

# SUR LA PREPARATION ET L'UTILISATION DES VACCINS ASSOCIES

## ANTIDIPHTERIQUE, ANTITETANIQUE ET ANTICOQUELUCHEUX EN IRAN. \*

par

H. Mirchamsy, H. Taslimi et M. Aghdachi.

Depuis 1940 jusqu'à ce jour, les anatoxines diphtérique et tétanique ainsi que le vaccin anticoquelucheux et les serums antitoxiques à la destination du pays sont préparés à l'Institut d'Etat Razi.

Au cours de ces 18 dernières années on voit une tendance ascendante pour la vaccination des enfants contre la diphtérie et la coqueluche.

Depuis 1950, le Service d'Hygiène du Ministère de la Santé Publique, vaccine les enfants de Téhéran et des grandes villes, contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche.

Récemment un programme de vaccination collective a été établi avec l'aide financier de l'Organisation du Plan Septennal afin de vacciner tous les enfants réceptifs du pays contre la diphtérie. Ce programme est actuellement en cours.

Dans cet article nous verrons brièvement l'évolution de la préparation de ces vaccins et les résultats déjà obtenus.

(\*) *Acta Medica Iranica IV, 1950.*

### *Toxine Diphtérique:*

#### **a) Milieu de culture à base de viande digérée par la pepsine.**

Dans une note publiée en 1946 par l'un de nous en collaboration avec L.P. Delpy (7), nous avons remarqué que les progrès dans le domaine de l'étude de la toxinogénèse du bacille diphtérique ont été très rapides à partir de 1922, date à laquelle la méthode du titrage par floculation de Ramon a été substituée aux titrages coûteux et longs *in vivo*. C'est cette méthode qui a permis de suivre jour par jour l'élaboration des toxines, tout en réalisant une énorme économie de temps et de matériel.

Au commencement de la production de la toxine diphtérique à l'Institut Razi, nous suivions les règles exposées en détail par Ramon (1939) (62) et Loiseau & Philippe (1939) (34).

#### *Souches Toxigènes:*

A cette époque on employait 4 souches de P. W. 8 en provenance de Londres, Stockholm et Albany, New - York. Sur les conseils de M. Philippe, de l'Institut Pasteur de Paris, les souches étaient entretenues en «Hypoxybiose».

Ainsi les souche étaient fréquemment repiquées dans le bouillon puis fixées sur sérum coagulé sous l'huile de vaseline.

Cette méthode ne nous a pas permis d'obtenir la stabilisation des souches et a même, dans certains cas, altéré sérieusement leur vitalité. Par contre, une nouvelle méthode que nous avons mise au point en collaboration avec L. P. Delpy (8), nous a permis de stabiliser nos souches et de régulariser la production de toxine. Cette méthode consiste à dessécher sous vide la suspension pure de bacilles diphtériques dans le sérum de cheval ou dans du lait écrémé, et à conserver les ampoules scellées sous vide à l'abri de la lumière. Des souches conservées depuis 8 ans par cette technique avaient parfaitement gardé leur fonction toxigène.

#### *Composition du Milieu:*

Au départ, nous utilisons le milieu de Loiseau & Philippe (1936). Ce milieu donne dans nos laboratoires des résultats irréguliers. En outre, sa préparation nécessite l'emploi d'estomacs de porcs, qu'il est difficile de se procurer en Iran en quantité suffisante.

Finalement, nous avons adopté une formule très simple. La nouvelle formule contenait une partie de macération et deux parties de digestion

pepsique de viande de veau; on ajoutait, en outre, 1% d'acétate de soude, 0,6% de maltose qui, selon Pope & Healey (52), a l'avantage de se dédoubler lentement sans acidifier brutalement le milieu, 0,2% de glucose selon Ramon (62), 0,5% de levure de bière et enfin 0 mg. 1 par litre du fer selon les travaux de Pappenheimer (50). Le fer est employé sous forme de sulfate ferreux, comme il a été indiqué par Barr & ses coll. (2).

Avec ce milieu, l'addition de glucose et de maltose dans les proportions indiquées, entraîne régulièrement l'acidité de la culture. L'acétate de soude amortit la chute initiale du pH, mais n'accélère pas sensiblement le retour à l'alcalinité.

Par contre, l'addition de 0,5% de levure régularise le redressement du pH. Le premier voile se forme en moins de 24 heures; après 3 jours il se fragmente en lambeaux qui tombent au fond du vase, et est remplacé par un second voile qui fait place à un troisième dans les jours suivants.

En 1943, il devint impossible de se procurer en Iran du glucose et du maltose de bonne qualité, et l'emploi de produits douteux entraîna une série d'échecs. Nous avons alors essayé une préparation de laboratoire; voici le principe de sa préparation:

Avec de l'orge germée on prépare une farine grossière (malt) que l'on peut conserver pendant des mois. On mélange une partie de cette farine avec quatre parties d'eau. On chauffe au bain-marie à 63° C en agitant jusqu'à ce que le mélange ne renferme plus trace d'amidon (virage d'eau iodée du bleu au violet, puis au rouge).

Finalement, lorsque l'hydrolyse est assez avancée, il ne se produit aucun changement de couleur de l'eau iodée. On porte à 80° C pour détruire l'amylase, on filtre le mélange sur toile, puis sur bougie L 3. La proportion optimale de ce sirop dans le milieu est de 3%. Les résultats obtenus sont au moins aussi bons et plus réguliers qu'avec les sucres du commerce.

On a étudié longuement le genre des flacons de culture, le volume et surtout le rapport surface/volume dans la toxino-génèse du bacille diphthérique. D'après les travaux de Marbré et al (35), le glucose et le maltose ne sont convenablement utilisés que si l'oxygénation de la culture est suffisante. Pour réaliser cette oxygénation, ils emploient un très petit volume de bouillon représentant un très grande surface d'aération. Le rapport S/V dans leurs expériences est 0,56.

Taylor (71) réduit encore le volume et amène le rapport S/V à 1,20. Loiseau et Philippe, dont la technique a été suivie en Iran pendant 2 ans, fixent ce rapport à 0,56 pour obtenir une augmentation en Lf/ml de 38%. Nos études détaillées sur ce sujet nous permettent de conclure que la surface de culture doit être aussi grande que possible, mais il convient de respecter

une certaine proportion entre cette surface et le volume du milieu. En augmentant la valeur S/V par diminution de V, on obtient une élévation de titre (Lf/ml). mais la quantité totale de toxine produite est considérablement diminuée. En effet, l'alcalinisation progresse très rapidement, et les conditions favorables à la toxinogénèse ne sont réalisées que pendant très peu de temps. L'aération des cultures, d'autre part, doit être suffisante. On arrive à éviter les irrégularités en titre, souvent observées d'une boîte à l'autre, en assurant le renouvellement journalier de l'atmosphère de ballons.

En résumé, dans les conditions que nous venons d'écrire, on obtient une toxine de 40 à 60 Lf/ml, avec D.M.M. de l'ordre de 1/5000 pour les cobayes de 250 gr; mais la pureté, examinée en Lf/mg d'azote protéinique est basse. Ce produit transformé en anatoxine par l'addition de formol et le chauffage à l'étuve, selon la formule préconisée par G. Ramon (59), est l'anatoxine brute qui, depuis 1943 jusqu'à 1948, était le seul vaccin employé en Iran.

Il convient de faire remarquer que cette anatoxine a une haute valeur antigène; en effet, outre les résultats de contrôles classiques de l'efficacité sur le cobaye, nous avons observé qu'un certain nombre des chevaux fournisseurs du sérum et hyperimmunisés avec cette anatoxine, possédaient souvent des titres qui tantôt dépassaient 2000 U.A/ml, titres que nous ne pouvons obtenir actuellement en employant les antigènes hautement purifiés, précipités par l'alun ou adsorbés sur phosphate d'alumine. Nous pensons que cette anatoxine doit renfermer une quantité notable des adjuvants naturels décrits par Lahiri (26).

#### **b) Toxine à base de digestion trypsique.**

Les réactions quelquefois fâcheuses, souvent observées chez les enfants vaccinés avec l'anatoxine brute, à base de peptone, nous obligent à employer des milieux plus purs. A partir de 1947, on emploie la technique de Pope, Linggood (53, 54) et du Japonais Mitsuhachi (38), pour la préparation de toxine dans le milieu à base de l'hydrolyse trypsique de viande. Plus tard, on essaie avec succès la culture submergée, mise au point par Linggood (29, 30, 31, 32, 33), mais on doit provisoirement l'abandonner par suite du manque d'un équipement de fabrication, à titre industriel.

La toxine ainsi préparée est relativement pure. Elle contient 60 à 80 Lf/ml, 700-1200 Lf/mg N.P. et, comme nous verrons plus loin, elle peut être purifiée et adsorbée sur des composés d'alumine.

#### **c) Milieux à base de l'hydrolysate de Caséine.**

La nécessité de l'emploi des vaccins associés hautement purifiés et

adsorbés sur l'alumine tels qu'ils sont employés en Amérique et dans un certain nombre de pays européens, nous amène finalement à l'emploi des milieux semi-synthétiques à base de l'hydrolysate de caséine.

Dès 1951, nous avons essayé le milieu de Mueller (43, 44, 45). La meilleure formule qui nous a donné un résultat satisfaisant est celle des laboratoires de la Santé publique-Boston (56).

Cette formule de milieu de Mueller nous a rendu de grands services de 1951 à 1954.

A cette époque, on devait remplacer également la technique de Mueller par une technique plus économique, car, comme on le sait, la plupart des ingrédients de ce milieu semi-synthétique doivent être achetés à l'étranger. On commence alors à préparer l'hydrolyse acide de caséine, selon les conseils du Dr. Holt, de l'Institut Wright-Flemming de Londres (17). 1

Cependant, des circonstances locales nous obligent à modifier légèrement la formule de Holt. Le procédé de cet auteur actuellement adopté été mis au point dans le Service de Biochimie de l'Institut par nos collègues J.L. Delsal, H. Manhoury et A. Korour.

*Préparation de milieu à base de l'hydrolysate acide de Caséine. Solutions mères:*

**L'hydrolyse de caséine.** Muller (1939) (43) effectue l'hydrolyse acide de caséine avec presque Hcl 8 N; Holt en 1950 (17) adopte la même concentration du Hcl. Spies et Chamber en 1951 (67), puis Spies en 1952 (68), dans l'hydrolyse de caséine pour d'autres buts, réduisent la concentration du Hcl à 3 N en augmentant la durée de l'hydrolyse à 20 heures. Nous appliquons la dernière technique comme suit: A 1 kg de caséine B.D.H. (White light soluble) on ajoute 5000 ml de Hcl 3 N; le tout mélangé dans un ballon Pyrex de 12 litres, communiqué à un réfrigérant à reflux et sur un bain de sable. La suspension reste en ébullition pendant 20 heures; à la fin de la digestion, on obtient une solution noire contenant l'hydrolysate complet de caséine. Ce produit contient les acides aminés libérés par l'hydrolyse qui se combinent avec Hcl pour former des chlorhydrates; en outre, une grande partie du Hcl est libre; on élimine cet excès d'acide par une distillation poussée sous vide.

---

*1 H. MC remercie le Dr. Holt pour son précieux concours et les renseignements techniques qu'il a bien voulu fournir au Cours de sa visite à l'Institut Wright-Flemming de Londres.*

On obtient finalement une pâte noire que l'on dissout dans 2000 ml d'eau distillée.

*Decoloration au Charbon:*

La décoloration se fait selon la formule de Holt à pH 5.0, mais avec 200 gr de charbon Darco G 60. Voici le détail de l'opération: On ajuste le pH de la pâte à 5.0-5.3 en ajoutant 800 ml de NaOH 36%.

On laisse refroidir la suspension, puis on y ajoute à deux reprises 100 gr de charbon Darco G 60. Après chaque traitement au charbon, on filtre le tout sur disques de papier filtre sans fer (Whatman No 40) passés sur des entonnoirs, genre Büchner; on lave chaque fois le précipité avec 1000 ml d'eau distillée bouillante; on obtient ainsi un liquide jaune pâle contenant tous les acides aminés déjà mentionnés.

*Déferrisation avec le phosphate de Ca.*

On ajoute à la solution déjà décrite une solution de 90 gr  $K_2 HPO_4$  dans 200 ml  $H_2O$  distillée; le pH sera ajusté à 7.6 avec NaOH 36%. On y ajoute ensuite à deux reprises 4 gr de  $CaCl_2$  anhydre dissous dans 50 ml.  $H_2O$  distillée. Chaque fois on chauffe le mélange à  $80^\circ C$ , on filtre sur papier-filtre sans fer sur des büchners, puis on lave le précipité retenu sur filtre avec 300 ml d'eau distillée bouillante. Le filtrat est l'hydrolyse totale de caséine que l'on distribue dans des flacons stériles et qu'on garde à froid sous chloroforme avant l'utilisation dans le milieu de culture. Généralement le rendement de cette digestion est de l'ordre de 70 à 75%. Cet hydrolysate doit avoir les particularités suivantes:

- 1) Le rapport NaCl soluble sur amino-N ne doit pas dépasser 5.
- 2) La teneur en fer ferreux ( $Fe^{++}$ ) doit être inférieure à 2 gamma 10 ml.

*Solution N° 11 de Mueller.*

Cette solution se compose des sels et des éléments absolument nécessaires à la culture de bacille diphtérique.

On prépare comme suit:

Mg $SO_4$ , $H_2O$	22,5 gr
Acide nicotinique	0,115 gr
Beta-alanine	0,115 gr
Acide pimélique	0,0075 gr
Cu $SO_4$ , $5H_2O$ 1%	5 ml

Zn SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O 1%	4 ml
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O 1%	1,5 ml
HCl concentré	3 ml
Eau distillée q.s.p.	100 ml

On dissout séparément l'acide nicotinique dans 1 ml d'eau distillée avec quelques gouttes de HCl concentré; on l'ajoute alors à la solution déjà décrite. On peut garder pour une longue durée cette solution à la température du laboratoire.

*Solution 10% de L. cystine.*

On dissout à chaud 100 gr de L. cystine dans 300 ml de HCl 3N.

On filtre cette solution dans un flacon de 2,5 litres contenant 1,5 litre HCl 10 N. On la laisse une nuit à +4° C pour que L. cystine HCl se cristallise bien. Le lendemain, on filtre les cristaux sur «Sinter glass filtre»; on lave le filtre avec 150 ml HCl 10 N, on dissout le résultat dans l'eau distillée, on amène le volume à 1000 ml, on obtient ainsi une solution de 10% de L. cystine sans fer.

*Solution de sulfate ferreux à 50 gamma Fe++/ml.*

On prépare la solution suivante:

Fe SO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 6H <sub>2</sub> O	351 mg
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> concentré	1 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

On distribue cette solution dans des ampoules de 50 ml, puis on les stérilise à l'autoclave.

*Solution de Maltose-CaCl<sub>2</sub>.*

Maltose	250 gr
Ca Cl <sub>2</sub> anhydre	2 gr
Eau distillée q.s.p.	1000 gr

On dissout d'abord le CaCl<sub>2</sub> dans 500 à 600 ml d'eau distillée, on y ajoute le maltose et on amène le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée, on agite pour diluer le maltose, puis on filtre sur papier filtre sans fer (Whatman N° 40) pour la distribution dans des tubes Pyrex de 18 x 18 à raison de 10 ml par tube.

On stérilise enfin le maltose distribué à 115° C. pendant 15 minutes, puis on le conserve à +4°C.

### **Préparation de milieu.**

Hydrolysate de caséine: ml équivalent de 1,2 gr N. aminé.	
Sol. N° II de Mueller	2 ml
L. cystine	4 ml
Ac. glutamique-HCl	ml 1
Thiamine-HCl (sol. à 25 mg% dans l'alcool à 25%)	1 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

On dissout d'abord l'hydrolysate de caséine et l'acide glutamique dans 500 à 600 ml d'eau distillée, on y ajoute le reste des solutions et on amène le volume à 1000 ml. Le pH arrive à 7.6 à l'aide de NaOH 36%; on y ajoute finalement la quantité optimum de sol. de sulfate ferreux que l'on détermine comme nous allons le décrire.

On distribue le milieu ainsi préparé dans des boîtes de Roux de Pyrex de 1 litre à raison de 160 ml par boîte. Les boîtes sont stérilisées à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes.

Après refroidissement, on ajoute aseptiquement à chaque boîte le contenu d'un tube de maltose-CaCl 2. Les boîtes seront alors examinées avec l'une des 2 souches P.W. 8 N° 42112 ou 5159 reçues des laboratoires de la Santé publique, Albany New York.

### **Détermination de l'optimum du fer ferreux.**

Comme nous l'avons décrit à propos de milieu pepsique, Pappenheimer et Jahnsen en 1936 (49), puis Pappenheimer en 1947 (51) ont démontré qu'en l'absence du Fe++ la toxine diphtérique ne se forme pas et que par addition progressive du fer ferreux la toxinogénèse s'établit et la pousse augmente. Finalement, d'après Clarke (1958) (5), quand le taux du fer ferreux atteint 0,22/ml on aura le maximum de toxine. Si le taux du fer dépasse cette quantité, la pousse bactérienne augmente, mais la formation de la toxine diminue progressivement pour s'arrêter complètement.

Ainsi, le rôle du fer dans la production de toxine diphtérique est capital.

Pour déterminer l'optimum du fer dans chaque lot de fabrication, on opère comme suit:

On digère 5 kg de caséine; la solution finale des acides aminés est suffisante pour préparer 400 litres de milieu de culture.

On prépare un lot d'essai de 10 litres; les ingrédients étant très purs et la déferrisation étant à peu près complète, il y a des traces de fer dans le milieu. On divise les boîtes en 7 séries de 8 boîtes. Avant l'ensemencement, on ajoute des quantités variables de fer déjà préparé sous forme de 50 gamma

Fe/ml comme il a été indiqué dans le tableau suivant:

N° de Série	Nombre de gouttes par boîte 16 gouttes = 1 ml	Taux du fer ajouté	Lf/ml
1	0	0	32
2	1	0,028/ml	48
3	2	0,04	54
4	3	0,06	64
5	4	0,08	67
6	5	0,10	51
7	6	0,12	51

L'optimum du fer pour ce lot étant 4 gouttes pour 160 ml de milieu, on ajout cette quantité de fer au reste du lot.

## TOXINE TETANIQUE

### Milieux à base de digestion enzymatique de viande.

Depuis 1941, la toxine tétanique est préparée à l'Institut Razi selon la formule de Prévot et Boorsma (55). On emploie comme souche toxigène la souche R. de l'Institut Pasteur de Paris.

Ce milieu pepsique est le seul utilisé jusqu'à 1954, date à laquelle nous avons eu connaissance des travaux de G. Ramon et al (1,63,64).

D'après ces travaux, un milieu simple à base de digestion pepsique-papaïnique de viande peut servir avantageusement pour la préparation à grande échelle de la toxine tétanique.

L'anatoxine correspondante ainsi préparée nous sert depuis 1946 jusqu'à ce jour pour l'hyperimmunisation de centaines de chevaux fournisseurs de sérum antitétanique. Cette anatoxine, tenant compte de la formule de Turpin et al (72) nous servait également pour la vaccination humaine.

### Purification de l'anatoxine tétanique.

A partir de 1951, nous cherchions à purifier l'anatoxine tétanique

déjà décrite pour l'adsorber sur phosphate d'alumine et l'incorporer dans la gamme des vaccins associés.

On a appliqué la technique de purification par l'acide trichloracétique de Boivin et Izard (3) déjà appliquée à la purification de l'anatoxine tétanique par Ramon et ses collaborateurs (61).

D'après Ramon, la valeur antigénique du produit ainsi purifié n'est pas notablement abaissée. Cet auteur remarque également que le rendement du procédé est de l'ordre de 80 à 90%.

Il indique de même que, le produit ainsi concentré et redilué dans l'eau physiologique pour être ramené à son titre initial aura un Kf (temps de floculation) trop prolongé; l'auteur pense que l'absence d'un certain nombre de facteurs existant dans l'anatoxine brute est la cause du ralentissement de la floculation dans l'antigène tétanique purifié et dilué. Finalement, l'auteur conclut que la purification par l'acide trichloracétique n'altère pas sensiblement les propriétés immunisantes de l'anatoxine tétanique. La purification de l'anatoxine tétanique par l'acide trichloracétique a été effectuée par d'autres chercheurs. Notons parmi les travaux les plus récents celui de Sujan et al (69).

Cet auteur obtient à partir d'une anatoxine brute (milieu Taylor) un produit de 250-940 Lf/mg N.P. avec un rendement de 67 à 100%.

Nous avons longuement étudié cette méthode de purification dont un certain nombre de résultats est publié ailleurs (10).

Comme il a été indiqué, la précipitation de l'anatoxine par l'acide se fait à +4° C et à pH 4.0. Les lavages du précipité avec un tampon phosphaté sodique M/300 de pH 6.8 se font également à +4°C.

A la suite de la congélation et de la décongélation du précipité obtenu par l'action de l'acide trichloracétique à pH 4.0 et redissous dans l'eau physiologique, une grande partie des protéines non spécifiques sont insolubilisées, de sorte que la pureté du produit final est de l'ordre de 1800-2000 Lf/mg N. protéine, avec un rendement de 75-85%.

Il faut se rappeler que le titrage in vitro se fait par floculation de Ramon (58). Pour éliminer le phénomène de zone, nous employons un sérum étalon purifié et concentré par la technique enzymatique de Pope adoptée à l'Institut Razi (9).

Cette antitoxine, chauffée pendant une heure à 55°C, selon le procédé de Goldie et al (12), donne une seule zone de floculation dans un délai raisonnable; dans nos sérums purifiés et chauffés, il y a quelquefois une deuxième zone de floculation qui apparaît après 10 heures et qui doit être attribuée aux anticorps antimicrobiens.

De plus, nous comptons toujours comme vrai titre, le titre le plus bas

qui, selon Moloney et al (41) ainsi que d'après Van Ramshorst et al (73) correspond à la valeur de combinaison exacte de toxine-antitoxine.

Malheureusement, la purification à l'acide trichloracétique de l'anatoxine tétanique, préparée dans le milieu de Prévot, n'a pas seulement malgré les précautions et les mesures envisagées, l'inconvénient de ralentir le temps de la floculation dans le produit purifié et dilué, mais nous observons que son pouvoir antigène est fortement touché.

En effet, on dilue le produit concentré à 35 Lf/ml que l'on adsorbe sur l'hydroxyde d'alumine. L'injection de 1 ml de ce produit aux cobayes de 350 gr protège après 2 semaines un nombre restreint de cobayes éprouvés avec 20 D.M.M. de toxine stabilisée sèche. Il arrive même que l'injection de 5 ml de ce produit ne protège pas 50% des cobayes traités comme nous venons de le dire.

Nous avons donc tâché de remplacer cette méthode de purification par une technique plus saine qui respecte la valeur antigène intrinsèque. Plusieurs méthodes ont été essayées. La méthode compliquée de Eaton et Gronau (1) nous donne un produit final relativement pur mais un rendement bas, ne dépassant pas 23%. La méthode à l'hexamétaphosphate de sodium-acide sulfurique, décrite par Jacob (20) et par Raynaud et al (65), n'a pas été appliquée, car, d'après Raynaud, ce procédé de purification peut éveiller la légère toxicité contenue dans le produit brut de départ. La méthode de Moloney (40) basée sur le fonctionnement au sulfate d'ammonium malgré la conservation de la qualité antigène et le rendement de 50 à 65%, appliquée à l'anatoxine brute de Prévot et Boorsma, nous donne des produits impurs de 50 à 250 Lf/mg N.P. ce qui ne peut être considéré comme un produit convenable pour adsorber sur les composés d'alumine.

On a, par conséquent abandonné la préparation de ce genre de toxine tétanique difficile à purifier. A partir de 1951, nous préparons nos anatoxines tétaniques à l'usage humain dans le milieu de Mueller (46,47,48). Ce milieu est à base d'hydrolyse enzymatique de caséine (N-Z case sheffield). Il contient également des acides aminés, des vitamines et d'autres facteurs nécessaires à la toxinogénèse du bacille tétanique.

Pour l'ensemencement, on a recours à la souche asporogène de Harvard. Les détails de la préparation ainsi que les modifications basées sur nos conditions locales seront publiés ailleurs.

Il faut cependant se rappeler, comme nous l'avons démontré récemment (36,37,38), qu'il est possible d'extraire la toxine incluse dans les bacilles à la fin de la culture et dans la culture même par des différents moyens, surtout par congélation et décongélation. Cette intervention augmente à la

fois la toxicité et l'antigénicité de la toxine préparée.

Notre technique de purification est la méthode de fractionnement au sulfate d'ammonium de Levine (28). Le produit final, qui est d'une pureté de 1200 à 1700 Lf/mg N.P. est dilué à 36 Lf/ml et adsorbé sur le phosphate d'alumine naissant, procédé recommandé également par Levine.

## CONTROLES DES ANATOXINES.

### Contrôle de l'efficacité:

Tenant compte des discussions et des décisions techniques des Comités d'experts de l'O.M.S. pour la standardisation biologique (18, 19, 57, 74, 75, 76), nous avons pour le moment adopté le principe des méthodes de contrôle de L. Greenberg (13, 14, 15, 16), effectuées pendant des années dans les laboratoires de la Santé publique du Canada.

Le principe du contrôle d'efficacité de L. Greenberg est le suivant:

On injecte l'équivalence de la demi dose vaccinale de l'homme aux cobayes d'un poids 300 à 400 gr. Après quelques semaines on éprouve ces animaux avec 20 D.L. de toxine correspondante.

Les témoins ayant reçu 1 D.L. de toxine doivent succomber en un délai de 4-5 jours, les vaccinés doivent en général résister à cette épreuve.

Le procédé du contrôle de l'efficacité suivi à l'Institut Razi, ayant le même principe, est plus sérieux en ce qui concerne l'épreuve des animaux.

On vaccine par voie sous cutanée 20 cobayes de 250 à 300 gr (antigène diphtérique adsorbé) avec 0.5 ml de produit contenant 15 Lf de l'anatoxine et 3.5 mg phosphate d'alumine. Dans le cas de l'antigène tétanique, les cobayes pèsent 350 à 400 gr et l'inoculum contient 10 Lf d'antigène et 3.5 mg de phosphate d'alumine sous volume de 0.5 ml.

Après 14 jours, on éprouve ces animaux comme suit:

#### 1) Toxine diphtérique stabilisée:

8 cobayes                    20 D.L.

6 cobayes                    100 D.L.

6 cobayes                    500 D.L.

2 cobayes (témoins) 1 D.L.

#### 2) Toxine tétanique sèche et conservée sous vide:

8 cobayes                    20 D.L.

6 cobayes                    500 D.L.

2 cobayes                    1000 D.L.

2 cobayes (témoins) 1 D.L.

La D.L. étant calculée pour les cobayes de 250 gr (diphthérie) et 350 gr (tétanos), on ajoute un excès de toxine équivalent à l'excès de poids afin de régulariser l'épreuve.

D'une manière générale, les cobayes éprouvés avec 20 et 100 D. L. de toxine diphthérique ainsi que ceux éprouvés avec 20 et 500 D.L. de toxine tétanique résistent à l'épreuve. 1 ou 2 cobayes sur 6 éprouvés avec 500 D.L. de toxine diphthérique succombent à la suite de l'épreuve. De même, parmi les cobayes éprouvés avec 1000 D.L. de toxine tétanique, on voit quelquefois 1 ou 2 cobayes atteints d'une paralysie locale. Les témoins des deux groupes meurent régulièrement à la suite de l'empoisonnement diphthérique ou tétanique.

#### **Epreuve d'innocuité:**

Pour chaque lot d'antigènes diphthériques ou tétaniques, on vaccine 6 cobayes de 400 gr comme suit:

3 cobayes reçoivent 2 fois la dose totale humaine (soit 2 cc) par voie sous cutanée;

3 cobayes reçoivent la même dose par voie intramusculaire.

Ces animaux sont surveillés durant 4 semaines; leur poids doit augmenter régulièrement.

#### **Contrôle de stérilité:**

On ensemence les vaccins sur bouillon nutritif, gélose peptonée, bouillon-viande (milieu des laboratoires de Wellcome) et finalement sur thioglycollate (Difco).

La durée de conservation des cultures à l'étuve est de 10 jours.

#### **Préparation de vaccin anticoquelucheux**

Depuis 1906, date de la découverte de l'agent causal de la coqueluche par Bordet et Gengou (4) jusqu'à 1931 où Leslie et Gardner (27) déclarèrent la présence de phases ou plutôt le passage rapide du type lisse (riche en antigène vaccinant) aux types rugueux pauvres en antigène vaccinant, on a publié des travaux innombrables sur l'efficacité du vaccin anticoquelucheux.

Mais c'est à partir de cette date qu'on voit des observations à base scientifique. Notons en passant les travaux de Sauer en 1933 (66) et surtout les travaux remarquables de Kendrick et de ses collègues de laboratoires du Michigan, Department of Health, à Grand Rapid (21, 22, 23, 24, 25).

D'après ces auteurs le vaccin anticoquelucheux préparé avec des

souches lisses sur milieu de Bordet-Gengou, précipité par l'alun et employé seul ou associé au vaccin antidiphthérique, diminue la mortalité parmi les enfants vaccinés. La maladie chez les enfants vaccinés est également bénigne et sans complications.

En Iran, nous préparons le vaccin anticoquelucheux depuis 1948. Au départ, la culture se faisait sur milieu au sang de mouton de Bordet-Gengou. En 1951, on met en marche la préparation du milieu liquide de Cohen-Wheeler (6). Ce milieu à base d'acides aminés de caséine contient également des sels, du dialysat de levure et des facteurs de croissance. On emploie souvent les 3 souches américaines du "State Department of Health de New York", et 5 souches du "Department of Health Michigan".

Ces souches sont soigneusement repiquées et conservées, de façon que leur pouvoir dermo nécrotique sur le lapin ainsi que le pouvoir agglutinant (1/4800) avec le sérum anti-phase 1 ne se modifient pas.

Le détail du repiquage et des cultures successives est celui déjà décrit par Cohen et Wheeler, cependant, comme nous effectuons la culture sous aération forcée, la culture finale se fait dans des ballons de 6000 ml, contenant 1800 ml de culture et des billes de verre. Nous avons eu l'idée d'aérer les cultures en visitant le service du Dr. Biaudelle, à Statens Baktteriologiska Laboratorium, Stockholm. \*

Pour barboter l'air stérile à travers les cultures, nous avons pensé à intercaler des bougies Chamberland L 3 sur des croix Legroux ou directement sur les ballons. La planche 1 illustre la marche des ces opérations.

En poursuivant cette technique, nous obtenons des cultures de 24 à 30 milliards/cc après 72 heures de culture à 35°C, tandis que dans les cultures non aérées effectuées dans des boîtes de Roux, le titre ne dépassait pas 11 milliards/cc.

#### **Contrôle de l'efficacité.**

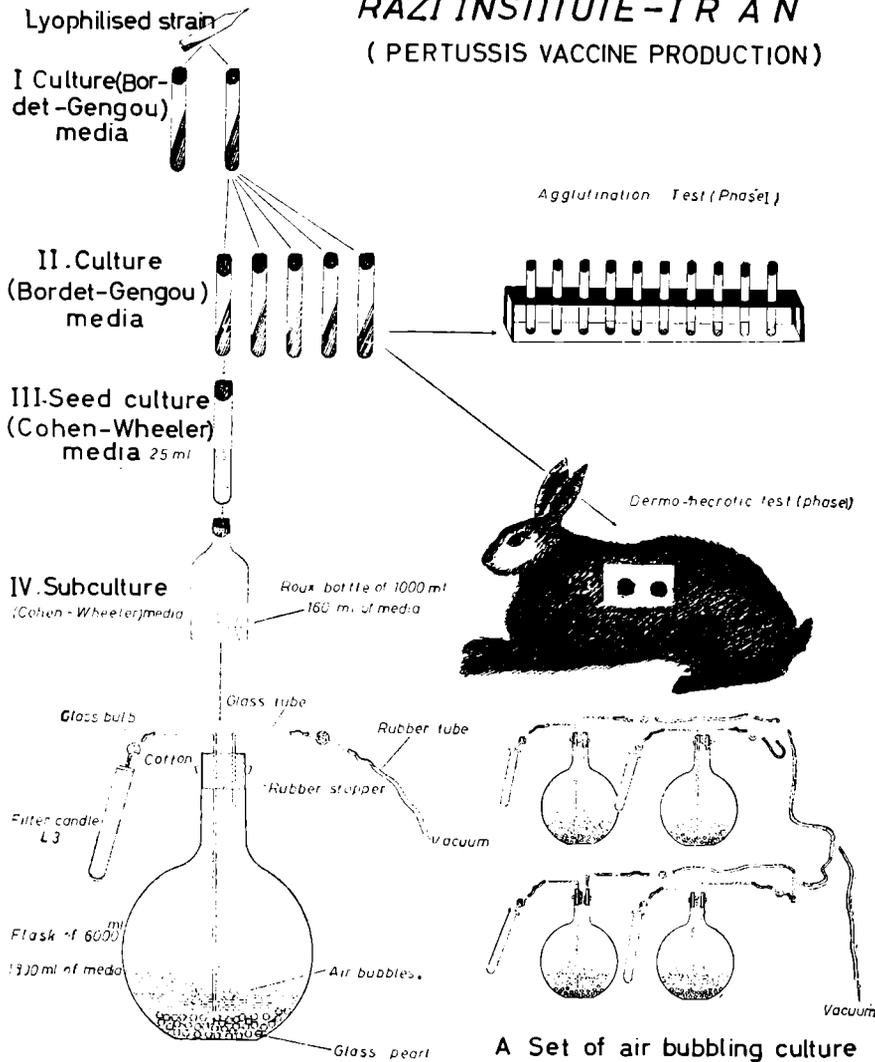
Après récolte du vaccin et élimination des flacons éventuellement contaminés On conserve la culture merthiolatée à 0,01% pendant 3 mois à +4°C.

Après ce laps de temps, on effectue le test de protection de la souris blanche, suivant la technique utilisée au Michigan Department of Health, Grand Rapid, Michigan. D'une manière générale, chaque lot de fabrication

---

(\*) *H. MC remercie ses collègues suédois du "Serum Institut" de Stockholm et surtout le Professeur G. Olin, Directeur, Dr. Biaudelle, Chef du Service de la préparation du vaccin anticoquelucheux et Dr. Silverstolp pour leur accueil amical durant ses visites à Stockholm.*

**RAZI INSTITUTE - I R A N**  
( PERTUSSIS VACCINE PRODUCTION )



**Lot culture**

locale est contrôlé comparativement avec le vaccin de référence de N. I. H. Bethesda-Maryland. Nous acceptons les lots dont l'efficacité est au moins égale à celle du vaccin de référence.

Les contrôles d'innocuité et de stérilité se font d'après la méthode adoptée au Michigan Department of Health, Grand Rapid.

Telle est l'évolution de la préparation des vaccins diphtérique, tétanique ou coquelucheux employés seuls ou associés depuis 1940 en Iran.

## RESULTATS DES VACCINATIONS COLLECTIVE

Malgré la vaccination en masse effectuée à Téhéran et dans beaucoup d'autres grandes villes du pays, nous possédons de rares informations sur les résultats déjà acquis. Au cours de ces dernières années, à la suite de chaque épidémie d'intensité et d'ampleur variables, le Ministère de l'Hygiène Publique, vaccine les enfants dans les écoles ou dans les maternités. C'est ainsi qu'en hiver 1956 (Azar-Dey) 1334), un programme de vaccination collective fut exécuté à Téhéran. La morbidité de la diphtérie, d'après les statistiques du Ministère de l'Hygiène, dans les années 1953-1956, oscille entre 2300-2600.

Déjà à Téhéran, le Dr G. Motamedy (42) note, pour l'année 1956, 604 cas de diphtérie avec 100 décès. Ce chiffre, en comparaison avec ceux des pays où la vaccination collective s'effectue régulièrement, est très élevé. En effet, la population de Téhéran, d'après le recensement de 1957 (Azar 1335), étant 1.512.082 personnes, l'indice de morbidité sera 40 pour 100.000 personnes. Le tableau suivant publié dans le remarquable travail de Tasman et Lansberg, 1957 (70), est significatif:

**Tableau 1**

Cas de diphtérie, pour 100,000 personnes, déclarés dans différents pays de 1941 à 1952.

Pays	1941	1944	1946	1948	1951	1952
Hollande	60,65	656,49	286,64	44,01	26,86	26,98
Angleterre	121,68	54,65	28,07	8,22	1,59	0,96
Belgique	52,34	78,22	43,97	15,51	5,00	6,16
Danemark	23,90	83,87	24,05	3,75	0,72	0,30
U.S.A.	13,50	10,25	11,58	6,55	2,68	1,95

Il est évident que dans la plupart des pays occidentaux la diphtérie est en voie de disparition, grâce à la vaccination collective.

### Contrôle de l'immunité par la réaction de Schick.

A notre connaissance Motamedi (42) a, le premier, publié en Iran les résultats des Schick-tests effectués sur 357 enfants de différentes crèches et écoles primaires de Téhéran. Le tableau No. 2 est emprunté de cet auteur

**Tableau 2**  
**Résultats de Schick-test dans certaines**  
**écoles de Téhéran, d'après**  
**G. Motamedi (Mars 1950)**

Age	Total d'injections	Réactions Négatives	Réactions Positives	% positif	% négatif	Pseudo réactions
3 ans	5	1	4	80	20	
4 "	8	2	6	75	25	
5 "	15	6	9	60	40	
6 "	12	5	7	5	42	
7 "	132	85	47	39	61	
8 "	44	31	13	30	70	
9 "	20	15	5	25	75	
10 "	4	3	1	25	75	
11 "	3	1	2	67	33	
12 "	26	16	10	38	62	
13 "	45	30	15	33	67	4
14 "	28	21	7	25	75	4
15 "	15	7	8	47	53	1
et plus						

Etant donné le nombre restreint dans chaque groupe d'âge des enfants vaccinés, on ne peut pas conclure définitivement d'après les données de ce tableau; cependant, le pourcentage assez élevé des sujets sensibles dans tous les âges est alarmant. Finalement, sur décision du Ministère de

l'Hygiène Publique, une campagne de vaccination antidiphtérique commença son travail régulier à partir de 1954, d'abord à Téhéran, ensuite dans les grandes villes; ce programme est actuellement développé et couvre presque tout le pays.

En hiver 1957 (Bahman 1335), on a voulu contrôler les premiers résultats de la vaccination à Téhéran\*. On a fait un Schick-test dans plusieurs écoles primaires dont une partie des enfants avaient été vaccinés 12 mois auparavant. Le tableau N° 3 résume ces résultats.

**Tableau 3**  
**Schick-tests effectués dans certaines écoles**  
**primaires à Téhéran - Février 1957.**

Age	Total d'injections	Nombre de garçons	Nombre de filles	Réactions Négatives	Réactions positives	% positif
7 ans	1.915	1.017	898	1.603	312	16,2
8 "	1.682	957	725	1.448	234	13,91
9 "	1.462	729	733	1.284	178	12,17
10 "	328	170	158	306	22	6,7
Total	5.387	2.873	2.514	4.641	746	13,84

Il est à remarquer que les pseudo-réacteurs sont figurés dans les groupes négatifs.

Au printemps de 1958, nous étions chargés de contrôler le degré d'immunité dans certaines écoles primaires de Téhéran, où les enfants ont été déjà vaccinés suivant un programme exact. Les détails de ces recherches seront publiés ailleurs. Cependant, certains résultats de ce travail seront décrits dans cet exposé.

Il faut se rappeler que notre but dans ces recherches était de vérifier la durée de l'immunité et l'état actuel des enfants vaccinés avec nos vaccins diphtérique ou associés diphtéro-tétanos.

Le tableau N° 4 résume les résultats du contrôle de Schick.

---

\* Nous remercions M. le Dr. Tabari, Directeur Général au Ministère de l'Hygiène Publique, qui a bien voulu mettre les résultats des Schick-tests à notre disposition.

Tableau 4

Schick-tests effectués dans certaines écoles primaires  
de Téhéran-Mirchamsy et coll. (Avril 1958)

Nom de l'école	Age année	Nombre d'enfants	Sexe	Positive		Pseudo Positive	Pseudo negative	Negative	%
				No.	%				
Kurosh . . . . .	7-12	502	mix.	17	3.4	15	2	468	96.6
Rouhi . . . . .	5-10	103	mix.	4	3.8	1	0	98	96.2
Ettehad . . . . .	7-16	455	mas.	14	3.0	5	0	436	97.0
Ettehad . . . . .	7-16	763	fem.	26	3.4	24	8	705	96.6
Cyrus . . . . .	4- 7	475	mix.	18	3.8	6	2	449	96.2
Bagh-Saba . . . . .	5- 8	41	mix.	1	2.5	0	0	40	97.5
FakhrAbad . . . . .	6-14	513	mix.	8	1.5	15	1	489	98.5
Darasht . . . . .	6-10	168	mix.	—	0	7	1	160	100.0
Gorgan . . . . .	6-10	189	mix.	10	5.3	4	2	173	94.7
Total		3209		98	3.0	77	16	3018	97.0

Notre enquête s'est faite sur plusieurs milliers d'enfants vaccinés de 1 mois jusqu'à 6 ans auparavant. On a saigné un groupe de 700 de ces enfants pour mesurer leur antitoxine diphtérique et tétanique.

Les résultats sont notés dans les tableaux N° 5 et 6.

Sans vouloir interpréter les résultats des tableaux N° 5 et 6 qui seront décrits dans une autre communication, notons en passant que la plupart de ces enfants ont une quantité suffisante d'antitoxine diphtérique ou tétanique qui les protège contre ces infections.

#### **Résumé et Conclusion:**

Depuis 18 ans, on prépare en Iran des anatoxines diphtérique, tétanique, et plus tard, le vaccin anticoquelucheux. Au départ, milieu de base pour la préparation de ces anatoxines était la viande de veau digérée par pepsine ou trypsine et il était difficile d'obtenir des produits purs à partir des milieux à peptone. Actuellement on emploie des milieux semi-synthétiques sans peptone et riche en acide aminés. Les anatoxines ainsi préparées sont hautement purifiées puis adsorbées sur les composés d'alumine.

Les résultats du contrôle de réceptivité des groupes d'enfants à la diphtérie par la réaction de Schick sont données en détail. De même, le titrage de l'antitoxine diphtérique et tétanique chez des écoliers antérieurement vaccinés, prouve l'efficacité de la vaccination collective actuellement effectuée en Iran.

#### **Summary**

Since 18 years diphtheria & tetanus toxoids and later on antipertussis vaccin have been prepared in Iran.

Result of using the Mixed vaccin has been given in detail.

The high efficiency of this type of combined vaccines is given.

Tableau 6 - Valeur de l'Antitoxine Tétanique 1 mois à 6 ans après vaccination

Date de l'injection	Vaccine injecté	Total d'enfants	au dessus au dessous	Antitoxine U/ml								
				0.002	0.004	0.01	0.02	0.10	0.50	1.0		
				0.002	0.004	0.01	0.02	0.10	0.50	1.0		
6 ans avant saignée	F. T.	12		5	1		2	2	2			
5 ans " "	F. T.	151		24	11	22	23	15	6			
4 ans " "	P. T. A. P.	59		8	6	12	13	12	5	2	1	
3 ans " "	P. T. A. P.	164		32	15	30	23	37	20	7	1	
2 ans " "	P. T. A. P.	133		5	10	11	15	24	45	21	2	
1 an " "	P. T. A. P.	57		6	3	2	4	15	21	3	3	
1 mois " "	P. T. A. P.	49			4	1	3	6	9	23	3	
Contrôles - non vaccinés	—	43		40	3							
Total d'enfants		618										



## BIBLIOGRAPHIE

- (1) G. Amoureux-C.R. Soc. Biol., 1943, 137, 351.
- (2) M. Barr, Glenny, C.G. Pope & F.V. Linggood-Lancet 1941, 13, 301.
- (3) A. Boivin & Y. Isard-C.R. Soc. Biol., 1937, 124, 25.
- (4) J. Bordet & O. Gengou-Ann. Inst. Past., 1906, 20, 731.
- (5) C.D. Clarke-J. Gen. Microb., 1958, 18, 697.
- (6) S.M. Cohen & M.W. Wheeler-Am. J. Publ. Health, 1946, 36, 371.
- (7) L.P. Delpy & H. Mirchamsy-Arch. Inst. Razi, 1946, 2, 1.
- (8) L.P. Delpy & H. Mirchamsy-C.R. Soc. Biol., 1945, 21, 22, 975.
- (9) J.L. Delsal & H. Mirchamsy-Rev. Immun., 1953, 17, 110.
- (10) J.L. Delsal & H. Mirchamsy-C.R. Ac. Sci., 1954, 239, 600.
- (11) D. Eaton & A. Gronau-J. Bact., 1938, 36, 423.
- (12) H. Goldie, C.H. Parson & M.S. Bowers-J. Inf. Dis., 1942, 71, 212.
- (13) L. Greenberg-W H O/BS/192, 1953.
- (14) L. Greenberg, C.A. Morrell & J. Gibbard-J. Immun., 1943, 46, 337.
- (15) L. Greenberg, C.A. Morrell & J. Gibbard-Bull. W H O, 1945, 12, 365.
- (16) L. Greenberg & M.J. Roblin-J. Immun., 1948, 59, 221.
- (17) L.B. Holt-Developpment in Diphtheria prophylaxis 1950, Londres.
- (18) Inst. Serol. Etat-Copenhagen-W H O/BS/125, 1951.
- (19) Inst. Serol. Etat-Copenhagen-W H O/BS/194, 1953.
- (20) Jacob & Jacobs-Gillis-J. Am. Pharm. Ass. Sc. 1951, 40, 488.
- (21) P.L. Kendrick-Am. J. Hyg., 1940, 32, 89.
- (22) P.L. Kendrick-Am. J. Pub. Health, 1942, 32, 615.
- (23) P.L. Kendrick-Am. J. Pub. Health, 1943, 29, 133.
- (24) P.L. Kendrick, P. Eldering, G. Dixon & M.K. Misner, Am. J., Publ. Health., 1947, 37, 803.
- (25) P.L. Kendrick, E.L. Updyke & G. Eldering-Am. J. publ. Health., 1949, 39, 179.
- (26) D.C. Lahiri-Indian J. Med. Res., 1951, 39, 229.
- (27) P.H. Leslie & A.D. Gardner-J. Hyg. Camb., 1931, 31, 423.
- (28) L. Levine & Stone, L.J.-J. Immun., 1951, 67, 235.

- (29) F.V. Linggood-Nature, 1946, 157, 264.
- (30) F.V. Linggood-Fourth Intern. Cong. Microb. Copenhagen, 1947, 347.
- (31) F.V. Linggood-Antti Del. VI Congr. Intern. Microb, Rome, 1953, 1, 767.
- (32) F.V. Linggood-Nature, 1955, 176, 1128.
- (33) F.V. Linggood-Nature, 1954, 174, 557.
- (34) Loiseau & Philippe-Ann. Inst. Past., 1939, 62, 469.
- (35) Marbré-C.R. Soc. Biol., 1933, 113, 489.
- (36) H. Mirchamsy & A. Sadegh-Ann. Inst. Past., 1958, 94, 396.
- (37) H. Mirchamsy & F. Nazari-Ann. Inst., 1958, 94, 400.
- (38) H. Mirchamsy-Ann. Inst. Past., 1958, 94, 402.
- (39) S. Mitsuhashi, M. Kurokawa & Y. Kojima-Jap. J. Exp. Med. 1950, 20, 261.
- (40) P.J. Moloney & J.N. Hennessy-Bioch. J., 1942, 36, 544.
- (41) P.J. Moloney & J.N. Hennessy-J. Immun., 1944, 48, 345.
- (42) G. Motamedi-Bull. Hyg. Publ., (Iran) 1957, 3, 197.
- (43) J.H. Mueller-J. Immun., 1939, 37, 103.
- (44) J.H. Mueller & E.R. Johnson-J. Immun., 1941, 40, 33.
- (45) J.H. Mueller & P.A. Miller-J. Immun., 1941, 40, 21.
- (46) J.H. Mueller & P.A. Miller-J. Immun., 1945, 50, 377.
- (47) J.H. Mueller & P.A. Miller-Modifications dactylographiées, 1951, Department of Health, Albany (U.S.A.)
- (48) J.H. Mueller & P.A. Miller-J. Bact., 1954, 67, 271.
- (49) A.M. Pappenheimer & S.J. Johnson-Brit. J. Exp. Path., 1936, 17, 335.
- (50) A.M. Pappenheimer-Brit. J. Exp. Path., 1936, 17, 434.
- (51) A.M. Pappenheimer-J. Biol. Chem., 1947, 161, 251.
- (52) G. Pope & Healey-Brit. J. Exp. Path., 1933, 14, 77.
- (53) G. Pope-Brit. J. Exp. Path., 1936, 17, 335.
- (54) G. Pope & F. V. Linggood-Brit. J. Exp. Path., 20, 297, 1939.
- (55) A.R. Prévot & H. Boorsma-Ann. Inst. Past., 1939, 63, 600.
- (56) Preparation of Diphtheria toxin & Toxoid-Manuscrit dactylographié et révisé en 1950. (Department of Health, Albany - New York).
- (57) R. Prigge-W H O/BS/214, 1953.
- (58) G. Ramon-C.R. Soc. Biol., 1922, 74, 661, 711.
- (59) G. Ramon-C.R. Soc. Biol., 1923, 88, 167.
- (60) G. Ramon-C.R. Ac. Sci., 1929, 189, 64.
- (61) G. Ramon, A. Boivin & R. Richou-C.R. Soc. Biol., 1937, 124, 32.
- (62) G. Ramon-Rev. Immun., 1939, 5, 385.
- (63) G. Ramon, G. Amoureux & J. Pochon-Rev. Immun., 1942, 7, 14.
- (64) G. Ramon, G. Amoureux & J. Pochon-C.R. Soc. Biol., 1943, 137, 35.
- (65) M. Raynaud, A. Turipin & M. Rouyer-Ann. Inst. Past., 1953, 85, 376.

- (66) L.W. Sauer-J. Am. Med. Ass., 1933, 100, 239.
- (67) J.R. Spies & D.C. Chamber-J. Biol. Chem., 1951, 191, 787.
- (68) J.R. Spies-J. Biol. Chem., 1952, 195, 65.
- (69) Surjan & P. Richter-Acta Microb. Ac. Sc. Hung., 1954, 1, 339.
- (70) A. Tasman & M.P. Lansberg-Bull. Wld. Hlth. Org. 1957, 16, 939.
- (71) Taylor-C.R. Soc. Biol., 1935, 119, 510.
- (72) A. Turpin, M. Raynaud & M. Rouyer-Ann. Inst. Past., 1952, 82, 299.
- (73) J.D. Van Ramshorst & Rijks-Antonie Van Leeuwenhock, 1954, 20.
- (74) W H O, Expert Committee Biologic Standard, rapport techn. Ser. 2, 5, 1950.
- (75) W H O, Expert Committee Biologic Standard, rapport techn. 36, 5, 1951.
- (76) W H O, Expert Committee Biologic Standard, rapport techn. 56, 5, 1952.