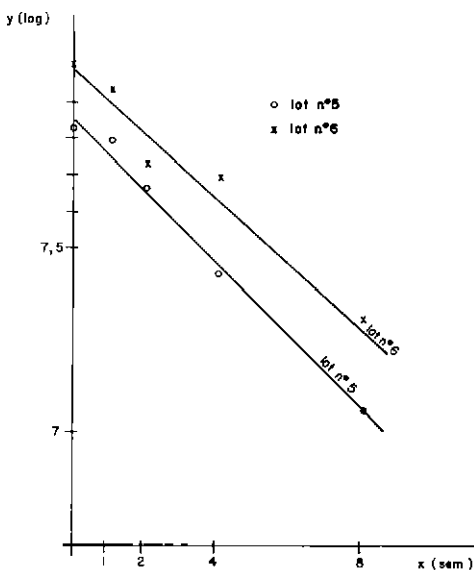


Figure III - Droites de regression des lots n° 5 et 6 à + 28° C .

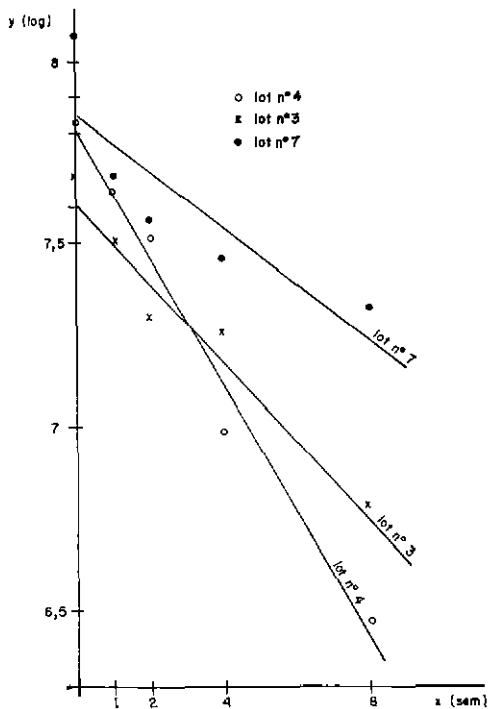


Figure IV - Droites de regression des lots n°3, 4 et 7 à 37°C.

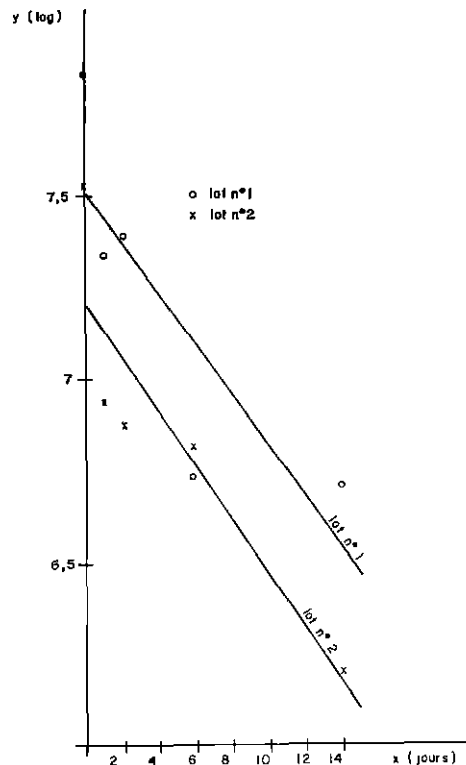


Figure VI - Droites de regression des lots n°1 et 2 à 46°C.

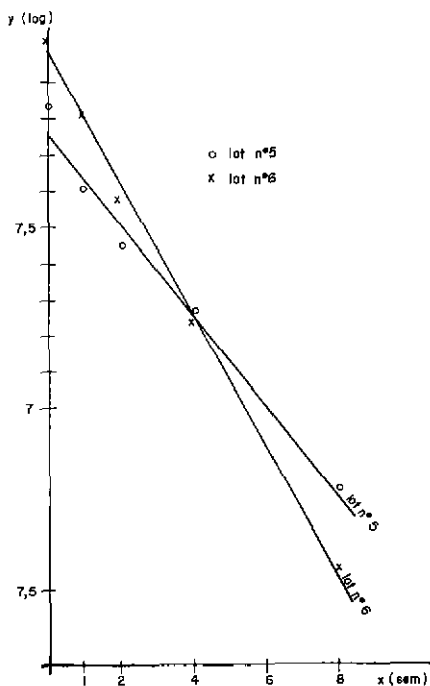


Figure V - Droites de regression des lots n°5 et 6 à 37°C

4. Analyse des facteurs

Le tableau d'analyse de la variance (tabl. VI) résume l'étude du plan factoriel pour les lots n° 3, 4, 5, 6 et 7 conservés à 28 et 37 °C.

On peut observer un effet temps, un effet température et un effet lot, ainsi qu'une interaction temps/température et temps/lot.

L'interaction lot/température n'est pas significative, de même que l'interaction de 2^e ordre temps/température/lot.

IV. DISCUSSION

1. Fiabilité des numérations

Les tableaux I à IV permettent de mettre en évidence la variabilité des résultats.

En effet, on peut calculer les deux valeurs extrêmes entre lesquelles 95 p. 100 des valeurs y (titre log) sont comprises, soit : $\bar{y} \pm t_{0,05} \cdot S_y$, ou encore $\bar{y} \pm 2,26 Sy/\sqrt{10}$.

Ces deux valeurs extrêmes sont telles que l'on peut dire que les titres varient, en général, du simple au décuple.

TABL. N°I-Moyennes (\bar{y} (1)) et erreurs sur la moyenne ($s_{\bar{y}}(2) = \frac{s_y(3)}{\sqrt{n}(4)}$) pour les lots n°1 et 2 conservés à +4°C.

Lot \ Temps	0	2 semaines	4 semaines	8 semaines	16 semaines
n°1	7,828 ± 0,090	7,845 ± 0,071	7,847 ± 0,069	7,876 ± 0,048	7,713 ± 0,079
n°2	7,535 ± 0,049	7,595 ± 0,065	7,438 ± 0,047	7,419 ± 0,053	7,397 ± 0,073

(1) \bar{y} = moyennes des 10 mesures effectuées à chaque temps.

(2) $s_{\bar{y}}$ = erreur sur la moyenne \bar{y}

(3) s_y = écart type des valeurs y

(4) n = nombre de mesures effectuées à chaque temps (= 10).

 TABL. N°II-Moyennes (\bar{y}) et erreurs sur la moyenne ($s_{\bar{y}}$) pour les lots N°3, 4, 5, 6 et 7 conservés à + 28°C.

Lot \ Temps	0	1 semaine	2 semaines	4 semaines	8 semaines
n°3	7,697 ± 0,102	7,673 ± 0,078	7,556 ± 0,094	7,506 ± 0,113	6,885 ± 0,150
n°4	7,842 ± 0,085	7,835 ± 0,076	7,583 ± 0,096	7,507 ± 0,104	7,019 ± 0,089
n°5	7,830 ± 0,126	7,788 ± 0,125	7,662 ± 0,102	7,439 ± 0,140	7,082 ± 0,113
n°6	8,008 ± 0,126	7,948 ± 0,096	7,743 ± 0,143	7,597 ± 0,157	7,322 ± 0,142
n°7	8,089 ± 0,082	7,913 ± 0,106	7,877 ± 0,069	7,692 ± 0,178	7,542 ± 0,065

 TABL. N°III-Moyennes (\bar{y}) et erreurs sur la moyenne ($s_{\bar{y}}$) pour les lots n°3,4,5,6 et 7 conservés à 37°C.

Lot \ Temps	0	1 semaine	2 semaines	4 semaines	8 semaines
n°3	7,697 ± 0,102	7,514 ± 0,034	7,306 ± 0,093	7,268 ± 0,115	6,798 ± 0,078
n°4	7,842 ± 0,085	7,656 ± 0,074	7,525 ± 0,072	6,987 ± 0,108	6,471 ± 0,108
n°5	7,830 ± 0,126	7,606 ± 0,109	7,449 ± 0,129	7,267 ± 0,129	6,780 ± 0,153
n°6	8,008 ± 0,126	7,815 ± 0,146	7,580 ± 0,103	7,238 ± 0,174	6,560 ± 0,057
n°7	8,089 ± 0,082	7,693 ± 0,072	7,569 ± 0,107	7,473 ± 0,097	7,331 ± 0,117

 TABL. N°IV-Moyennes (\bar{y}) et erreurs sur la moyenne ($s_{\bar{y}}$) pour les lots n°1 et 2 conservés à 46°C.

Lot \ Temps	0	1 jour	2 jours	6 jours	14 jours
n°1	7,828 ± 0,090	7,338 ± 0,157	7,398 ± 0,136	6,733 ± 0,070	6,715 ± 0,142
n°2	7,535 ± 0,049	6,940 ± 0,091	6,881 ± 0,092	6,828 ± 0,069	6,203 ± 0,096

De l'observation des titres expérimentaux, nous tirons les mêmes conclusions.

On ne peut, *a priori*, expliquer ces écarts par la seule hétérogénéité des lots, car il faudrait alors accepter que les pertes durant la lyophilisation passent du simple au décuple selon les flacons.

Par ailleurs, une expérience complémentaire a montré que 10 numérations effectuées sur un seul flacon, ou même sur une culture avant lyophilisation nous donnent des résultats aussi étalés que ceux de notre expérience (pour laquelle on a fait une numération par flacon, sur 10 flacons).

L'utilisation d'un milieu plus riche, tel le

milieu F 66 de PROVOST (5), ou celui préconisé par l'A. M. R. C. d'AARHUS (Danemark) (4), ne résout pas ce problème.

Cette irrégularité dans les résultats est d'ailleurs bien connue des expérimentateurs travaillant sur les mycoplasmes (3, 10). L'élément causal majeur semble être la présence d'agglomérats de germes, visibles à l'examen des cultures, et qui rendent les suspensions éminemment hétérogènes.

Ces faits imposent donc que, dans ce genre d'étude, et avec la technique utilisée ici, on effectue un nombre suffisant de numérations, ce qui alourdit malheureusement d'autant l'expérimentation.

2. Homogénéité des lots

Ayant choisi, pour protocole, d'effectuer une seule mesure par flacon, nous sommes limités dans l'appréciation des différences qui existent entre les flacons, et nous ne pouvons donc tirer de conclusions définitives sur l'homogénéité de nos lots.

Toutefois, les tests de BARTLETT entrepris, permettent de considérer les variances des lots comme homogènes. Cela peut s'expliquer de deux façons :

— chaque lot est rigoureusement homogène, et la variance n'est due qu'à la technique de numération ;

— les lots ne sont pas homogènes, c'est-à-dire que les titres sont, au sein de chaque lot, différents selon les flacons ; mais cette part de variance, due à l'hétérogénéité des lots est alors similaire pour tous les groupes de 10 flacons étudiés (et elle s'ajoute à la variance due à la technique de numération).

Afin de lever cette indétermination, une expérience complémentaire a été menée, qui sera publiée prochainement.

3. Conservation du vaccin

a) Droites de régression :

La représentation graphique des points expérimentaux suggère le plus souvent une régression linéaire du titre, en fonction du temps, de formule $y = a - bx$ (fig. I à VI). Mais, dans certains cas (lot n° 7 à 37 °C, ou lot n° 1 à 46 °C), il s'agirait plutôt d'une curviligne.

Aussi avons-nous essayé de traduire le phé-

nomène, pour chaque lot, par des formules du type :

$$y = a - b_1 x + b_2 x^2,$$

ou bien

$$y = (a).(b^{-x}).$$

Les résultats ne sont, dans l'ensemble, pas meilleurs que ceux obtenus en utilisant la droite simple $y = a - bx$.

Nous ne pensons néanmoins pas que l'expérience soit suffisamment précise pour pouvoir exclure l'hypothèse d'une régression curvilinéaire des titres (log) en fonction du temps.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nous calculerons donc les chutes des titres (log) à l'aide de la droite $y = a - bx$.

Les résultats présentés dans le tableau V appellent quelques commentaires :

— la conservation à 4 °C n'est donnée que comme première approximation, car les coefficients de corrélation (r) ne sont pas significatifs, la durée d'observation s'avérant trop courte ;

— à 28 °C, les demi-vies varient de 2,8 à 4,6 semaines mais le temps au-delà duquel le titre est inférieur à 10^7 germes par dose dépasse deux mois ;

— à 37 °C, le lot n° 7 semble se conserver nettement mieux que les autres. Mais il nous faut considérer ce résultat avec prudence car le coefficient de corrélation (r) est à la limite du seuil de signification.

Aussi estimerons-nous que les demi-vies varient de 1,6 à 2,8 semaines, et que le délai au-delà duquel le titre du vaccin est inférieur à 10^7 germes par dose, est de 5 à 6 semaines ;

— à 46 °C, la survie est très limitée, puisque la moitié des germes est tuée en 4 jours.

Il faut donc éviter de placer le vaccin dans des conditions aussi défavorables.

Il faut remarquer que, la majeure partie de notre production titrant actuellement 10^8 mycoplasmes par dose, ou plus, le seuil de 10^7 germes n'est atteint qu'en 9 à 16 semaines si on place le vaccin à 28 °C, 6 à 14 semaines à 37 °C, et 12 à 14 jours à 46 °C (ces valeurs sont calculées à partir des pentes b extrêmes obtenues dans cette expérience).

b) Facteurs de la conservation :

L'étude du plan factoriel (tabl. VI) montre, nous l'avons vu, qu'il y a un effet temps, un effet température, et un effet lot.

TABLEAU N°V-Conservation du vaccin KH₃J Sr+ lyophilisé à 4°, 28°, 37° et 46°C.

Lot	Température	Densité optique	Ph	r ₁ (1)	y = a - bx (2)	r ₂ (3)	s _b (4)	demi-vie (sem.)	Valeurs extrêmes de la demi-vie (5) (sem.)	x pour avoir y = 7 (6) (sem.)
N°1	4°	21	6,9	0,99 ⁺⁺⁺ (7)	7,86 - 0,007x	-0,72° (7)	0,004	41	16,6 à 75	118
N°2	4°	23	6,6	0,98 ⁺⁺⁺	7,53 - 0,010x	-0,77°	0,004	29	12,5 à 100	52
N°3	28°	35	6,6	0,97 ⁺⁺⁺	7,76 - 0,101x	-0,96 ⁺⁺⁺	0,016	2,9	2 à 5	7,5
N°4	28°	43	6,6	0,97 ⁺⁺⁺	7,87 - 0,104x	-0,98 ⁺⁺⁺	0,011	2,8	2 à 4	8,3
N°5	28°	35	6,8	0,96 ⁺⁺⁺	7,85 - 0,097x	-0,99 ⁺⁺⁺	0,004	3,1	2,7 à 3,5	8,7
N°6	28°	14	6,9	0,99 ⁺⁺⁺	7,98 - 0,086x	-0,98 ⁺⁺⁺	0,009	3,4	2,7 à 5	11,3
N°7	28°	26	6,6	0,99 ⁺⁺⁺	8,01 - 0,064x	-0,96 ⁺⁺⁺	0,010	4,6	3,2 à 8,5	15,8
N°3	37°	35	6,6	0,91 ⁺⁺⁺	7,63 - 0,104x	-0,98 ⁺⁺⁺	0,013	2,8	2,1 à 4,1	5,7
N°4	37°	43	6,6	0,99 ⁺⁺⁺	7,82 - 0,175x	-0,99 ⁺⁺⁺	0,014	1,7	1,4 à 2,2	4,7
N°5	37°	35	6,8	0,98 ⁺⁺⁺	7,76 - 0,124x	-0,99 ⁺⁺⁺	0,009	2,4	2 à 3	6,1
N°6	37°	14	6,9	0,99 ⁺⁺⁺	7,98 - 0,180x	-0,99 ⁺⁺⁺	0,005	1,6	1,5 à 1,8	5,4
N°7	37°	26	6,6	0,98 ⁺⁺⁺	7,86 - 0,070x	-0,84 ⁺	0,027	3,8	1,9 à -	11,1
N°1	46°	21	6,9	0,99 ⁺⁺⁺	7,52 - 0,070x	-0,83 ⁺	0,026	4,3 j	2,1 à -	7,5 j
N°2	46°	23	6,6	0,99 ⁺⁺⁺	7,213- 0,070x	-0,89 ⁺	0,045	4,1 j	1,5 à -	3 j

(1) Coefficient de corrélation (r₁) de la droite de Henry ; (2) Temps (x) en semaines (à 4, 28 et 37°) ou en jours (à 46°) ;

(3) Coefficient de corrélation (r₂) de la droite de régression ; (4) Ecart-type de la pente (b) ; (5) Valeurs calculées en fonction de s_b

(6) Temps x pour obtenir 107 mycoplasmes par dose vaccinale ; (7) Degré de signification : cf tableau VI

TABLEAU N° VI

S o u r c e	SC (1)	ddl (2)	CM (3)	F (4)
Effet principal				
Température	5,599	1	5,599	45,5 ⁺⁺⁺
Temps	50,152	4	12,538	101,9 ⁺⁺⁺
Lot	7,437	4	1,859	15,1 ⁺⁺⁺
Intéraction 1°				
Temps/température	2,093	4	0,523	4,2 ⁺⁺⁺
Temps/lot	3,387	16	0,211	1,7 ⁺
Lot/température	0,340	4	0,085	0,7
Intéraction 2°				
Lot/temps/température	1,730	16	0,108	0,88
Résiduelle	55,333	450	0,123	
Total	126,074			

(1) SC = somme des carrés ; (2) ddl = degré de liberté ; (3) CM = carré moyen ;

(4) F de SNEDECOR et seuil de signification : ° non significatif ; + 0,02 < P < 0,05 ;
 ++ 0,01 < P < 0,02 ; +++ P < 0,01.

L'examen des interactions permet de préciser l'effet lot, et ceci est important car, si l'action de la température et du temps sur le titre était prévisible, celle du facteur lot l'était moins ; nous pouvions en effet espérer que la régression du titre des vaccins serait la même pour tous les lots.

— L'interaction temps/lot est significative : les titres des lots varient différemment, en fonction du temps, et quelle que soit la température. Il s'agit ici d'une véritable comparaison des pentes des droites de régression, sans considération du titre de départ de chaque lot. Par ailleurs, une analyse de variance complémentaire effectuée sur les 7 lots, après lyophilisation, montre que les 7 titres de départ sont différents.

De même, l'analyse de covariance, pour les lots n° 7 et 4 à 28 °C, et n° 3 et 6 à 37 °C (qui sont les lots les meilleurs et les plus mauvais, pour chacune de ces températures), confirme ce qui vient d'être dit : les pentes (b) et les titres après lyophilisation (a), sont significativement différents.

On peut donc conclure que les lots n'ont ni un titre de départ, ni une conservation identiques : ceci nous interdit de les mélanger et de donner une droite de régression moyenne pour toute la production.

— L'interaction temps/température est significative : les températures n'ont pas, en fonction du temps, des effets analogues sur les titres. C'est-à-dire que l'action léthale de la température ne semble pas être la même à tous les temps

de l'expérience. Ceci peut plaider en faveur du phénomène biologique d'expression curvilinéaire dont nous avons parlé précédemment.

— L'interaction température/lot n'est pas significative : les titres des lots varient de façon analogue, en fonction de la température, et ce quelque soit le temps ; c'est-à-dire que la différence de conservation, à 28 et 37 °C, est du même ordre pour tous les lots.

En conclusion, l'étude de ces facteurs, qui met, notamment, en évidence une conservation plus ou moins bonne selon les lots, nous permet de prévoir que la source de variation se situe vraisemblablement au niveau de la lyophilisation elle-même.

En effet, cette conservation ne dépend ni du PH ou de la densité optique de fin de culture, ni du titre du produit après lyophilisation (tabl. VI) ; de plus, la souche et le diluant protecteur ont été constants dans toute l'expérience.

C'est donc sur la conduite de la lyophilisation que nous devons intervenir pour essayer d'améliorer nos vaccins.

V. CONCLUSION

— Cette expérience sur la conservation du vaccin lyophilisé KH₃J est, à notre avis, intéressante car elle met bien en évidence les problèmes qui se posent lorsqu'on veut effectuer des numérations de mycoplasmes vivants.

Les protocoles expérimentaux doivent tenir

compte de cet élément essentiel qu'est la variation dans les résultats des titrages : il est indispensable d'effectuer un nombre suffisant de mesures pour avoir une idée correcte sur la conservation des vaccins.

— Les résultats présentés ici sont analogues à ceux obtenus dans d'autres laboratoires. Ils nous permettent de donner des directives pratiques aux utilisateurs : garder le vaccin sous froid chaque fois que cela est réalisable, mais possibilité de transport sans glace, à partir des centres de vaccination, pendant 3 semaines environ, si la température n'excède pas 25 à 30 °C.

— La mise en évidence des écarts qui existent dans la conservation des différents lots nous fait envisager quel sera le programme de nos futurs travaux : étude des facteurs qui influencent la thermorésistance des mycoplasmes, avec en particulier l'intensité de la dessiccation, appréhendée par la mesure de l'humidité résiduelle contenue dans le produit déshydraté.

Nous espérons ainsi pouvoir augmenter la valeur des vaccins anti-péritumoniques lyophilisés.

VI. ADDENDUM

Une seconde expérience a été menée, avec pour objectif l'étude de diverses techniques de numération et de l'homogénéité des lots.

Les protocoles expérimentaux sont, dans ce cas, différents de ceux utilisés dans le travail présenté précédemment : 6 numérations par flacon, sur 3 flacons à chaque temps donné, et conservation à 37 °C seulement.

Les droites de régression, pour les deux lots en cause, confirment les résultats exposés ci-dessus : demi-vies de, respectivement, deux et trois semaines.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Services Vétérinaires Ethiopiens, en la personne du Docteur FIKRE YOSEPH, Directeur du Veterinary Institute de Debré-Zeit, de nous avoir fourni le matériel nécessaire à cette étude, ainsi que Messieurs les assistants ALEMAYOU FEYESSA, TESFAYE YENADOU et BEKOURE KIDANNE pour leur aide technique.

Nous sommes également très reconnaissants à Monsieur P. PERREAU, Chef du Service de Microbiologie de l'I. E. M. V. T. (Maisons-Alfort, France), pour les conseils qu'il nous a prodigués, ainsi qu'à M. L. MASSE, Professeur à l'Ecole de Santé Publique de Rennes (France), pour l'aide déterminante qu'il nous a apportée dans l'étude statistique des résultats expérimentaux.

SUMMARY

Conservation of the lyophilised CBPP vaccine KH₃J Sr+

An experience on the conservation of the lyophilised C. B. P. P. vaccine KH₃J strain, with the usual temperature, has been carried out, with the titration, in the end, of some 700 bottles, with one measure per bottle.

The great number of data obtained allows a detailed statistic analysis of the results, and puts to evidence the problems occurring in this kind of study, which are bound essentially to the fact that numeration are very variable.

The fall of the title (title log.) of our vaccine can be expressed, as a first approximation, by a $(y = a - bx)$ formula; but nevertheless, the hypothesis that the biological phenomenon might be of curvilinear type, cannot be excluded.

The main conclusions on this vaccine conservation can be shown by the different values of the half-lives obtained :

- from 30 up to 40 weeks at + 4 °C,
- from 3 to 4 weeks at - 28 °C,
- from 1,5 to 3 weeks at + 37 °C,
- 4 days at + 46 °C.

In the case of a production titrating 10⁸ viable mycoplasmas per doses, the delay at the end of which 10⁷ germs are reached, is of 2 to 4 months at + 28 °C, 1,5 to 3 months at + 37 °C, and 12 to 14 days at + 46 °C.

RESUMEN

Conservación de la vacuna antiperineumonica liofilizada, cepa KH₃J Sr+

Una experiencia para conservar vacunas antiperineumonicas liofilizadas, cepa KH₃J Sr+, a temperaturas usuales, ha sido efectuada, con un total de 700 frascos medidos, a razón de una medida por frasco.

Este gran número de datos es necesario para poder efectuar un análisis estadístico de los resultados : pues el problema esencial de este género de estudios está basado en la importancia de las desviaciones entre los resultados de las diferentes numeraciones.

La regresión de las medidas (log.) de nuestras vacunas puede traducirse, en una primera aproximación, por una recta de formula $y = a - bx$, pero no podemos excluir la hipótesis que el fenómeno biológico sea más bien de tipo curvilíneo.

Las principales conclusiones sobre la conservación de dicha vacuna, KH₃J liofilizada, pueden expresarse por medio de los diferentes valores de las vias-medias obtenidas, o sea :

- 30 a 40 semanas a una temperatura de + 4 °C,
- 3 a 4 semanas a una temperatura de + 28 °C,
- 1,5 a 4 semanas a una temperatura de + 37 °C,
- 4 días a una temperatura de + 46 °C.

En el caso de una producción medida del orden de 10⁸ micoplasmas viables por dosis, el plazo al final del cual se alcanzan 10⁷ germen es de 2 a 4 meses a una temperatura de + 28 °C, 1,5 a 3 meses a una temperatura de + 37 °C, y de 12 a 14 días a una temperatura de + 46 °C.

BIBLIOGRAPHIE

1. BALIS (J.), CAISEY (P.). Communication personnelle.
2. DOUTRE (M. P.). Valeur de l'immunité conférée par deux vaccins lyophilisés préparés à l'aide des souches KH₃J et T₁, XXXVII^e Session Générale du Comité O. I. E., 19-24 mai 1969, Paris, France.
3. HUDSON (J. R.). La péripneumonie contagieuse des bovidés. Rome, F. A. O., 1972 (Etudes agricoles de la F. A. O., n° 86) 131 p.
4. I. E. M. V. T., Rapport d'activité, 1973, p. 48.
5. I. E. M. V. T., Laboratoire de Farcha, Tchad, Rapport d'activité 1966, 2, p. 100.
6. Imperial Veterinary Institute, Debre-Zeit, Ethiopie. Rapports annuels années éthiopiennes 1964 et 1965 (1971/1972 et 1972/1973).
7. MASSE (L.). Cours de méthodologie statistique pour biologistes et ingénieurs de la santé publique, Rennes, France.
8. O. U. A./F. A. O./O. I. E. Rapport du Sous-Comité du Groupe d'Experts sur la péripneumonie bovine, Lagos, 17-20 juillet 1970.
9. PEARSON (C. W.) et LLOYD (L. C.). Lyophilisation de la souche KH₃J de *Mycoplasma mycoides* Bull. epizoot. Dis. Afr., 1971, 19 (2) : 117-122.
10. PERREAU (P.). Communication personnelle.
11. PROVOST (A.). Prophylaxie et vaccination dans la péripneumonie bovine : évolution des techniques et applications pratiques actuelles. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1974, 27 (2) : 145-161.
12. PROVOST (A.). Activité thermoprotectrice de la solution molaire de sulfate de magnésium sur l'inactivation thermique de *Mycoplasma mycoides* en phase liquide, C. R. Acad. Sci. Paris, 1970, 270 (juin).
13. SNEDECOR (G. W.), COCHRAN (W. G.). Statistical Methods, 6^e éd. Iowa State University Press, U. S. A.
14. TAYLOR. Theory and practice in experimental bacteriology, 1965, p. 204.
15. Veterinary Institute, Provisionnal Military Government. Rapport d'activité année éthiopienne 1966 (1973/1974).