

WORLD HEALTH  
ORGANIZATION

ORGANISATION MONDIALE  
DE LA SANTÉ

WHO/Smallpox/16  
27 janvier 1961

ORIGINAL : ANGLAIS



COURS SUR LA PRODUCTION DE VACCIN ANTIVARIOLIQUE LYOPHILISÉ

par le

Docteur P. D. Meers  
Consultant de l'OMS, 1960

Introduction

Du 14 au 26 novembre 1960 a eu lieu à Yaba (Nigeria) un cours sur la production de vaccin lyophilisé. Il a été suivi par huit personnes, dont six boursiers des Régions de la Méditerranée orientale et de l'Afrique. Deux boursiers venaient de la République Arabe Unie et un respectivement de l'Iran, du Soudan, du Kenya et du Ghana. Les deux autres élèves venaient du Nigeria. La répartition professionnelle était la suivante : six anatomopathologistes et deux techniciens. Six élèves sur les huit s'occupaient directement de la production de vaccin antivariolique ou étaient responsables, sur le plan administratif, de laboratoires producteurs. Deux seulement avaient une expérience réelle de la production de vaccin antivariolique lyophilisé, mais dans l'un et l'autre cas, leurs connaissances étaient dépassées.

Le cours avait pour objet d'enseigner une méthode de production de vaccin antivariolique stable par dessiccation d'une suspension partiellement purifiée de virus vaccinal. La méthode enseignée était celle qu'on emploie actuellement au Lister Institute of Preventive Medicine, Elstree, Herts., Angleterre.

Le Nigeria, pays hôte, a fourni les installations de laboratoire du Federal Laboratory Service, auquel sont rattachées les sections de production de vaccin de l'Etat. Le "West African Council for Medical Research" a bien voulu mettre à notre disposition un amphithéâtre de conférences. Enfin, un service d'autobus a été assuré par le Département médical.

### Organisation du cours

Comme on estimait que l'expérience pratique présentait une importance primordiale, le cours a été organisé de manière que chacun des participants ait le plus de temps possible pour exécuter lui-même les techniques enseignées. C'est pourquoi toutes les phases du processus de production ont été étudiées l'une après l'autre pendant les conférences, démonstrations et travaux pratiques, de telle sorte que chaque participant a pu emporter avec lui à la fin du cours un échantillon de vaccin qu'il avait préparé lui-même.

Afin de traiter d'une manière aussi complète que possible tous les aspects de la production du vaccin desséché, on s'est abstenu d'enseigner théoriquement les parties traditionnelles de cette production; toutefois, on a organisé des visites de manière à permettre aux participants d'observer les divers stades de préparation des pulpes de vaccin brut et il a été prévu que ceux qui avaient des questions à poser dans ce domaine pourraient prendre contact avec des personnes capables de les renseigner.

On trouvera à l'annexe 2 du présent rapport le calendrier du cours et des notes succinctes portant sur toute la gamme des matières enseignées.

### Aide administrative

A Lagos, l'aide que l'OMS a pu mettre à notre disposition se limitait aux services du représentant local et de son secrétaire. Mais comme ces agents devaient se consacrer entièrement à d'autres questions, il a fallu prendre des dispositions pour organiser un secrétariat. L'auteur étant familiarisé avec les conditions locales, il ne s'est heurté, à cet égard, à aucune difficulté, mais le manque des crédits nécessaires pour rémunérer ce service eût risqué d'être gênant dans d'autres circonstances. En raison de l'absence du représentant local pendant la plus grande partie du cours, il a fallu que l'auteur s'occupe lui-même de questions pratiques comme la location de places dans les avions, les formalités d'immigration et le paiement des indemnités aux participants.

### Installations de laboratoire

Ces installations n'étaient certes pas parfaites, mais en faisant preuve d'un peu d'ingéniosité, on a pu s'en accommoder. Toutefois, si le nombre des participants avait été plus élevé, on se serait heurté à des difficultés considérables. Lorsque des chercheurs, même peu nombreux, doivent exécuter des travaux pratiques, il faut disposer d'un appareillage et d'un espace non négligeables et sans l'assistance inlassable que nous a prêtée le personnel local, cadres et techniciens, il n'aurait pas été possible de les obtenir.

### Conclusions

Il n'est pas aisé de faire un cours, en particulier un cours qui comporte de nombreux travaux pratiques, pendant quatre ou cinq heures par jour et cela pendant deux semaines, sans avoir pu le préparer d'une manière approfondie. Lorsqu'une seule personne doit faire des conférences et des démonstrations, surveiller les travaux pratiques, et préparer en même temps le programme du lendemain, il n'est pas possible qu'elle s'acquitte de sa tâche sans bénéficier de l'aide d'autrui. Si l'auteur du présent rapport a été en mesure de mener à bien son cours, c'est qu'il connaissait à Yaba des personnes capables de prêter une telle assistance; mais si tel n'avait pas été le cas, le temps dont il a disposé avant le cours pour faire les préparatifs sur place aurait été insuffisant.

Il est difficile d'apprécier la valeur intrinsèque d'un cours de ce genre. Deux au moins des participants n'avaient pas une maîtrise suffisante de l'anglais pour être en mesure de bien suivre une conférence; toutefois, cette insuffisance a été largement compensée au cours des démonstrations et des travaux pratiques. Il est évident que ceux qui avaient l'expérience de la préparation du vaccin anti-variologique lyophilisé ont mieux profité du cours que leurs collègues. On est en droit de penser que c'est à cet égard qu'il y aurait un intérêt pratique à organiser des cours de ce genre à l'avenir, car cela permettrait à un grand nombre de centres de production de vaccin de se documenter sur les progrès récents et les techniques

nouvelles. Qui plus est, le groupement des participants au cours permet, entre les centres, un échange extrêmement utile de renseignements qui ne sont pas normalement publiés. Pour les participants qui n'avaient aucune expérience de la technique, le cours a présenté probablement moins d'intérêt, exception faite des cadres supérieurs du personnel de laboratoire, chargés de fonctions administratives et de direction; ceux-ci ont pu en effet se faire une idée exacte de la possibilité d'entreprendre la production de vaccin lyophilisé dans leurs services et de l'intérêt que cette technique pourrait présenter.

P. D. Meers  
Médecin consultant temporaire

Annexe I Nom et adresse des participants

Annexe II Emploi du temps et notes succinctes sur le cours

ANNEXE I

Nom et adresse des participants

Boursiers

1. Dr Bouthaina Shafik  
Institut des Sérums et des Vaccins  
Agouza, Le Caire, Egypte, R.A.U.
2. Dr Bouik Seydian  
Institut Pasteur  
Téhéran, Iran
3. Dr Haidar Samman  
Ministère de la Santé  
Damas, Syrie, R.A.U.
4. Dr C. A. Linsell  
Medical Research Laboratory  
Boîte postale 30141, Nairobi, Kenya
5. Dr W. N. Laing  
Medical Research Institute  
Boîte postale 300, Accra, Ghana
6. M. A. K. Sorig  
Stack Medical Research Laboratory  
Khartoum, Soudan

Participants locaux non boursiers

7. Dr H. S. O. Ahimie  
Federal Laboratory Service  
Yaba, Nigeria
8. M. M. S. O. Nwachukwu  
Federal Laboratory Service  
Yaba, Nigeria

Médecin consultant

Médecin-commandant P. D. Meers, R.A.M.C.  
17, The Dene, Cheam, Surrey, Angleterre

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

COURS SUR LA PRODUCTION  
DE VACCIN ANTIVARIOLIQUE SEC

GOUVERNEMENT HOTE :

GOUVERNEMENT FEDERAL DU NIGERIA

INSTITUTIONS HOTES :

FEDERAL LABORATORY SERVICE

WEST AFRICAN COUNCIL FOR MEDICAL RESEARCH

Donné à

YABA, NIGERIA

14-26 novembre 1960

Emploi du temps

L'autobus prendra les boursiers tous les matins à leurs hôtels respectifs entre 8 h. et 8 h.15. Les boursiers sont instamment priés de ne pas retarder le service du transport.

Date	Heure	Lieu	
14 novembre Lundi	8.00	Hôtels	Transport des boursiers à la banque
	11.00	W.A.C.M.R.	Café
	11.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Introduction
	2.00		<u>Visite</u> Federal Laboratory Service, en particulier section du vaccin antivariolique
			Retour à l'hôtel
15 novembre Mardi	8.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Préparation de "l'extrait à 10 %"
	9.30	Lab. de la rage	<u>Démonstration</u> d°
	11.00	W.A.C.M.R.	Café
	11.30	Lab. de la rage	<u>Travaux pratiques</u> d°
	2.00		Retour à l'hôtel
16 novembre Mercredi	8.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Préparation d'une suspension de corps élémentaires
	9.30	Lab. de la varirole	<u>Démonstration</u> d°
	11.00	W.A.C.M.R.	Café
	11.30	Lab. de la varirole	<u>Travaux pratiques</u> d°
	2.00		Retour à l'hôtel

Emploi du temps (suite)

Date	Heure	Lieu	
17 novembre Jeudi	8.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Lyophilisation
	9.30	Y.F.V.L.	<u>Démonstration</u> Lyophilisation 1. Structure de la machine primaire 2. Mise en service de la machine après livraison
	11.00	Y.F.V.L.	Café
	11.30	Y.F.V.L.	<u>Travaux pratiques</u> Utilisation du lyophilisateur primaire - I
	2.00		Retour à l'hôtel
18 novembre Vendredi	8.30	Y.F.V.L.	<u>Travaux pratiques</u> Utilisation du lyophilisateur primaire - II
	9.30	Y.F.V.L.	<u>Démonstration</u> Parties constitutives du lyophilisateur
	11.00	Y.F.V.L.	Café
	11.30	Y.F.V.L.	<u>Démonstration</u> Manoeuvre et entretien de la machine
	2.00		Retour à l'hôtel
19 novembre Samedi	8.30		Temps réservé pour la répétition de toute partie du cours faite jusqu'à ce jour, sur la demande des boursiers
20 novembre Dimanche			Libre
21 novembre Lundi	8.30	Y.F.V.L.	<u>Démonstration</u> Lyophilisateur secondaire
	9.30	Y.F.V.L.	<u>Travaux pratiques</u> Utilisation du lyophilisateur secondaire
	11.00	Y.F.V.L.	Café
	11.30	Y.F.V.L.	<u>Travaux pratiques</u> - suite
	2.00		Retour à l'hôtel

Emploi du temps (suite)

Date	Heure	Lieu	
22 novembre Mardi	8.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Essai de l'activité du vaccin
	9.30	Lab. de la rage	<u>Travaux pratiques</u> Lyophilisation du vaccin préparé par les boursiers eux-mêmes - I
	11.00	W.A.C.M.R.	Café
	11.30	Lab. de la rage	<u>Démonstration et travaux pratiques</u> Titration du vaccin
	2.00		Retour à l'hôtel
23 novembre Mercredi	8.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Bactériologie du vaccin
	9.30	Lab. de la rage	<u>Travaux pratiques</u> Lyophilisation du vaccin préparé par les boursiers eux-mêmes - II
	11.00	W.A.C.M.R.	Café
	11.30	W.A.C.M.R.	Visite des laboratoires du W.A.C.M.R.
	2.00		Retour à l'hôtel
24 novembre Jeudi	8.30	W.A.C.M.R.	<u>Conférence</u> Contrôle, conservation et mise en circulation du vaccin. Liquide de reconstitution
	9.30	Lab. de la rage	<u>Travaux pratiques</u> Lyophilisation du vaccin préparé par les boursiers eux-mêmes - III
	11.00	W.A.C.M.R.	Café
	11.30	Lab. de la rage	<u>Démonstration et travaux pratiques</u> Récolte des oeufs Comptage des pustules
	2.00		Retour à l'hôtel

Emploi du temps (suite)

Date	Heure	Lieu	
25-26 nov. Vendredi- Samedi		W.A.C.M.R. et ailleurs	Récapitulation de la méthode Discussion des installations et de l'appareillage de laboratoire Discussion des difficultés éprouvées ou envisagées par les boursiers Répétition de tous travaux pratiques dont le déroulement du cours montrerait l'utilité
26 novembre	12.00	W.A.C.M.R.	Clôture du cours

PREPARATION DU VACCIN ANTIVARIOLIQUE SEC  
EXPOSE SUCCINCT

1. Le problème

Il s'agit de transformer la matière brute ou "pulpe" qui contient le virus vaccinal (quel que soit l'animal sur lequel elle a été prélevée) en une substance relativement purifiée qui se prête à la lyophilisation. Sous sa forme définitive, le matériel doit satisfaire aux normes internationales préconisées et/ou aux normes nationales, relativement à la teneur bactérienne et virale. (On trouvera les normes internationales préconisées dans Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn., 1959, Nos 178 et 180.)

Pour préparer le vaccin antivariolique sec, il faut, au préalable, résoudre deux problèmes, à savoir :

- 1.1 Elimination aussi poussée que possible des contaminants dans le matériel provenant de l'hôte animal, sans altération ou perte excessive de virus.
- 1.2 Réduction de la teneur bactérienne jusqu'à une proportion acceptable, le virus demeurant aussi peu altéré que possible.

Si la quantité de virus contenue dans la pulpe brute est trop faible pour satisfaire immédiatement aux normes de titrage, un troisième problème se pose, à savoir :

- 1.3 Concentration du virus.

Il importe de souligner que la nature du matériel initial contenant le virus varie très largement d'un centre de préparation à un autre. C'est pourquoi il importe d'aborder avec le plus de souplesse possible les problèmes énoncés ci-dessus et de tenir compte de cette réserve en lisant l'aperçu qui suit et qui a été développé pendant le cours. Lorsqu'un laboratoire commence pour la première fois à produire du vaccin antivariolique sec, cette entreprise doit être considérée comme

un problème expérimental, la solution que l'on propose ici devant être tenue pour l'indication d'une méthode susceptible d'être suivie et non pas comme un ensemble de règles rigides.

La technique décrite pendant le cours est celle du Vaccine Lymph Department, Lister Institute, Elstree, Herts., Angleterre.

## 2. Exposé succinct d'une technique de production du vaccin antivariolique sec

### 2.1 Préparation d'un "extrait à 10 %"

2.1.1 La pulpe brute est homogénéisée dans dix fois son poids de tampon de McIlvaine (pH 7,2; 0,004 M), avec addition de phénol dans la proportion de 0,4 % et "d'Arcton 113" dans la proportion d'environ 12 %.

2.1.2 La suspension est centrifugée pendant environ cinq minutes à une accélération de 500 g et le liquide surnageant est décanté.

2.1.3 Ce liquide surnageant (l'extrait à 10 %) est conservé pendant environ 18 heures à une température voisine de 22°C pour réduire le nombre des bactéries viables.

2.1.4 A la fin de la période d'incubation, l'extrait à 10 % est conservé à une température de 0°C à 4°C en attendant le titrage du virus et la détermination de la teneur bactérienne (si cela est nécessaire à ce moment) et jusqu'à ce qu'on puisse passer au stade suivant.

### 2.2 Utilisation de l'extrait à 10 %

2.2.1 Si le degré de contamination bactérienne constaté est acceptable et si le titre viral est assez élevé (par exemple au-dessus de  $10^9$  unités pustuleuses par ml), l'extrait à 10 % peut être dilué avec un volume égal de solution peptonée à 10 % (ou plus selon le titre), réparti en ampoules et lyophilisé. Si l'analyse bactérienne est satisfaisante mais que le titre se situe entre  $10^8$  et  $10^9$  U.P. par ml, on peut convertir l'extrait à 10 % en une suspension de corps élémentaires (section 2.3), ce qui permet de concentrer le virus. Si, par contre, le résultat de l'analyse bactérienne

ne donne pas satisfaction, on peut essayer d'exposer de nouveau le matériel à une température de 22°C; il importe toutefois de se rendre compte que même si le matériel n'est exposé qu'une nuit à cette température, le titre vaccinal se trouve réduit de plus d'un demi-logarithme et que dès lors deux expositions de cet ordre risquent de rendre la suspension inutilisable.

2.2.2 On peut conserver l'extrait à 10 % pendant plus d'un mois sans qu'il en résulte une diminution notable du titre.

### 2.3 Préparation d'une suspension de corps élémentaires (S.C.E.)

2.3.1 L'extrait à 10 % est centrifugé à une accélération de 2300 à 10 000 g afin de sédimenter le virus. Pour réduire le temps nécessaire à une accélération centrifuge déterminée, il y a lieu d'utiliser un centrifugeur oblique. A une accélération centrifuge de 10 000 g et avec un angle de 28°, une demi-heure suffit largement.

A une accélération de 2300 g, l'opération peut demander plus de deux heures. L'utilisation d'une machine capable de donner 10 000 g permettra de se dispenser de recourir à un centrifugeur réfrigéré à condition que l'on dispose d'une chambre froide ou d'une installation de climatisation de l'air.

2.3.2 Après centrifugation, on jette le liquide surnageant et le culot est mis de nouveau en suspension dans un tampon de McIlvaine. L'expérience dictera le volume à utiliser : au départ, on peut essayer le double du poids de la pulpe utilisée dans la préparation de l'extrait à 10 %. Le virus est remis en suspension dans un homogénéiseur approprié. Cette suspension est la S.C.E. et on la conserve à une température de 0°C à 4°C en attendant le titrage et l'analyse bactériologique et le traitement subséquent.

### 2.4 Utilisation de la S.C.E.

2.4.1 Si l'analyse bactériologique est satisfaisante et si le titre viral est assez élevé (par exemple plus de  $5 \times 10^9$  U.P. par ml) la S.E.C. peut être diluée à 1/10 dans une solution peptonée à 5,5 %, répartie en ampoules et lyophilisée. Selon le cas, on peut recourir à des dilutions inférieures au 1/10.

## 2.5 Répartition en ampoules et lyophilisation

2.5.1 L'extrait à 10 % ou la S.C.E., dilué en solution peptonée comme on l'a indiqué, est réparti par quantités de 0,25 ml, ce qui représente 25 doses théoriques.

2.5.2 On conseille de recourir à la dessiccation primaire par la technique de la centrifugation. Il suffit généralement d'opérer cette dessiccation primaire pendant 18 heures. Les ampoules sont alors placées dans la machine à dessiccation secondaire où, pendant 18 à 24 heures encore, elles sont soumises à un vide poussé en présence d'anhydride phosphorique. On admet ensuite dans le système de l'azote sec exempt d'oxygène et on scelle les ampoules à la flamme. On les soumet ensuite à l'épreuve d'étanchéité, on les examine pour éliminer les défauts et on les porte au réfrigérateur en attendant la livraison.

## 3. Contrôle bactériologique et épreuve d'activité

### 3.1 Contrôle bactériologique

3.1.1 Ce contrôle dépendra des habitudes et règlements locaux. Il sera nécessaire de procéder à la numération bactérienne totale sur l'extrait à 10 % et/ou sur la S.C.E. On peut procéder soit en même temps soit sur le produit fini à un examen bactériologique détaillé pour la recherche des catégories spéciales de germes pathogènes.

### 3.2 Epreuve d'activité

3.2.1 Il sera nécessaire de procéder à l'épreuve d'activité aux stades indiqués ci-dessus, de même que sur le produit fini afin de se conformer aux normes nationales du pays intéressé.

## 4. Conservation et livraison

4.1.1 Pour assurer une longue conservation du vaccin sec, il faut le maintenir à des températures inférieures à 0°. A -10°C, un vaccin qui a été préparé dans les conditions appropriées peut demeurer actif pendant une période pratiquement illimitée.

4.1.2 En raison des excellentes qualités de conservation du vaccin à une haute température ambiante, on peut l'expédier par la poste sans le réfrigérer. Toutefois, il y a lieu de conseiller aux destinataires de le conserver dans un réfrigérateur de ménage.

5. Formules

5.1 Tampon phosphate-acide citrique de McIlvaine

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre ..... 5,6808 g  
 ou : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O ..... 14,32 g  
 dans 200 ml d'eau distillée (= 0,2M)

Acide citrique ..... 2,1008 g  
 dans 100 ml d'eau distillée (= 0,1M)

pH requis	ml d'acide citrique 0,1M	ml de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2M
5,0	9,70	10,30
6,0	7,37	12,63
7,0	3,53	16,47
<u>7,2</u>	<u>2,61</u>	<u>17,39</u>
7,4	1,83	18,17
7,6	1,27	18,73
8,0	0,55	19,45

Utilisé à un pH de 7,2. Le mélange souligné ci-dessus est le "tampon concentré" (0,187 M, pH 7,2).

Le tampon prêt à l'usage est à 0,004M et est préparé par addition de 1,0 ml de tampon concentré à chaque fraction de 46 ml d'eau distillée.

Stériliser à l'autoclave sous une pression de 5 lbs pendant 30 minutes. Stocker à 4°C.

5.2 Solution de phénol concentrée

100 g de phénol cristallisé fondu sur une flamme faible. Verser dans une éprouvette graduée chauffée et laisser refroidir. Compléter à 120 ml avec de l'eau distillée stérile. (Porter des gants.)

1,2 ml = 1 g phénol

### 5.3 Solution peptonée

Employer le peptone bactériologique d'Evans, dissous dans de l'eau distillée, soit à 10 %, soit à 5,5 %. Ajuster le pH à 8,0 avec NaOH à 40 %. Chauffer à 90°C et filtrer à chaud. Corriger le pH à 7,2-7,4 avec de l'HCl à 40 %. Porter à l'autoclave sous 15 lbs de pression pendant 15 minutes.

### 5.4 Liquide de reconstitution

102 ml tampon concentré (0,187M) pH 7,6

498 ml d'eau distillée

400 ml de glycérol

Porter à l'autoclave pendant 20 minutes sous une pression de 15 lbs

Répartir en ampoules effilées aux deux extrémités à raison de 0,35 ml par ampoule

Porter de nouveau à l'autoclave

Contrôler l'étanchéité des ampoules par la technique du vide, en mettant un colorant dans l'eau.