

## CHAPITRE 1.1.9.

# CONTRÔLE DE LA STÉRILITÉ ET DE L'ABSENCE DE CONTAMINATION DES MATÉRIELS BIOLOGIQUES À USAGE VÉTÉRINAIRE

---

### INTRODUCTION

*Les mouvements liés au commerce international de matériel biologique à usage vétérinaire sont sujets à des restrictions imposées afin de minimiser la propagation de pathogènes animaux ou humains. Les pays peuvent exiger des contrôles attestant l'absence de pathogènes avant d'autoriser l'importation réglementée de matériel de provenance animale et de substances contenant ce type de dérivés. Lorsque les traitements physiques sont inappropriés ou inefficaces ou lorsque la preuve de l'efficacité du traitement fait défaut, les autorités des pays importateurs de ce matériel peuvent exiger des contrôles généraux ou spécifiques. Ce chapitre fournit des lignes directrices sur l'approche à adopter pour ce type de contrôles réglementaires, notamment ceux utilisés pour les mouvements de lots de semence initiale et de banques de cellules ainsi que pour le matériel biologique associé utilisé dans les processus de fabrication. Le terme lot de semence primaire est utilisé pour le contrôle des produits vivants, le terme banque de cellules primaires est plutôt réservé aux produits tués. Même si la responsabilité de garantir la biosécurité d'un produit incombe toujours au fabricant et peut être réglementée par des directives thérapeutiques, ce chapitre fournit des procédures spécialement conçues pour minimiser le risque de contaminants non détectés dans les produits thérapeutiques vétérinaires et dans les réactifs biologiques susceptibles de provoquer la propagation transfrontalière d'agents pathogènes dangereux pour certains pays importateurs. Le contrôle de l'absence de contamination par un agent d'encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) n'est pas couvert par ce chapitre du fait que les tests et les traitements physiques existants ne peuvent pas être utilisés pour garantir l'absence de ce type d'agents.*

*La stérilité est définie par l'absence de micro-organismes viables, y compris, au sens du présent chapitre, de virus. Elle sera obtenue par l'emploi de techniques d'asepsie et de méthodes de stérilisation validées telles que chaleur, filtration, traitement chimique et irradiation, en adéquation avec l'objectif visé. L'absence de contamination est définie comme l'absence de micro-organismes spécifiés viables. Elle peut être obtenue en sélectionnant du matériel provenant d'une source indemne de micro-organismes spécifiés et en respectant les techniques d'asepsie pour les étapes ultérieures de la procédure. Une garantie suffisante de la stérilité et de l'absence de contamination ne peut être obtenue que par un contrôle approprié des matières premières utilisées et de leur transformation ultérieure. Des tests des produits en cours de production sont nécessaires pour garantir que ces contrôles soient bien réalisés.*

*Le matériel biologique sujet à contamination et inapte à la stérilisation avant ou pendant son emploi dans la production de vaccins, tels les ingrédients d'origine animale (sérum, trypsine, cellules primaires et continues, lignées de cellules, lots de semence primaire virale ou bactérienne, etc.), feront, avant leur utilisation, l'objet de tests de recherche d'agents viables adventices. Les tests pour détecter une éventuelle contamination virale peuvent être réalisés avec des méthodes de culture cellulaire et de détection des effets cytopathogènes (ECP), avec des techniques d'immunofluorescence ou toute autre méthode appropriée telle que réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) ou technique immuno-enzymatique (ELISA). Comme expliqué plus en détails dans ce chapitre, la prudence est de rigueur avec les techniques de PCR ou d'ELISA puisqu'elles ne permettent pas de faire la distinction entre agents viables et non viables.*

*Pour la détection des virus aviaires, le matériel et les vaccins aviaires doivent être inoculés sur des cultures cellulaires primaires d'origine aviaire ou sur des œufs. Il est recommandé de combiner les*

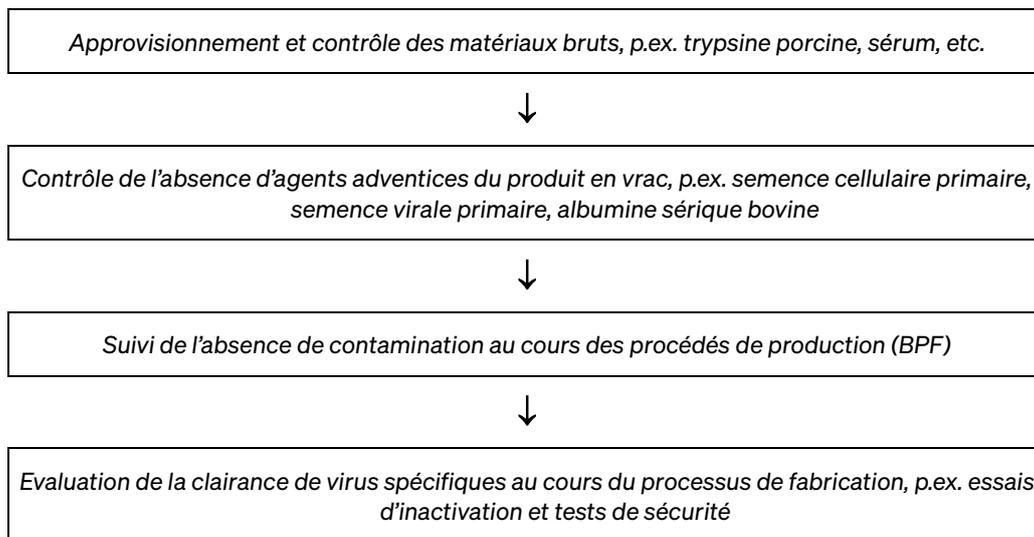
tests généraux destinés par exemple à détecter les virus hémadsorbants, hémagglutinants ou cytopathogènes à des procédures spécifiques dédiées à la croissance et à la détection de virus spécifiques, ceci afin d'augmenter la probabilité de détection. Des tests de détection d'autres contaminants tels que bactéries, champignons, protozoaires, rickettsies et mycoplasmes sont également décrits.

Les procédures utilisées doivent être validées et, dans la mesure du possible, considérées comme « adaptées à l'objectif visé » selon le chapitre 1.1.6 Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses. La responsabilité de garantir que la sélection et le nombre d'échantillons à tester soient représentatifs incombe au demandeur. Les principes de l'Annexe 1.1.2.1 Approche épidémiologique pour l'échantillonnage : calcul de la taille de l'échantillon et du Chapitre 1.1.2 Prélèvement, expédition et stockage des échantillons pour le diagnostic s'appliquent. Les méthodes de transport adéquates sont décrites au Chapitre 1.1.2 et au Chapitre 1.1.3 Transport des échantillons d'origine animale.

## A. APERÇU DES STRATÉGIES DE TESTS

1. Les matières premières doivent être collectées à partir de sources indemnes de contamination et manipulées de sorte à minimiser la contamination et les possibilités de multiplication des contaminants (figure 1).
2. Le matériel non stérilisé et celui qui sera transformé après stérilisation doivent être manipulés de manière aseptique. Ce type de matériel nécessitera un contrôle ultérieur de l'absence de contaminants à différents stades de la production pour garantir l'absence d'agents adventices.

*Figure 1. Algorithme de test pour la production des vaccins.*



3. Le matériel qui peut être stérilisé sans perdre son activité biologique doit l'être par une méthode efficace pour les pathogènes concernés. Cette méthode doit réduire le niveau de contamination à un niveau inférieur au seuil de détection, défini selon un test de stérilité approprié (voir paragraphe D.1. ci-dessous). Si un procédé de stérilisation est utilisé, il doit être validé pour son adéquation au but visé. Des contrôles appropriés doivent être inclus dans chaque processus de stérilisation pour en vérifier l'efficacité.
4. L'environnement dans lequel les manipulations aseptiques sont effectuées doit être maintenu propre, à l'abri des sources de contamination extérieure et faire l'objet de contrôles pour empêcher toute contamination interne. Les règles relatives à la préparation aseptique des vaccins sont décrites au Chapitre 3.7.1. Exigences minimales pour la gestion et l'organisation des installations de production de vaccins.
5. Certaines procédures sont dûment validées et jugées "adaptées au but poursuivi" tandis que d'autres peuvent n'avoir fait l'objet d'études de validation que de manière limitée. Par exemple, les méthodes pour la stérilité bactérienne et fongique n'ont pas été formellement validées bien qu'elles soient utilisées depuis de

nombreuses années. Les méthodes *in vivo* ainsi que les méthodes de culture cellulaire ont une sensibilité et une spécificité largement méconnues (Sheets *et al.*, 2012) même si une sensibilité théorique de 1 unité formant colonie (UFC) est acceptée. Ainsi, une évaluation des méthodes de détection des virus bovins et porcins dans le sérum et dans la trypsine basée sur le Code of Federal Regulations américain (USA), titre 9 (9CFR) révèle des écarts de sensibilité, y compris au sein d'une même famille de virus (Marcus-Secura *et al.*, 2011). C'est pourquoi il est important d'interpréter les résultats à la lumière des conditions spécifiques des cultures utilisées et de tenir compte de la sensibilité comme de la spécificité des systèmes de détection.

6. Des méthodes plus récentes et plus sensibles comme les analyses moléculaires semblent permettre la détection de contaminants que les systèmes de culture traditionnels ne parviennent pas à amplifier. La plage de détection peut être élargie en utilisant des amorces et des sondes spécifiques, pour autant qu'elles soient bien conçues. Toutefois, la plupart si ce n'est la totalité de ces nouveaux tests sont également à même de déceler la présence de contaminants **non infectieux**, comme des traces d'acide nucléique de contaminants inactivés. Des tests de suivi sont nécessaires pour déterminer la nature du contaminant et faire la distinction, par exemple, entre de l'acide nucléique non infectieux et un virus infectieux. Des essais d'isolation ou de séquençage du virus pourraient y remédier. À noter : les analyses moléculaires, si elles ne sont pas conçues en adéquation avec le but poursuivi, peuvent échouer à détecter les agents contaminants ou manquer de sensibilité pour le faire (Hodinka, 2013).

Plus récemment encore, les procédures de séquençage haut-débit métagénomiques (high throughput sequencing, HTS) ont montré leur potentiel dans le contrôle qualité des produits biologiques (van Borm *et al.*, 2013) et des vaccins (Baylis *et al.*, 2011; Farsang & Kulcsar, 2012; Neverov & Chumakov, 2010; Onions & Kolman, 2010; Victoria *et al.*, 2010), notamment pour l'identification et la caractérisation des variants pathogènes hautement et étonnamment divergents (Miller *et al.*, 2010; Rosseel *et al.*, 2011) que les tests diagnostiques ciblés ne permettent pas de détecter. Néanmoins, les tests ciblés comme l'amplification sur culture cellulaire suivie d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) peuvent se montrer meilleurs que le séquençage haut-débit dans la détection d'agents spécifiques (Wang *et al.*, 2014), vu le manque actuel de sensibilité du séquençage haut-débit. De manière analogue, l'amélioration récente de l'efficacité de la séparation des protéines et des peptides ainsi que la grande précision de la spectrométrie de masse encouragent l'identification et la quantification des protéines d'un échantillon donné. La plupart de ces nouvelles technologies restent toutefois des outils de dépistage, limités par le fait qu'ils ne permettent pas de faire la distinction entre des micro-organismes viables et non viables.

## B. VACCINS À VIRUS VIVANTS ADMINISTRÉS PAR INJECTION

1. Le matériel d'origine animale (a) doit être stérilisé ou (b) doit provenir d'animaux en bonne santé, dans la mesure du possible garantis indemnes d'organismes pathogènes transmissibles de l'espèce d'origine aux espèces à vacciner ou à toute espèce en contact avec eux, ceci au moyen de tests de détection des agents adventices.
2. Les lots de semence virale, les lignées cellulaires continues ainsi que le matériel biologique utilisé pour la croissance virale doivent être indemnes de bactéries, de champignons, de mycoplasmes, de protozoaires, de rickettsies, de virus adventices ou d'autres pathogènes viables potentiellement transmissibles de l'espèce d'origine aux espèces à vacciner ou à toute espèce en contact avec eux. Pour la production des vaccins sur œufs embryonnés et pour les procédures de contrôle qualité afférentes, il est recommandé (voir exigé par certains pays) d'utiliser des œufs embryonnés de poules exemptes de pathogènes spécifiques (SPF).
3. Chaque lot de vaccin doit satisfaire à des tests d'absence de contamination par des agents adventices conformes aux exigences des pays qui souhaitent en autoriser l'utilisation. Les méthodes qui documentent des procédures de tests acceptables dans différents pays ont été publiées par : (US) Code of Federal Regulations (2015); Pharmacopée européenne (2014); Commission européenne (2006); Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (1998; 2012) et par le Department of Agriculture (of Australia) (2013).
4. Les tests de stérilité doivent être appropriés pour prouver que le vaccin est exempt de virus, de bactéries, rickettsies et mycoplasmes compris, de champignons et de protozoaires adventices. Chaque pays aura des exigences particulières sur les agents qui doivent être exclus et sur les procédures qui sont acceptables. Ces tests incluront l'amplification d'agents adventices viables au moyen de cultures cellulaires sensibles aux virus spécifiques à l'espèce concernée, les tests sur œufs embryonnés, les techniques de culture des bactéries, des mycoplasmes et des champignons ainsi que, si nécessaire et dans la mesure du possible, les tests

impliquant l'inoculation d'animaux. Les tests de PCR, d'immunofluorescence, la présence de colonies à effet cytopathogène (ECP) ainsi que les tests immuno-enzymatiques (ELISA) seront utilisés à des fins de détection après amplification sur cultures. Lorsqu'une amplification *in vitro* ou *in vivo* de l'agent cible n'est pas possible, un test de PCR directe pourra être utilisé, pour autant qu'il soit validé pour cette utilisation.

### **C. VACCINS À VIRUS VIVANTS ADMINISTRÉS DANS L'EAU DE BOISSON, PAR NÉBULISATION OU PAR SCARIFICATION CUTANÉE**

1. Le paragraphe B s'applique.
2. Un nombre limité de bactéries et de champignons non pathogènes contaminants peut être admis (voir paragraphe 1.2.2. *Procédures générales de test des vaccins vivants produits sur œufs et administrés dans l'eau de boisson, par nébulisation ou scarification cutanée quant à la présence de bactéries ou de champignons*).

### **D. VACCINS À VIRUS INACTIVÉS**

1. Chaque lot de vaccin devra satisfaire à un contrôle de l'inactivation du virus vaccinal et devra être accompagné d'études d'inactivation pour des agents adventices représentatifs si la semence virale n'a pas été testée et déclarée exempte d'agents adventices. Un exemple d'étude d'inactivation simple peut inclure l'évaluation du titre du vaccin vivant avant et après inactivation ainsi que l'évaluation de la baisse  $\log_{10}$  du titre au cours du processus d'inactivation. Ceci peut fournir une indication de l'efficacité du processus d'inactivation. Tout porte à croire que les tests de titration virale n'ont pas une sensibilité suffisante pour garantir une inactivation complète. Dans ces circonstances, un test spécifique d'innocuité devrait être développé et validé dans le but d'augmenter la sensibilité. Pour augmenter la sensibilité, plus d'un passage sera nécessaire, selon le type de virus concerné. Un exemple de cette approche peut être consulté sous : [https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/vet\\_biologics/publications/memo\\_800\\_117.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/memo_800_117.pdf).
2. Lorsque des études sur des agents adventices représentatifs sont requises, l'enrichissement des vaccins inactivés avec des agents vivants représentatifs, suivi d'un contrôle de l'inactivation sur le modèle décrit au paragraphe D1 pourra s'avérer utile. Le procédé d'inactivation ainsi que les tests utilisés pour détecter le virus vivant après inactivation doivent être validés et s'être montrés adaptés à l'objectif visé. En outre, chaque pays peut avoir des exigences particulières concernant l'origine et les tests de stérilité, tel que mentionné au paragraphe B ci-dessus.

### **E. VACCINS A BACTERIES VIVANTES**

1. Le paragraphe B s'applique.
2. Les lots de semence bactérienne doivent être déclarés indemnes d'autres bactéries ainsi que de champignons, de mycoplasmes, de protozoaires, de rickettsies et de virus adventices. Les agents à exclure dépendront du pays souhaitant autoriser l'utilisation du vaccin. L'utilisation d'antibiotiques pour 'inactiver' la semence bactérienne vivante ou le vaccin avant d'exclure la présence de virus et de champignons est recommandée afin de garantir la sensibilité des tests en culture. Il est recommandé de tester les interférences pour s'assurer que les antibiotiques utilisés n'affectent pas la croissance des virus adventices ou des champignons à exclure.
3. En raison des difficultés et de la sensibilité moindre des tests servant à exclure les bactéries adventices, certains mycoplasmes, les protozoaires et les rickettsies dans des lots de semence bactérienne au titre élevé, l'utilisation d'antibiotiques à spectre étroit afin de réduire de manière spécifique les bactéries du lot de semence est recommandée, pour autant que ces antibiotiques n'affectent pas la croissance des bactéries à exclure. La concentration optimale d'antibiotiques peut être déterminée par un test de dilution tel que décrit dans le 9CFR, section 113.25(d). D'autres méthodes pour exclure la présence de bactéries adventices des lots de semence bactérienne peuvent comprendre la filtration en vue d'une exclusion par la taille, le retrait des semences bactériennes pour évaluer la contamination par les mycoplasmes ou l'emploi de milieux de culture

sélectifs. Toutes ces procédures nécessiteront une validation garantissant qu'elles n'affectent pas la sensibilité du test destiné à exclure des agents adventices dangereux.

4. Les techniques de PCR directe peuvent s'avérer utiles lorsque les méthodes de culture manquent de sensibilité pour détecter les bactéries adventices dans un lot de semence bactérienne vivante ou dans les vaccins.

## **F. VACCINS A BACTERIES INACTIVEES**

1. Le paragraphe D s'applique. Il ne devrait pas être nécessaire d'exclure la présence de virus adventices incapables de croître en milieu de culture bactériologique si une absence de contamination peut être garantie pour toutes les matières premières. L'inactivation complète de la bactérie vaccinale devrait être démontrée par titration ou au moyen de tests d'innocuité – dans certains cas, les tests de stérilité bactérienne (paragraphe I.2.1.) peuvent suffire.

## **G. SÉRUMS ET RÉACTIFS DIAGNOSTIQUES ADMINISTRÉS AUX ANIMAUX**

1. Le paragraphe B.1 s'applique aux sérums non inactivés.
2. Certains pays imposent des quarantaines, des certificats sanitaires et des tests concernant des maladies spécifiques à effectuer pour tous les animaux donneurs de sérum, à l'exemple du 9CFR (2015) ou des Australian Quarantine Policy and Requirements for the Importation of Live and Novel Veterinary Bulk and Finished Vaccines (1999).
3. Il est recommandé de tester la présence d'agents adventices viables, mycoplasmes compris, pour chaque lot de sérum non inactivé. Chacun de ces lots devra satisfaire à un test d'absence d'agents adventices. Les méthodes de tests adéquates ont été publiées pour différents pays, notamment dans: la Pharmacopée Européenne (2014); le 9 CFR (2015) ou les Australian Quarantine Policy and Requirements for the Importation of Live and Novel Veterinary Bulk and Finished Vaccines (1999) ainsi que par le Department of Agriculture (of Australia) (2013).
4. Pour les sérums inactivés, le paragraphe D s'applique.
5. Les paragraphes B ou D s'appliquent lorsqu'un virus est utilisé pour la production d'un réactif diagnostique ; les paragraphes E et F peuvent s'appliquer lorsqu'une bactérie est utilisée.

## **H. EMBRYONS, OVULES ET SPERME**

Des précautions particulières doivent être prises lorsque des embryons, des ovules ou du sperme sont utilisés (Hare, 1985). La plupart des pays ont des directives réglementaires pour l'importation de ce type de matériel biologique à usage vétérinaire. Ces directives peuvent être consultées sur différents sites internet comme par exemple celui de la Communauté Européenne ou de la FAO, même si la plupart de ces directives fournissent essentiellement des détails sur les aspects de sécurité des aliments.

## **I. EXEMPLES DE PROTOCOLES**

### **1. Procédures générales**

En principe, les tests proposés constituent une tentative d'isolation des agents viables dans des systèmes de culture normalement considérés comme favorisant la croissance de chaque agent spécifié ou de chaque groupe d'agents en général. Après amplification, les pathogènes potentiels peuvent, si nécessaire, être mieux détectés à l'aide de tests sensibles et spécifiques comme l'IF ou la PCR. Les systèmes de détection générale peuvent inclure l'hémadsorbance ou l'ECP par des méthodes de coloration immuno-histochimiques. Les exemples de procédures des tests de stérilité et de détection générale de bactéries, de mycoplasmes, de champignons et de virus viables

décrits ci-dessous sont issus des textes de référence tels que le 9CFR (2015), la Pharmacopée Européenne (2014) ou ont été publiés par la Commission Européenne (2006) ou l'OMS (1998, 2012).

Certains pays ou certaines régions devraient adopter une approche basée sur une analyse des risques pour définir quels sont les protocoles de tests appropriés à leur état zoosanitaire. En plus d'appliquer les procédures générales de test documentées dans les normes nationales ou régionales telles que mentionnées plus haut, il peut s'avérer nécessaire d'appliquer des tests rigoureux pour exclure des agents spécifiques dont le statut, dans ces pays ou ces régions, est exotique.

Les procédures générales ne permettent pas toujours de détecter tous les agents adventices potentiellement présents dans un matériel biologique ; toutefois, elles sont utiles pour un dépistage. Certains agents peuvent nécessiter des méthodes de détection spécifiques ; le tableau 1 ci-dessous en fournit quelques exemples. Les procédures décrites dans le Review of Published Tests to Detect Pathogens in Veterinary Vaccines Intended for Importation into Australia (2013), disponible auprès du Department of Agriculture and Water Resources, Australia permettent de détecter ces agents ; il s'agit d'approches diagnostiques sensibles basées sur des publications réputées.

L'exclusion d'agents spécifiques requiert des procédures à la sensibilité maximale permettant une amplification idéale ainsi que la détection du pathogène incriminé. Les agents adventices tels que le virus de Maedi Visna, le virus de l'immunodéficience bovine, *Trypanosoma evansi* ou le coronavirus respiratoire porcine sont difficiles à cultiver, même avec les approches les plus sensibles. Dans ces circonstances, l'utilisation d'analyses moléculaires effectuées directement sur le matériel biologique dans l'objectif de détecter la présence d'acide nucléique provenant d'agents adventices offre une alternative. Voir le tableau 1. Les réserves exprimées au paragraphe A.6 doivent être prises en compte, des agents non viables pouvant également être détectés par ces méthodes.

Le tableau 1 fournit quelques exemples d'agents infectieux responsables de maladies et potentiellement présents dans les produits biologiques d'origine animale à usage vétérinaire. Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive d'agents dangereux et, en aucun cas, d'agents à exclure par tous les pays, mais seulement d'exemples d'agents infectieux qui ne peuvent pas être cultivés selon les méthodes traditionnelles de culture et qui nécessitent une procédure de détection plus spécifique, le cas échéant à l'aide de tests d'immunofluorescence indirecte, de tests PCR ou ELISA. À noter que, si certains sous-types d'un agent peuvent être détectés par des méthodes générales, d'autres peuvent nécessiter des tests de détection spécifiques. Pour exemple, le sous-groupe 1 des adénovirus bovins (sérotypes 1, 2, 3 et 9) peut être facilement isolé en utilisant des méthodes générales (cellules de Vero) alors que le sous-groupe 2 de ces adénovirus bovins (sérotypes 4, 5, 6, 7, 8 et 10) n'est pas facile à isoler et nécessite des méthodes d'isolation spéciales.

**Tableau 1. Exemples d'agents infectieux d'importance vétérinaire nécessitant des techniques spéciales de culture et de détection**

Rotavirus	Pestivirus (sans ECP)	Virus de la rhinotrachéite du dindon
Virus de la diarrhée épidémique porcine	Virus de la langue bleue	<i>Brucella abortus</i>
Circovirus porcins (CVP 1, 2)	Virus de la variole porcine	<i>Rickettsias</i>
Certaines souches du virus de l'influenza porcine/équine	Certains adénovirus	<i>Protozoaires</i>
Virus respiratoire syncytial bovin	Virus rabique	Certains champignons (p.ex. <i>Histoplasma</i> )

## 2. Détection des bactéries ou des champignons

### 2.1. Procédure générale pour contrôler l'absence de bactéries ou de champignons viables

Les tests normalisés pour détecter des bactéries ou des champignons adventices (tests de stérilité) dans les matières premières brutes, les lots de semence ou le produit fini sont : le test de filtration sur membrane ou le test de stérilité par inoculation directe.

Pour la technique de filtration sur membrane, un filtre d'une porosité nominale ne dépassant pas 0.45 µm et d'un diamètre d'au moins 47 mm sera utilisé. Des filtres en nitrate de cellulose seront utilisés si le matériel est aqueux ou visqueux ; des filtres à base d'acétate de cellulose seront utilisés si la teneur du matériel en alcool ou en huile est très élevée ou si le matériel contient un adjuvant huileux. Le filtre est imbibé avec 20 à 25 ml de diluant A ou B juste avant que le contenu du flacon ou des flacons à tester ne soit filtré.

### 2.1.1. Diluant A

Le diluant A est utilisé pour les produits ou le matériel aqueux. Dissoudre 1 g d'hydrolysate peptique de tissu animal dans de l'eau et porter à 1 litre, filtrer ou centrifuger pour clarifier, ajuster le pH à  $7.1 \pm 0.2$ , répartir dans des flacons de 100ml et stériliser à la vapeur.

### 2.1.2. Diluant B

Le diluant B est utilisé pour les produits ou le matériel contenant un adjuvant huileux. Ajouter 1 ml de polysorbate 80 à 1 litre de diluant A, ajuster le pH à  $7.1 \pm 0.2$ , répartir dans des flacons de 100 ml et stériliser à la vapeur.

Si le produit biologique à tester a des propriétés antimicrobiennes, la membrane sera lavée trois fois après l'application de l'échantillon avec environ 100 ml du diluant approprié (A ou B). La membrane sera ensuite soit transférée en totalité sur un milieu de culture, soit coupée en parties égales de manière aseptique et placée dans le milieu ou c'est le milieu qui sera transféré sur la membrane en utilisant l'appareil à filtration. Si l'échantillon à tester contient du merthiolate comme agent de conservation, le milieu liquide au thyoglycollate (FTM pour *Fluid Thioglycollate Medium*) sera utilisé et les membranes seront incubées à 30-35°C et à 20-25°C. Si l'échantillon à tester est un produit biologique inactivé sans conservateur à base de merthiolate, le FTM sera utilisé à 30-35°C et un milieu à base d'hydrolysate de caséine de soja (SCDM pour *Soybean Casein Digest Medium*) à 20-25°C. Si l'échantillon à tester est un produit biologique viral vivant, le SCDM sera utilisé aux deux températures d'incubation. Il a été suggéré récemment d'utiliser une gélose sulfite de polymyxine-sufladiazine pour améliorer la détection de *Clostridium* spp. en cas de filtration sur membrane (Tellez et al., 2005).

Lorsqu'une inoculation directe du milieu de culture est choisie, une seringue et une aiguille stériles ou une pipette seront utilisées pour transférer de manière aseptique le matériel biologique directement dans le milieu liquide. Si le produit biologique testé a des propriétés antimicrobiennes, le ratio inoculum/volume de culture sera déterminé avant de débiter le test, comme expliqué par exemple dans le 9CFR 113.25(d); les procédures de test détaillées sont décrites dans le Supplemental Assay Method (SAM) 903. Afin de déterminer le volume de milieu nécessaire pour neutraliser l'activité antimicrobienne, 100 UFC d'un micro-organisme témoin listé dans le tableau 2 seront utilisées. Si l'échantillon à tester contient du merthiolate comme agent de conservation, le FTM sera utilisé dans les flacons de tests incubés à 30-35°C et à 20-25°C. La croissance doit être nettement visible après un temps d'incubation approprié (voir paragraphe 1.2.1.3 *Stimulation de la croissance et interférence du test*). Si l'échantillon à tester est inactivé et ne contient ni merthiolate, ni bactéries vivantes, le FTM sera utilisé à 30-35°C et le SCDM à 20-25°C. Si l'échantillon à tester est un produit biologique viral vivant, le SCDM sera utilisé aux deux températures d'incubation. Si le vaccin bactérien inactivé contient des clostridies ou un composant clostridial, l'adjonction de 0.5% d'extrait de bœuf (FTMB) au FTM, en lieu et place de FTM seul, sera privilégiée. Il peut être souhaitable d'utiliser le FTM et le SCDM pour tous les tests.

**Tableau 2. Souches de la collection de culture de référence (ATCC)<sup>1</sup>, avec leur milieu de croissance respectif et leurs conditions d'incubation**

Milieu	Micro-organisme témoin	Incubation	
		Température (°C)	Conditions
FTM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC # 6633	30–35	Aérobie
FTM	<i>Candida krusei</i> ATCC # 6258	20–25	Aérobie
SCDM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC # 6633	30–35	Aérobie
SCDM	<i>Candida krussei</i> ATCC # 6258	20–25	Aérobie
FTMB	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC # 11437	30–35	Anaérobie
FTMB	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC #6538	30–35	Aérobie

Pour les tests de stérilité, qu'il s'agisse de filtration sur membrane ou d'inoculation directe, tous les milieux seront incubés pendant 14 jours au minimum. Les flacons de test seront examinés à intervalles réguliers pendant l'incubation ainsi qu'après 14 jours d'incubation pour y déceler une croissance microbienne qui sera alors confirmée par une sous-culture et une coloration de Gram.

### 2.1.3. Stimulation de la croissance et interférence du test

La stérilité du milieu doit être confirmée en incubant des flacons représentatifs à la température appropriée et pendant une durée spécifiée pour chaque test.

L'aptitude du milieu de culture à soutenir une croissance en présence ou en l'absence de produit, de composants du produit, de cellules, de semences ou d'autre matériel de test doit être validée pour chaque produit à tester ainsi que pour chaque nouveau lot du milieu de culture, comme décrit dans le 9CFR 113.25(d); les procédures de test détaillées figurent par exemple dans les SAM 900-902.

Pour tester l'aptitude du milieu de culture à soutenir une croissance en l'absence de matériel à tester, le milieu sera inoculé avec 10–100 micro-organismes témoins viables des souches suggérées par l'ATCC listées dans le tableau 2 pour ensuite être incubé aux conditions spécifiées par la procédure.

Pour tester l'aptitude du milieu de culture à soutenir une croissance en présence de matériel à tester, des flacons contenant le matériel à tester ainsi que des récipients contenant 10–100 micro-organismes témoins viables seront inoculés simultanément. Le nombre de flacons utilisés comme témoins doit être au moins égal à la moitié du nombre utilisé pour tester le produit ou les composants du produit. Les milieux de culture sont considérés comme satisfaisants si la croissance des micro-organismes témoins est clairement établie dans les 7 jours qui suivent l'inoculation de tous les milieux de culture. Dans le cas où une croissance est établie, le micro-organisme sera identifié pour confirmer qu'il s'agit bien du micro-organisme initialement ajouté au milieu. Le test de stérilité sera considéré comme non valide si l'un des milieux montre une croissance inadéquate ou si le micro-organisme identifié n'est pas celui ayant servi à l'inoculation du milieu.

Si le matériel à tester rend le milieu turbide au point de ne plus permettre la détection par l'examen visuel de la présence ou de l'absence de croissance microbienne, des portions du milieu (d'au moins 1 ml chacune) seront repiquées, 14 jours après le début de l'incubation, dans des flacons fraîchement préparés avec le même milieu pour être ensuite incubés, avec les flacons d'origine, pour un minimum de 4 jours.

1 American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA.

## **2.2. Procédures générales pour tester la présence de bactéries ou de champignons dans les vaccins à virus vivant produits sur œufs et administrés dans l'eau de boisson, par nébulisation ou par scarification cutanée**

Chaque lot de produit final biologique conditionné doit présenter une contamination moyenne inférieure à une colonie bactérienne ou fongique par dose de vaccin vétérinaire. À partir de chaque échantillon de flacon, deux boîtes de Petri seront inoculées avec l'équivalent de 10 doses vaccinales si le vaccin est destiné aux volailles ou avec une dose s'il est destiné à d'autres animaux. À chaque boîte, on ajoutera 20 ml de gélose à base d'infusion cœur-cerveau contenant 0.007 UI (Unités Internationales) de pénicillinase par ml. La première boîte sera incubée à 30-35°C pendant 7 jours et la seconde à 20-25°C pendant 14 jours. Le dénombrement des colonies sera effectué au terme de chaque période d'incubation. Un nombre moyen de colonies pour toutes les boîtes représentatif du lot sera calculé pour chacune des conditions d'incubation. Si le nombre moyen de colonies pour chaque condition d'incubation dépasse d'une colonie par dose celui du test initial, un second test sera effectué afin d'exclure toute erreur technique. Pour ce faire, on utilisera le double de la quantité de produit final conditionné non ouvert. Si, pour chacune des conditions d'incubation du test final d'un lot, le nombre moyen de colonies dépasse une colonie par dose, le lot de vaccin devra être considéré comme insatisfaisant.

## **2.3. Procédures générales pour tester la pureté des lots de semence bactérienne ou des produits biologiques à base de bactéries vivantes**

La pureté de chaque lot de semence bactérienne ou de chaque lot de produit biologique à base de bactéries vivantes sera testée par l'inoculation d'un milieu SCDM incubé à 20-25°C pendant 14 jours et celle d'un milieu FTM incubé à 30-35°C pendant 14 jours. Une seringue et une aiguille stériles ou une pipette seront utilisées pour transférer directement de manière aseptique le volume de matériel biologique sur les deux types de milieu de culture. Le ratio minimal inoculum/milieu de culture est de 1/15.

Si l'inoculum ou la croissance du vaccin bactérien rendent le milieu turbide au point de ne plus permettre de déterminer par l'examen visuel l'absence de croissance microbienne atypique, des sous-cultures seront effectuées entre les jours 3 et 11 pour tous les flacons qui présentent cette turbidité. Les sous-cultures seront réalisées en repiquant 0.1-1.0 ml des différents bouillons ou géloses et en les incubant jusqu'à la fin de la période de 14 jours. Un examen au microscope après coloration de Gram sera également effectué.

Si aucune croissance atypique n'est observée dans les flacons de tests en comparaison avec le témoin positif inclus dans le test, le lot du produit biologique sera considéré comme pur. Si une croissance atypique est observée mais que les témoins permettent de démontrer qu'un défaut du milieu ou une erreur de technique peut en être responsable, le test sera répété. Si une croissance atypique est observée mais que rien ne permet d'invalider le test, celui-ci pourra être répété mais avec un nombre de flacons de produit et de flacons de test deux fois supérieur au nombre utilisé pour le premier test. Si aucune croissance atypique n'est observée lors du second test, le produit biologique sera considéré comme pur mais les résultats des deux séries de tests seront consignés dans l'évaluation faite par les agences réglementaires du pays concerné. Si une croissance atypique est observée dans l'un des seconds flacons de test, la pureté du produit biologique sera déclarée insatisfaisante. Cependant, si la preuve peut être apportée qu'un défaut du milieu ou une erreur de technique peut en être responsable, un nouveau test pourra être effectué.

## **2.4. Exemple de procédure lorsque les méthodes de test générales ne suffisent pas à exclure la présence de *Brucella abortus***

L'aptitude de chaque lot de milieu de culture à soutenir la croissance de *B. abortus* devra être confirmée par l'inoculation de plaques et de flacons de milieu biphasique avec un nombre connu de cellules (environ 100) de *B. abortus* biovar 2. Si le milieu permet la croissance de ce biotype, il devrait permettre la croissance de tous les autres biovars.

Inoculer 1.0 ml de la semence cellulaire ou virale primaire ou du matériel de travail (exempts d'antibiotiques) en répartissant 50 µl du produit à tester dans chacun des 10 flacons contenant le milieu

biphasique. Inoculer simultanément 10 plaques de gélose de Sabouraud Dextrose (SDA) avec 50 µl d'inoculum en le répartissant à l'aide d'une pipette de Pasteur stérile ou d'une aiguille montée à bout recourbé. Une plaque de SDA ainsi qu'un flacon de milieu biphasique non inoculés seront préparés en parallèle pour servir de témoin négatif.

Pour détecter la présence de substances inhibitrices, 50 µl de la semence cellulaire ou virale primaire ou du matériel de travail et 10–100 UFC de *B. abortus* seront inoculés en double sur des plaques SDA. Des témoins positifs seront préparés en inoculant en double 10-100 UFC de *B. abortus* sur des plaques SDA.

Toutes les plaques et les flacons seront incubés à 37°C dans une atmosphère à 5–10% de CO<sub>2</sub>. Les plaques seront incubées gélose en haut et les flacons avec une pente verticale pour la gélose, bouchon desserré.

Sur les plaques, la croissance des colonies sera évaluée aux jours 4 et 8 de l'incubation. Le milieu biphasique sera examiné tous les 4 à 7 jours pendant 28 jours. Après chaque examen, les flacons seront inclinés de sorte que la phase liquide coule sur la phase solide, puis redressés et remis dans l'incubateur.

Pendant la période d'incubation, les plaques SDA avec le témoin positif et le matériel de test seront comparées visuellement avec celles inoculées avec le témoin positif seulement et, si aucune inhibition de la croissance du micro-organisme en présence du matériel de test n'est observée, les tests d'interférence pourront être considérés comme concluants et la sensibilité du test garantie.

Tout signe de croissance de micro-organismes suspects sur les plaques SDA, de turbidité ou de colonies dans les flacons biphasiques nécessitera des tests complémentaires par PCR pour confirmer la présence éventuelle de *B. abortus*.

## **2.5. Exemple de procédure générale pour la détection d'une contamination par *Salmonella***

Chaque lot de produit biologique à base de virus vivant produit sur œufs doit être exempt de *Salmonella*. Ces tests doivent être réalisés avant l'adjonction d'agents bactériostatiques ou bactéricides. Cinq échantillons de chaque lot doivent être testés ; 5 ml ou la moitié du contenu d'un flacon (la quantité la plus faible étant retenue) seront utilisés pour inoculer 100 ml de bouillon de tryptose et de bouillon au tétrathionate. Les bouillons inoculés seront incubés pendant 18 à 24 heures à 35–37°C. Des inocula seront réalisés à partir de ces bouillons pour ensemercer une gélose MacConkey et une gélose *Salmonella-Shigella* qui seront incubées pendant 18 à 24 heures puis examinées. Si aucune croissance typique de *Salmonella* n'est observée, les boîtes de gélose seront remises à incuber pendant 18 à 24 heures supplémentaires puis examinées à nouveau. Si des colonies typiques de *Salmonella* sont observées, une sous-culture complémentaire sur différents milieux sélectifs appropriés sera réalisée pour permettre une identification positive. Il existe des tests PCR sensibles pour la détection de *Salmonella* spp. dans les milieux de culture. Si une *Salmonella* est détectée, le lot sera considéré comme non satisfaisant.

## **3. Détection de contamination par *Mycoplasma***

### **3.1. Exemple de procédure générale pour la détection d'une contamination par *Mycoplasma***

Chaque lot de vaccin viral vivant, chaque lot de semence virale primaire (MSV, *Master Seed Virus*), chaque lot de semence cellulaire primaire (MSC, *Master Cell Stock*) ainsi que tous les ingrédients d'origine animale qui ne sont pas stérilisés à la vapeur doivent être testés pour exclure la présence de mycoplasmes. Des milieux liquides et solides qui permettent la croissance d'un petit nombre de micro-organismes tests, tels les micro-organismes courants *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale* et *M. synoviae*, seront utilisés. Les propriétés nutritives du milieu solide doivent permettre la croissance d'au moins 100 UFC lorsque le milieu est ensemencé avec 100–200 UFC par boîte. Un changement de couleur approprié doit survenir dans le milieu liquide lorsqu'environ 20 à 40 UFC de chaque micro-organisme test sont inoculées. L'aptitude du milieu de culture à permettre la croissance en présence de produit doit être validée pour chaque produit à tester et pour chaque nouveau lot du milieu de culture.

Un échantillon de chaque lot de vaccin, de MSV ou de MSC sera testé. Quatre boîtes tapissées de milieu solide seront inoculées avec 0.25 ml de l'échantillon à tester et 100 ml de milieu liquide seront ensemencés avec 10 ml de l'échantillon. Il est aussi possible d'inoculer chaque boîte avec 0.1 ml et d'ensemencer 100 ml de milieu liquide avec 1 ml de l'échantillon à tester. Deux boîtes seront incubées à 35-37°C en atmosphère aérobie (atmosphère d'air contenant 5 à 10% de CO<sub>2</sub> et d'une humidité adéquate) et 2 boîtes seront placées en atmosphère anaérobie (atmosphère d'azote contenant 5 à 10% de CO<sub>2</sub> et d'une humidité adéquate) pendant 14 jours. Trois ou quatre jours après l'inoculation, une sous-culture de 0.25 ml du milieu liquide sera réalisée par repiquage sur 2 boîtes de milieu solide. La première des boîtes sera incubée en atmosphère aérobie, la seconde en atmosphère anaérobie à 35–37°C pendant 14 jours. La procédure de sous-culture sera répétée aux jours 6, 7 ou 8 ainsi qu'au jour 13 ou 14. Il est possible de pratiquer cette sous-culture sur milieu solide aux jours 3, 5, 10 et 14. Toutes les boîtes de sous-culture seront incubées pendant 10 jours, à l'exception de la boîte prélevée le jour 14 dont l'incubation sera de 14 jours. Le milieu liquide sera observé tous les 2 à 3 jours et, en cas de changement de couleur, immédiatement prélevé pour une sous-culture.

### 3.2. Interprétation des résultats de la recherche de *Mycoplasma*

Au terme de la période d'incubation (28 jours au total), tous les milieux solides inoculés seront examinés au microscope pour rechercher la présence de colonies de mycoplasmes. L'échantillon analysé passera le test si une croissance de colonies de mycoplasmes est observée sur les témoins positifs et si aucune croissance n'est observée sur les milieux solides inoculés avec le matériel de test. Si, à un quelconque moment du test, plus d'une plaque est accidentellement contaminée par des bactéries, des champignons ou est cassée, le test perd sa validité et doit être répété. La présence de colonies de mycoplasmes sur l'une des géloses impliquera des tests de confirmation adéquats (p.ex. PCR). Certains mycoplasmes ne pouvant pas être cultivés, les MSV et MCV seront alors testés en utilisant une lignée cellulaire indicatrice (p.ex. cellules Vero), une coloration de l'ADN ou des méthodes de PCR.

Des procédures plus détaillées peuvent être consultées dès le 8 mars 2017 dans le Veterinary Medicinal Products, VICH GL34:

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2013/03/WC500140352.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140352.pdf)

ainsi que dans le USDA SAM 910:

[https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/vet\\_biologics/publications/910.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/910.pdf)

### 3.3 Exemple de procédure spécifique pour exclure la présence de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* à petites colonies (small colony, SC) dans les produits biologiques utilisés pour la production de vaccins vétérinaires

Avant de débiter le test, l'aptitude de chaque lot du milieu de culture à soutenir la croissance de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*), souche PG1 doit être confirmée. Les bouillons et les géloses pour mycoplasmes peuvent être utilisés mais doivent être enrichis de sérum porcin. Chaque lot de bouillon et de gélose sera inoculé avec 100 UFC de *MmmSC*. Le milieu solide est considéré comme adapté si une croissance adéquate de *MmmSC* est observée après 3 à 7 jours d'incubation à 37°C et à 5–10% de CO<sub>2</sub>. Le milieu liquide est considéré comme adapté si, après sous-culture du bouillon sur une gélose, une croissance adéquate est observée dans la première sous-culture. Si la croissance est insuffisante, un autre lot du milieu de culture devra être obtenu et testé.

1 ml de semence cellulaire ou virale à tester sera ensemencé dans 9 ml de milieu liquide et 100 µl inoculés sur une gélose solide pour mycoplasmes. Le volume de produit à inoculer ne devrait pas représenter plus de 10% du volume du milieu. Le milieu liquide sera incubé à 37°C et à 5-10% de CO<sub>2</sub> et 100 µl de ce bouillon seront sous-cultivés sur gélose aux jours 7, 14 et 21. Les boîtes de gélose seront incubées à 37° et à 5-10% de CO<sub>2</sub> pendant 14 jours au moins, à l'exception de celles correspondant à la sous-culture du jour 21 dont l'incubation sera de 7 jours seulement. Un bouillon pour mycoplasmes et une boîte de gélose non inoculés seront incubés pour servir de témoin négatif. Pour la recherche de substances inhibitrices, inoculer 1 ml de l'échantillon à tester dans 9 ml de milieu liquide et 100 µl sur un milieu solide, y ajouter 10-100 UFC de *MmmSC*. Préparer les témoins positifs en inoculant 9 ml de bouillon pour mycoplasmes et une boîte de gélose pour mycoplasmes avec 10–100 UFC de *MmmSC*. Incuber de la même manière que les échantillons et les témoins négatifs.

Durant la période d'incubation, comparer visuellement le bouillon contenant le témoin positif et l'échantillon avec le bouillon témoin positif. S'il n'y a pas d'inhibition du micro-organisme, cela signifie soit que le produit ne possède pas d'activité antimicrobienne aux conditions du test, soit que cette activité a été éliminée de manière satisfaisante par la dilution. Si une croissance réduite de *MmmSC* est observée ou si aucune croissance n'est observée dans le milieu liquide ou solide avec l'échantillon de test en comparaison avec le témoin positif, le produit possède une activité antimicrobienne et ne satisfait pas au test. Des changements doivent être apportés aux conditions de production pour éliminer l'activité antimicrobienne et de nouveaux tests sont requis.

Si une activité antimicrobienne est observée, il n'est pas nécessaire de procéder à des dilutions du produit à tester. Répéter le test ci-dessus en utilisant 1.0 ml de l'échantillon dans 39 ml de bouillon de mycoplasmes puis inoculer 10–100 UFC de *MmmSC* et incubé comme ci-dessus. Des signes manifestes de croissance seront recherchés dans tous les bouillons et les boîtes. La présence de croissance sera déterminée en comparant les cultures du produit à tester avec le témoin négatif, le témoin positif et le témoin d'inhibition.

En présence d'une croissance microbienne dans les échantillons de test, le contaminant bactérien devra être identifié et confirmé par PCR comme étant un *MmmSC*.

#### 4. Détection de rickettsies et de protozoaires

Il n'existe pas de procédures générales de test pour exclure la présence de rickettsies ou de protozoaires. Les procédures pour exclure certains agents spécifiques comme *Coxiella burnetti* (fièvre Q), *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma evansi* et *Babesia caballi* figurent par exemple dans le Review of Published Tests to detect pathogens in veterinary vaccines Intended for Importation into Australia (Department of Agriculture [of Australia] [2013]). Ce document est basé sur la lecture et l'interprétation d'articles pertinents, publiés par des journaux réputés et considérés comme des exemples de méthodes de détection sensibles pour certains agents spécifiques.

##### 4.1. Exemple de protocole basé sur des méthodes publiées pour exclure la présence de *Babesia caballi* et de *Theileria equi*

*Babesia caballi* et *Theileria equi* peuvent être cultivés *in vitro* sur un milieu à base de 10% d'érythrocytes équins (RBC, *red blood cells*) enrichi avec 10% de sérum équin en atmosphère microaérophile. L'isolement en cultures de *T. equi* est plus délicat que celui de *B. caballi*. Des frottis sanguins colorés au Giemsa seront préparés quotidiennement à partir des cultures pendant 7 jours (Avarzed et al., 1997; Ikadai et al., 2001). *Babesia caballi* est caractérisé par des paires de mérozoïtes reliés par une de leurs extrémités. *Theileria equi* est caractérisé par la formation de tétrades de mérozoïtes ou 'croix de Malte'. La confirmation du diagnostic se fera par PCR (voir Chapitre 2.5.8. *Piroplasmoses équines*). Le diagnostic moléculaire est recommandé pour tester les produits biologiques qui ne contiennent pas de sang complet ou d'organes. Les méthodes de diagnostic moléculaire par PCR ou par amplification isotherme (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP) sont les plus sensibles et les plus spécifiques pour les agents pathogènes des piroplasmoses équines (Alhassan et al., 2007).

#### 5. Détection de virus dans les produits biologiques

En résumé, les tests généraux impliquent traditionnellement l'utilisation de lignées de cellules continues ou primaires de l'espèce source, cellules dont la susceptibilité aux contaminants viraux est connue et qui sont inoculées pour une durée allant jusqu'à 4 semaines, avec des mises en sous-cultures hebdomadaires. Les semences virales nécessitent également d'être testées sur des lignées de cellules primaires de l'espèce à laquelle le produit final est destiné. Aux jours 21 et 28, l'examen des monocouches est effectué en utilisant une coloration HE afin d'évaluer l'ECP et en utilisant des érythrocytes de cobaye et de poulet pour déterminer la présence d'agents hémadsorbants. À noter que ces tests généraux sont utiles comme outils de dépistage mais qu'ils ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter tous les virus dangereux.

Les tests spécifiques nécessitent que le matériel de test soit inoculé sur des lignées cellulaires sensibles et susceptibles au virus à exclure; le processus d'amplification en cultures cellulaires peut prendre jusqu'à 28 jours, voire plus, selon le virus. La détection de contaminants viraux spécifiques se fait par identification de l'ECP en conjonction avec la détection de l'antigène, méthode plus sensible, ou au moyen de tests moléculaires tels que IF, PCR ou ELISA après amplification sur cultures cellulaires.

Tous les tests qui utilisent des lignées cellulaires pour amplifier les virus cibles sont tributaires de la sensibilité des cellules à l'agent cible et de la possibilité de détecter la présence de l'agent dans les cellules. La qualité, les caractéristiques et le profil de permissivité au virus des lignées cellulaires utilisées doivent être jugés adaptés à l'objectif visé et correctement maintenus. Des témoins positifs et négatifs doivent être utilisés pour chaque passage de la culture cellulaire afin de déterminer leur sensibilité et leur spécificité. Des tests d'interférence doivent être effectués au premier passage pour garantir que l'échantillon de test n'inhibe pas la croissance du virus à exclure.

### **5.1. Exemple de test général pour exclure la présence de virus dans les semences virales ou cellulaires primaires utilisées dans la production de vaccins vétérinaires**

Si l'inoculum viral à tester a un effet cytopathogène, cet effet doit faire l'objet d'une neutralisation spécifique n'ayant pas d'incidence sur la probabilité d'isoler l'agent cible. Pour chaque type de cellule concerné, 1 ml de la semence virale primaire ou de la semence de travail (*Master Virus Seed, MVS*) à tester est décongelé ou reconstitué puis neutralisé par l'adjonction de 1 ml d'antisérum monospécifique. Le sérum doit être reconnu exempt d'anticorps dirigés contre les agents susceptibles d'être détectés par le test. Les antisérums doivent être testés pour exclure des effets inhibiteurs non spécifiques. Les sérums doivent être d'un titre suffisamment élevé pour neutraliser de manière efficace la semence virale pour un volume de sérum environ égal ou inférieur. Un titrage en microplaques sera utilisé pour déterminer le titre de l'antisérum requis pour neutraliser le MVS concerné. L'antisérum permet la neutralisation du MVS à 37°C en 1 heure. Le mélange MVS/antisérum est inoculé dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> contenant les cellules appropriées. Si le MVS présente un titre élevé ou est difficile à neutraliser, l'antisérum peut être ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 1 à 2 %.

Les semences cellulaires primaires ne nécessitent pas de neutralisation.

Les cellules doivent faire l'objet de passages hebdomadaires pendant une période allant jusqu'à 28 jours. Certains virus peuvent être sélectionnés pour servir d'indicateurs de la sensibilité et de l'interférence (témoins positifs) mais ils ne peuvent fournir de validation pour une palette plus large d'agents visés par les tests généraux. La culture finale est examinée à la recherche d'un ECP ou d'une hémadsorption.

Les méthodes de coloration au May-Grünwald-Giemsa ou de coloration HE sont utilisées pour détecter un ECP associé à la croissance d'un virus. Les monocouches doivent avoir une surface d'au moins 6 cm<sup>2</sup> et peuvent être préparées dans des chambres de culture sur lame, puis incubées pendant 7 jours. Les puits en plastique de la chambre sont retirés en prenant soin de laisser la base en caoutchouc fixée sur la lame. Les lames sont rincées avec une solution tamponnée au phosphate (PBS) de Dulbecco, puis fixées à l'acétone, au méthanol ou au formol, selon la coloration choisie, et placées sur un porte-lames. Pour une coloration au May-Grünwald-Giemsa : les lames sont colorées pendant 15 minutes à température ambiante avec du May-Grünwald dilué à 1/5 dans du méthanol pur. Le colorant May-Grünwald est retiré en retournant les lames. Celles-ci sont ensuite colorées pendant 20 minutes avec du Giemsa dilué à 1/15 dans de l'eau désionisée. Le colorant Giemsa est retiré en retournant les lames et en les rinçant avec de l'eau désionisée pendant 10 à 20 secondes. Les lames sont séchées à l'air et recouvertes d'une lamelle en utilisant de l'huile de paraffine. La coloration au May-Grünwald-Giemsa permet de différencier les nucléoprotéines à base d'ADN de celles à base d'ARN. Les nucléoprotéines à base d'ADN sont colorées en rouge-pourpre alors que les nucléoprotéines à base d'ARN sont colorées en bleu. La présence de corps d'inclusion, d'un nombre anormal de cellules géantes ou de tout autre ECP attribuable au contaminant viral dans les monocouches est évaluée au moyen d'un microscope conventionnel. Les monocouches inoculées sont comparées avec les monocouches non inoculées. En présence d'un ECP spécifique attribuable à un virus adventice, les résultats sont consignés et des tests complémentaires spécifiques peuvent être effectués.

Les tests d'hémadsorption sont généralement réalisés sur des monocouches d'une surface de 75 cm<sup>2</sup>, préparées dans un flacon de culture tissulaire après une période de passage de 28 jours comme décrit plus haut. Le sang de cobaye, de poulet ou tout autre sang utilisé pour ce test est collecté dans un volume égal de solution d'Alsever et peut être conservé à 4°C pendant 7 jours. Juste avant leur utilisation, les érythrocytes stockés sont lavés en prélevant 5 ml de la solution sang/Alsever et en les ajoutant à 45 ml de PBS sans calcium et sans magnésium (PBSA) avant de les centrifuger à 500 *g* pendant 10 minutes. Le surnageant est alors retiré par aspiration et les érythrocytes remis en suspension dans du PBSA pour être à nouveau centrifugés. Cette procédure de lavage est répétée au

moins deux fois jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Les érythrocytes de chaque espèce sont préparés en ajoutant 0.1 ml de chacun des types de concentré de globules rouges à 100ml de PBSA. Les érythrocytes des différentes espèces peuvent être gardés séparément ou mélangés, au choix. Ajouter à chaque flacon 5 ml de la suspension et incubé à 4°C pendant 30 minutes. Rincer deux fois les monocouches avec du PBSA et les examiner pour leur hémadsorption. Si aucune hémadsorption n'est visible, ajouter 5 ml de la suspension d'érythrocytes à chaque flacon et incubé à 20–25°C (température ambiante) pendant 30 minutes, rincer comme précédemment et répéter l'examen. Si nécessaire, des flacons distincts peuvent être utilisés pour chaque température d'incubation. La présence d'hémadsorption dans les monocouches est recherchée à l'aide d'un transilluminateur ainsi qu'au microscope. Les monocouches non inoculées servent de témoins négatifs. L'emploi de PBSA et d'érythrocytes frais devrait éviter la survenue d'hémadsorption non spécifique. En présence d'une hémadsorption spécifique attribuable à un agent adventice, les résultats sont consignés et des tests complémentaires spécifiques peuvent être effectués.

Les tests spécifiques requièrent des procédures spécialisées susceptibles d'amplifier un agent donné en culture et d'ensuite détecter cet agent par IF, ELISA ou PCR, de la manière la plus sensible. En règle générale, des tests spécifiques sont requis lorsque les procédures générales ne permettent pas d'exclure efficacement des virus plus délicats. Quelques exemples sont donnés dans le tableau 1.

## **5.2. Exemple de test pour exclure la présence d'un virus spécifique des produits biologiques utilisés dans la production de vaccins vétérinaires**

### **5.2.1. Virus de la diarrhée porcine épidémique (PEDV, Porcine Epidemic Diarrhoea Virus)**

La trypsine est nécessaire à l'inoculation et à l'isolation sur milieu de culture du virus de la diarrhée porcine épidémique (PEDV) dans les cellules Vero (CCL81, ATCC). Des monocouches parfaitement confluentes (100%) sont requises ; les monocouches imparfaitement confluentes sont plus sensibles à la présence de trypsine et peuvent être détruites avant les 7 jours requis pour chaque passage en culture. Les monocouches plus serrées ou anciennes peuvent s'avérer insensibles à la croissance de PEDV. La formulation du milieu d'entretien (MM, maintenance media) est la suivante : Earle's MEM (Milieu Essentiel Minimal) (avec 5.6 M HEPES [pipérazine N-2-hydroxyéthyl, acide N-2-éthane sulfonique] et glutamine) + 0.3% de bouillon de tryptose phosphate, 0.02% d'extrait de levure et 4 µg/ml de TPCK traité à la trypsine. L'adjonction de trypsine dans le MM devrait se faire le jour de son utilisation.

Avant l'inoculation, des monocouches confluentes de 75 cm<sup>2</sup> sont lavées deux fois avec le MM (additionné de trypsine) pour en éliminer le FCS. La semence virale ou cellulaire (1 ml) ainsi que 1 ml de MM sont ajoutés à chaque monocouche et incubés à 37°C pendant 2 heures. Leur sont ensuite ajoutés 30 ml de MM par flacon. Des monocouches témoins négatifs de la même taille sont préparés avant l'inoculation du matériel de test. Des témoins positifs et des témoins d'interférence sont préparés en dernier dans une zone séparée du laboratoire. L'évaluation de la sensibilité et des substances interférentes nécessite l'utilisation d'un PEDV au titre connu. La préparation d'un contrôle d'interférence basé sur une co-inoculation des échantillons de test et du PEDV n'est nécessaire que pour le premier passage. Des contrôles positifs doivent être préparés pour chaque passage afin de garantir que chaque monocouche utilisée offre la sensibilité espérée. Le virus PEDV est titré à des dilutions log allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup> dans le MM (selon le titre cible du virus de référence) dans des doubles rangées de 6 puits sur des plaques de culture tissulaire à 24 puits. Pour le test d'interférence, le PEDV est titré selon la même série de dilution mais en utilisant le MM additionné d'un volume de 10% du matériel de test. Décanter le milieu de culture et le jeter. Laver les plaques pour garantir l'absence de FCS. Deux lavages avec environ 400 µl de MM (additionné de trypsine) par puits suffisent.

Ajouter 100 µl de virus dilué à chacun des deux puits. Remuer les plaques inoculées afin de répartir l'inoculum de manière uniforme à la surface de la monocouche. Incuber à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub> pendant 2 heures puis ajouter 1 ml de MM par puits.

Après 7 jours, deux cycles congélation/décongélation à –80°C disloqueront les cellules des monocouches de 75 cm<sup>2</sup>. Les plaques témoins positifs seront lues pour les titres cibles et ceux-ci seront comparés avec la présence virale dans le matériel de test afin de s'assurer que les titres sont comparables et qu'aucune interférence n'est survenue. Les lysats issus des cycles

congélation/décongélation seront clarifiés à 2000 *g* pendant 5 minutes et repiqués sur de nouvelles monocouches comme pour le premier passage. Les passages seront répétés quatre fois au total ; les lysats cellulaires seront alors testés par PCR pour détecter la présence de PEDV et les monocouches au jour 7 dans les plaques à 24 puits seront fixées et colorées par IF. Si la souche virale à tester nécessite une neutralisation avec un antisérum, l'isolation du PEDV requiert une attention particulière. La trypsine est inactivée par la présence de protéines sériques et, en l'absence de trypsine, le PEDV ne peut pas croître en culture cellulaire. Pour garantir une sensibilité acceptable, un lessivage de l'inoculum avec deux bains de MM, après un temps d'adsorption allant jusqu'à 4 heures, est nécessaire.

## J. INFORMATIONS À FOURNIR POUR LES DEMANDES DE CERTIFICATS D'IMPORTATION

Lorsqu'elles effectuent une analyse de risques pour les produits biologiques, les Autorités Vétérinaires devraient se référer au présent *Manuel terrestre*. Le fabricant ou l'Autorité Vétérinaire du pays exportateur fournira des informations détaillées, en toute confidentialité si nécessaire, sur la provenance des matières premières utilisées lors de la fabrication du produit (p.ex. substrats). Il fournira également des détails sur la méthode de production (et, le cas échéant, sur l'inactivation) des substrats et des composants, sur les procédures d'assurance qualité pour chaque étape du processus, sur le régime de contrôle du produit final ainsi que sur la pharmacopée avec laquelle le produit doit être en conformité dans le pays d'origine. Il indiquera également les micro-organismes utilisés pour les épreuves virulentes, leur biotype, les sérums de référence ainsi que tous les autres moyens de tests appropriés pour contrôler le produit.

## K. PROCESSUS D'ANALYSE DES RISQUES

L'analyse de risques doit être aussi objective et transparente que possible, effectuée conformément au paragraphe 2 du *Code terrestre* et certifiée conforme selon le paragraphe 5 du même *Code terrestre*. En cas de besoin, l'évaluation des facteurs liés au pays et à la marchandise ainsi que des mesures de réduction des risques se basera sur les données fournies par le fabricant. Ces données sont plus fonction de l'assurance qualité à tous les stades de la fabrication que des contrôles du produit final seuls.

L'exposition domestique peut être influencée par l'autorisation d'employer le produit. Les Autorités Vétérinaires peuvent imposer des restrictions à l'utilisation de certains produits (p.ex. utilisation limitée aux institutions offrant des garanties adéquates de biosécurité).

## L. CONFINEMENT BIOLOGIQUE

Un confinement biologique adéquat peut être nécessaire pour différentes formes de produits biologiques. L'importation, notamment, de micro-organismes exotiques doit être faite en conformité avec le Chapitre 1.1.4 *Sécurité et protection biologique : normes sur la gestion du risque biologique dans les laboratoires vétérinaires et les animaleries*.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALHASSAN A., GOVIND Y., TAM N.T., THEKISOE O.M., YOKOYAMA N., INOUE N. & IGARASHI I. (2007). Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piro-plasmosis. *Parasitol. Res.*, **100**, 1165–1168.

AUSTRALIAN QUARANTINE POLICY AND REQUIREMENTS FOR THE IMPORTATION OF LIVE AND NOVEL VETERINARY BULK AND FINISHED VACCINES (1999). Available online at: <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/memos/1999/animal/99-085acleaned.pdf> (accessed 8 March 2017)

- AVARZED A., IGARASHI I., KANEMARU T., HIRUMI, K., OMATA T., SAITO Y., OYAMADA A., NAGASAWA H., TOYODA Y. & SUZUKI N. (1997). Improved *in vitro* cultivation of *Babesia caballi*. *J. Vet. Med. Sci.*, **59**, 479–481.
- BAYLIS S.A., FINSTERBUSCH T., BANNERT N., BLUMEL J. & MANKERTZ A. (2011). Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine*, **29**, 690–697.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2015). Subchapter E. Viruses, serums, toxins and analogous products; organisms and vectors. *In: Code of Federal Regulations, Animals and Animal Products. Title 9, Parts 101–124.* US Government Printing Office, Washington DC, USA.
- DEPARTMENT OF AGRICULTURE (OF AUSTRALIA) (2013). Review of Published Tests to Detect Pathogens in Veterinary Vaccines Intended for Importation into Australia, Second Edition. CC BY 3.0. Available online at: [http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/animal/2013/review-of-pathogens/Review\\_of\\_published\\_tests\\_to\\_detect\\_pathogens\\_2013\\_second\\_edition.pdf](http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/ba/animal/2013/review-of-pathogens/Review_of_published_tests_to_detect_pathogens_2013_second_edition.pdf) (accessed 8 March 2017)
- EUROPEAN COMMISSION (2006). The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Eudralex. Volumes 4–9. European Commission, DG Health and Food Safety, Public health, EU Pharmaceutical information, Eudralex. Available online at [http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/index_en.htm) (accessed 8 March 2017).
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.2. (2014). European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France. Available online at <http://online.edqm.eu/> (accessed 8 March 2017)
- FARSANG A. & KULCSAR G. (2012). Extraneous agent detection in vaccines – a review of technical aspects. *Biologicals*, **40**, 225–230.
- HARE W.C.D. (1985). Diseases Transmissible by Semen and Embryo Transfer Techniques. OIE Technical Series No. 4. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France.
- HODINKA R.L. (2013). Point: is the era of viral culture over in the clinical microbiology laboratory? *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 2–4.
- IKADAI H., MARTIN M.D., NAGASAWA H., FUJISAKI K., SUZUKI N., MIKAMI T., KUDO N., OYAMADA T. & IGARASHI I. (2001). Analysis of a growth-promoting factor for *Babesia caballi* cultivation. *J. Parasitol.*, **87**, 1484–1486.
- MARCUS-SECURA C., RICHARDSON J.C., HARSTON R.K., SANE N. & SHEETS R.L. (2011). Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals*, **39**, 359–369.
- MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D. (2010). Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, **84**, 11496–11504.
- NEVEROV A. & CHUMAKOV K. (2010). Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 20063–20068.
- ONIONS D. & KOLMAN J. (2010). Massively parallel sequencing, a new method for detecting adventitious agents. *Biologicals*, **38**, 377–380.
- ROSSEEL T., LAMBRECHT B., VANDENBUSSCHE F., VAN DEN BERG T. & VAN BORM S. (2011). Identification and complete genome sequencing of paramyxoviruses in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) using random access amplification and next generation sequencing technologies. *Viol. J.*, **8**, 463.
- SHEETS R., LOEWER, J., RAYDCHAUDHURI G. & PETRICCIANI J. (2012). Adventitious agents, new technology, and risk assessment, 19–20 May 2011, Baltimore, MD. *Biologicals*, **40**, 162–167.
- TELLEZ S., CASIMIRO R., VELA A.I., FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., EZQUERRA R., LATRE M.V., BRIONES V., GOYACHE J., BULLIDO R., ARBOIX M. & DOMINGUEZ L. (2005). Unexpected inefficiency of the European pharmacopoeia sterility test for detecting contamination in clostridial vaccines. *Vaccine*, **24**, 1710–1715.

VAN BORM S., ROSSEEL T., STEENSELS M., VAN DEN BERG T. & LAMBRECHT B. (2013). What's in a strain? Viral metagenomics identifies genetic variation and contaminating circoviruses in laboratory isolates of pigeon paramyxovirus type 1. *Virus Res*, **171**, 186–193.

VICTORIA J.G., WANG C., JONES M.S., JAING C., MCLOUGHLIN K., GARDNER S. & DELWART E.L. (2010). Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J. Virol.*, **84**, 6033–6040.

WANG J., LUNT R., MEEHAN B., et al. (2014). Evaluation of the potential role of next-generation sequencing (NGS) in innocuity testing. Technical Report CSIRO, Australian Animal Health Laboratory.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1998). WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series, Report No. 858. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2012). WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization Technical Report Series, Report No. 964. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available online at: [http://www.who.int/biologicals/WHO\\_TRS\\_964\\_web.pdf](http://www.who.int/biologicals/WHO_TRS_964_web.pdf) (accessed 8 March 2017).

## AUTRES LECTURES

Details of methods and culture media will be found in the following books and also in commercial catalogues.

BARROW G.I. & FELTHAM R.K.A., eds. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

COLLINS C.H., LYNE P.M. & GRANGE J.M., eds. (1995). *Collins and Lyne's Microbiological Methods*, Seventh Edition. Butterworth Heinemann, Oxford, UK.

MURRAY P.R., ed. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*, Eighth Edition. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA.

\*  
\* \*

**NB :** ADOPTÉ POUR LA PREMIERE FOIS EN 1989. DERNIERES MISES À JOUR ADOPTÉES EN 2017.