

**LE LABORATOIRE ACTUEL DE PRODUCTION DE VACCIN
BCG A L'INSTITUT PASTEUR DE MADAGASCAR
BILAN DES ACTIVITES
MISE AU POINT D'UN VACCIN SEC THERMOSTABLE
POUR VOIE INTRADERMIQUE**

par

**RAKOTONIRINA-RANDRIAMBELOMA (P.J.)*
RAMAROSON (T.)** – RAKOTOARISON (J.)****

INTRODUCTION

La tuberculose humaine a toujours préoccupé les services de Santé de Madagascar comme en témoignent des preuves trouvées dans des rapports de la Mission Médicale norvégienne la plus ancienne en date.

Toutes les observations basées alors sur la clinique mirent en évidence d'abord la forme pulmonaire : forme habituelle de la maladie reconnue sur les Plateaux puis sur les Côtes avec des degrés d'atteinte variable selon les ethnies.

La preuve bactériologique de l'infection devait être faite à l'Institut Pasteur, de même THIROUX devait attirer l'attention sur l'existence et la gravité de la tuberculose bovine dès 1901. D'années en années l'infection humaine semblait progresser et ce n'est qu'après la guerre 1914-1918 que le personnel du service de Santé prit pleinement conscience de sa gravité.

Des index tuberculiques de l'ordre de 25 à 40 p. 100 furent trouvés chez les enfants et les adolescents lors de recherches effec-

* Chef de Laboratoire. Institut Pasteur de Madagascar.

**Collaborateurs techniques.

tuées à Tananarive, puis à la campagne sur les Hauts Plateaux, ensuite sur les Côtes, ce qui permit alors de conclure à l'existence de «sujets porteurs de bacilles tuberculeux plus nombreux qu'on ne le supposait alors » (25).

Des mesures d'urgence devraient être envisagées par la création d'organismes de défense antituberculeuse, mais en même temps déjà, des espoirs étaient nés de la mise au point en 1921 du BCG par CALMETTE et GUERIN en France. Le 24 juin 1924 CALMETTE présenta devant l'Académie de Médecine à Paris sa première communication : «Essai d'immunisation contre l'infection tuberculeuse».

Dès lors les Instituts Pasteur Outre Mer entreprirent la diffusion du vaccin. «L'Institut Pasteur de Tananarive fut l'un des premiers à se lancer dans cette voie».

HISTORIQUE.

En novembre 1924 GIRARD reçut de CALMETTE la première souche de BCG. Des essais de culture sur patate douce et manioc furent concluants : la souche s'adapta bien apparemment et dès 1926 les laboratoires de l'Institut Pasteur de Tananarive étaient en mesure de préparer le vaccin nécessaire au Pays.

Du vaccin frais fut produit de 1926 à 1953 : une interruption eut lieu de 1943 à 1947 des suites des restrictions imposées par la guerre. En 30 ans environ, 229.834 personnes furent vaccinées par voies orale, sous-cutanée et par scarification ; de 1926 à 1942, 108.628 nourrissons en particulier reçurent le BCG par la méthode de CALMETTE. (2)

Le 30 janvier 1954 la production fut cependant arrêtée, les raisons sont données dans le rapport annuel de 1954 en ces termes : «Les locaux et les installations, dans lesquels le vaccin BCG était préparé ne répondant pas aux normes de l'OMS en ce qui concerne la fabrication de ce vaccin». Dès lors et jusqu'en 1964, l'Institut Pasteur de Madagascar reçut régulièrement du vaccin BCG sec S.S. (Scarification) préparé par l'Institut Pasteur de Paris.

Depuis 1950 cependant comme le rapporte dans sa thèse RAHARINIVO (19) «Le problème de la tuberculose se révélait dans toute son ampleur. Les malades des villes affluaient dans les hôpitaux pour profiter du traitement par la streptomycine et l'isoniazide».

Au service antituberculeux créé en 1933 à l'Institut d'Hygiène social, le plan de lutte antituberculeux se développait progressivement. Les Unités mobiles intensifièrent les enquêtes tuberculiniques dans la tranche d'âge d'enfants de 6 à 14 ans ; une carte épidé-

miologique permit de distinguer des régions très infectées : Sud et Ouest ; moyennement infectées : Hauts Plateaux ; peu infectées : Côte Est. Dans le même temps le dépistage des malades permit de constater la progression constante des nouveaux cas de 1955 à 1959, plafonnant aux environs de 3.000 par an de 1959 à 1961.

L'endémie tuberculeuse devenait une des priorités du Service de lutte contre les Grandes Endémies : «des enquêtes multiples fixèrent même le taux des cas de tuberculose ouverte aux environs de 1 p. 100», ce qui était une situation considérée comme très sérieuse (9).

Deux grandes mesures de prophylaxie pouvaient et devaient être appliquées simultanément et dans l'immédiat :

«Le renforcement des méthodes de dépistage et de traitement des cas de tuberculose ouverte.

La vaccination par le B.C.G. de toute la population comprise entre 0 et 20 ans reconnue à l'examen préalable indemne de tuberculose» Cette dernière mesure devait entraîner ou l'achat ou la production sur place du vaccin nécessaire. Le vaccin BCG lyophilisé indispensable à ces vaccinations était cependant «d'un prix exorbitant et hors des possibilités d'achat» compte tenu du choix des méthodes à utiliser en prophylaxie de masse :

L'option porta en effet sur la méthode orale pour les nouveau-nés dont le nombre estimé à 150.000 représentait alors l'excédent annuel des naissances sur les décès ; le coût de la dose de 100 mg de vaccin lyophilisé pour voie orale était de l'ordre de 1.000 F (CFA) ; il fallait ajouter à cela le prix de 20.000 ampoules de 5 mg de BCG nécessaire pour vacciner par voie intradermique un million de sujets. Il fut alors décidé la création d'un «Service Malgache de préparation du BCG» dont les modalités sont définies dans les 24 Articles du «Projet de convention pour l'établissement et le fonctionnement d'un Service de production de vaccin lyophilisé» signé le 3 janvier 1963 par Monsieur le Ministre de la Santé Publique et de la Population représentant le Gouvernement de la République Malgache et le Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar mandataire de l'Institut Pasteur de Paris.

Ainsi qu'il était convenu : le Service du BCG devait être logée à l'Institut Pasteur de Madagascar dans les locaux du deuxième étage du bâtiment dit des «vaccins» construit en 1957 ; l'achat du matériel spécialisé pour la production du BCG lyophilisé demandé par le Gouvernement fut résolu en affectant des Crédits du Fond d'Aide et de Coopération française disponibles sur les tranches de 1962-1963 (Art. 10-11).

L'Institut Pasteur accepte d'assurer sous son entière responsabilité la direction technique du service (Art. 1er).

Le BCG préparé doit être mis gratuitement et en totalité à la disposition du Gouvernement (Art. 2).

Le Gouvernement prend à sa charge les frais de fonctionnement du Service à savoir : le montant des crédits alors nécessaires à la production de 150.000 doses de 100 mg de BCG pour voie buccale ou de 20.000 ampoules de 5 mg suffisantes pour un million de vaccination par voie intradermique, à ces crédits il fallait ajouter la rémunération du personnel technique (Art. 14). L'Institut Pasteur garantirait le vaccin conforme aux normes internationales» (Art. 17). Cette convention est à ce jour toujours en vigueur.

LE LABORATOIRE ACTUEL DE PRODUCTION DE VACCIN B.C.G.

Le nouveau service de production de vait démarrer son fonctionnement en 1964. Ce laboratoire est un service de la Santé Publique Malgache, l'article 8 de la convention le rattache administrativement à la Direction générale du Service d'Hygiène et de Prophylaxie devenue par la suite, Service de Lutte contre les Grandes endémies puis actuellement Service de lutte contre les Maladies Transmissibles (S.L.M.T.).

Techniquement, le Service fonctionne de façon autonome. Tel qu'il était conçu, il assure uniquement la production et les contrôles de laboratoire du vaccin sous la direction technique de l'Institut Pasteur. Un service dit «des vaccinations» branche de la Division Tuberculose, au Service de lutte contre les Grandes Endémies était chargé des essais cliniques et des programmes de vaccination.

Trois chefs de laboratoire devaient se succéder à la direction de ce service de 1964 à 1967 : le premier pendant neuf mois, assura l'initiation et la formation du personnel préparateur, l'installation du gros matériel et le démarrage de la Souche.

Les premières doses de vaccin produites furent du B.C.G. frais pour voie buccale concentré à 100 mg/ml

- 928 ampoules de 1 ml
- 965 ampoules de 2 ml

Le second chef de Laboratoire prit la relève du premier en fin novembre 1964 après une brève fermeture de deux mois du Service occasionnée par le départ de ce dernier.

A compter de février 1965 du vaccin B.C.G. frais pour voie buccale et pour voie intradermique fut produit en attendant l'installation d'un microsublimateur USIFROID de type SMIRS.

Compte tenu des essais et contrôles du vaccin lyophilisé, du B.C.G. frais fut encore produit jusqu'en mai 1966, quoique les pre-

mières doses de vaccin lyophilisé pour voie buccale et pour voie intradermique purent être utilisées dès janvier 1966.

Arrivée en octobre 1966 nous n'avons pris la relève complète du second chef de Laboratoire qu'en juillet 1967 au départ de ce dernier.

Les locaux.

Le Laboratoire situé au deuxième étage du bâtiment dit «des vaccins» est topographiquement indépendant des autres laboratoires de l'Institut Pasteur.

L'agencement des locaux a été conçu pour être conforme le plus possible aux normes de l'O.M.S.

Le compartiment non stérile du laboratoire loge le bureau du chef de laboratoire, le secrétariat, une grande pièce de préparation du matériel, une salle de préparation des milieux de culture, une pièce laverie et stérilisations, une salle de la chaudière, des sanitaires réservés au personnel.

Le compartiment dit «Stérile» est séparé du précédent par un double sas : le premier donnant accès à la salle des machines du lyophilisateur et à la salle de scellage des ampoules, le second à la salle de lyophilisation, aux pièces de contrôles et de piquage des ampoules, à la salle d'ensemencement, récolte et préparation de vaccin. Une chambre étuve est attenante à cette dernière qui possède également un climatiseur autonome.

Une armoire climatiseur dessert le reste du bloc stérile.

Un diffuseur permet la désinfection régulière du bloc stérile au liquide paragerme ou au liquide phacogène.

Des lampes à rayons ultra-violets complètent la stérilisation de l'air.

En annexe du laboratoire, le Service possède : une animalerie indépendante pour l'élevage de cobayes nécessaires aux contrôles du vaccin ; une pièce de stockage de la verrerie et des produits de laboratoire.

Le Matériel.

Un équipement lourd était prévu et c'est compte tenu de cet équipement qu'ont été définies à l'article 19 de la convention les quantités maximales annuelles de vaccin BCG que serait capable de produire le Service.

Le matériel lourd comprend entre autre : une chaudière BLOCTHERM génératrice de vapeur pour un groupe

de deux autoclaves horizontaux et pour un autoclave vertical ; deux poupinels ; un microsublimateur USIFROID de type SMIRS et un appareil à trois rampes destiné à sceller des ampoules manuellement sous vide*, un déminéralisateur, un appareil à eau bidistillée, des balances de précision, des centrifugeuses, des pompes à vide, des réfrigérateurs et congélateurs.

Le matériel est strictement réservé au Service.

Le personnel

L'effectif comporte :

Un chef de Service, personnel de Santé Publique Malgache détaché à l'Institut Pasteur de Madagascar et de ce fait également Chef de laboratoire de l'Institut Pasteur ; il est pris en charge par cet organisme selon l'Article 5 de la convention.

Trois préparateurs appartenant selon les disponibilités, au cadre des adjoints techniques d'Hygiène et d'Assainissement et à ceux des infirmiers, des agents d'Hygiène, des laborantins.

Un secrétaire.

Quatre personnels servants complètent l'effectif.

Cette équipe est soumise selon les réglementations internationalisées à une expertise phthisiologique stricte avant l'entrée en service et par la suite à un examen de santé semestriel comprenant entre autre une radiographie pulmonaire.

Les attributions

Le Chef de service a sous son autorité directe la responsabilité technique et administrative de l'unité de Production.

Il assure personnellement avec le premier préparateur :

- . Les préparations de vaccin
- . Les contrôles de stérilité
- . L'exécution et la surveillance de la lyophilisation.

Il supervise et contrôle tous les tests notamment d'innocuité, de réactivité et de viabilité du vaccin.

Le personnel préparateur assure sous la responsabilité du premier préparateur :

- . La préparation de tous les milieux de culture nécessaires au laboratoire
- . Les stérilisations
- . Les ensemencements de souche et passage du vaccin

* L'appareil à sceller sous vide a été livré ultérieurement aux autres appareils.

- . La répartition du lot de vaccin en ampoules et les scellages de ces dernières
- . Les différents tests de contrôles des lots de vaccin
- . Le secrétaire assure outre le travail de secrétariat, le maintien des stocks, les approvisionnements, l'impression des ampoules et la livraison du vaccin
- . Le personnel servant assure la propreté des locaux, du matériel, du linge de laboratoire. Il surveille et nourrit les animaux de laboratoire.

LES ACTIVITÉS DU LABORATOIRE

Les activités données annuellement dans le rapport de fonctionnement de l'Institut Pasteur de Madagascar (rubrique Service BCG) seront simplement résumées :

Culture du B.C.G.

Le lot de semence

La souche de B.C.G. utilisée est la souche française n° 1173 P2 de l'Institut Pasteur de Paris.

Les lots de semence ont été successivement :

. En 1964 - 1965 : le lot secondaire n° 3.

. De 1966 à avril 1974 : les lots secondaires n° 5 A, 5 B, 5 C, 5 D. Ces lots secondaires présentés en ampoule en verre neutre de 5 ml contenant par ampoule 6 mg de B.C.G.* lyophilisé et congelé étaient produits et adressés semestriellement par l'Institut Pasteur de Paris à raison de dix ampoules de 1964 à 1974.

. Du mois d'avril 1974 à février 1980 : le laboratoire reçut du «Seed-lot» secondaire, lot A préparé le 14.03.1973 au Statens Serum Institut de Copenhague et adressé par le même laboratoire en début d'année à raison de 10 ampoules par an. Le B.C.G. était conditionné en ampoules brunes de 10 ml contenant par ampoule 5 mg de B.C.G. lyophilisé. Les ampoules étaient scellées sous vide.

. A partir de février 1980, nous reçumes de nouveau du «Seed Lot» secondaire Lot B préparé et adressé par l'Institut Pasteur de Paris. Les lots de semence présentés en ampoules blanches contiennent 10 mg de B.C.G. lyophilisé, les ampoules sont scellées sous vide. Dix ampoules de semence sont adressées systématiquement en début d'année.

Les lots de semence sont conservés en congélateur à -20° C

* Tout poids donné correspond toujours à un poids de B.C.G. semi-humide.

Méthode de culture

Le milieu pomme de terre Sauton en tube de Roux est le milieu classique de mise en culture du lot de semence. Le lyophilisat de l'ampoule est dissous avec quelques gouttes de milieu de Sauton prélevé au fond du tube de Roux puisensemencé sur la surface de la pomme de terre.

Le voile de B.C.G. développé sur la phase liquide du milieu pomme de terre Sauton est prélevé puisensemencé sur milieu de Sauton en ballon de 250 ml, le ballon contenant environ 125 ml de milieu, c'est le Sauton 1 ou S1 ; le voile développé en surface sur S1 est récolté après incubation de 7 jours à 37° C puisensemencé sur d'autres ballons de Sauton constituant S2.

Les voiles développés en S2 seront récoltés après incubation de 7 à 9 jours à 37° C pour la préparation du lot de vaccin.

La masse de B.C.G. cultivée sur la surface de la pomme de terre estensemencée sur d'autres milieux pomme de terre Sauton en tubes de Roux pour l'entretien de la souche.

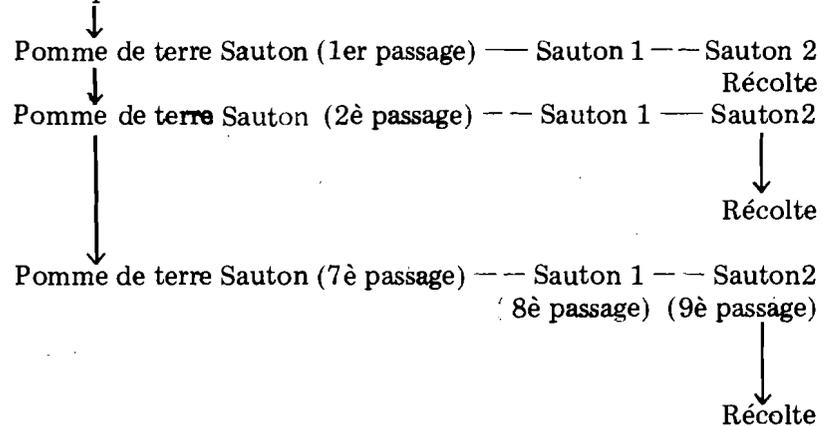
De 1965 à 1974 la Souche de B.C.G. a été ainsi régulièrement entretenue par passages tous les 14 jours sur milieux pomme de terre Sauton. La semence était renouvelée tous les six mois.

Avec le «Seed-lot» secondaire adressé par le Service du B.C.G. du Statens Seruminstitut de Copenhague, un nouveau schéma de mise en culture fut adopté à partir d'avril 1974. Suivant les recommandations le nombre de passages est limité à neuf.

Le choix entre deux techniques s'offrait :

- Première technique

- Ampoule n° 1



- Ampoule n° 2
- Deuxième technique :
 - Ampoule n° 1
 - ↓
 - Pomme de terre Sauton (1er passage)
 - ↓
 - Sauton 1 (2ème passage)
 - ↓
 - Sauton 2 (3ème passage) — — Récolte
 - ↓
 - Sauton 3 (4ème passage) — — Récolte
 - ↓
 - Sauton 8 (9ème passage) — — Récolte
 - Ampoule n° 2

Après essais des deux techniques de mise en culture, la seconde bien que paraissant plus simple techniquement fut vite abandonnée pour la fréquence des contaminations.

La première est donc celle utilisée actuellement.

LES TYPES DE VACCIN PRODUIT DE 1965 A 1972

Nous donnerons pour cette période, les types de vaccin produits sans nous étendre sur les méthodes et techniques qui seront exposées de façon plus détaillée à propos du vaccin lyophilisé thermostable notamment en ce qui concerne la préparation du lot, la lyophilisation, les contrôles.

Le vaccin frais :

Ce type de vaccin a été produit pour utilisation pour voie buccale et pour voie intradermique de 1965 à 1967 en attendant l'installation du micro-sublimateur et les essais et contrôles des premiers lots de vaccin lyophilisé.

Le B.C.G. pour voie buccale concentré à 100 mg/ml était présenté en ampoules blanches contenant 1 ou 2 ml de vaccin.

. Le vaccin pour voie intradermique concentré à 0,75 mg/ml ou à 1 mg/ml était présenté en ampoule blanche de 2 ml contenant 1 ml de vaccin.

Le liquide de suspension du vaccin frais est du Sauton au quart.

L'utilisation de ce vaccin est très limitée dans le temps :

14 jours à + 4°C.

Nombre d'Unités Viables :

Le vaccin frais compte en moyenne de 16.10^6 à 20.10^6 Unités Viables par milligramme de B.C.G. (UV/mg).

Le Vaccin lyophilisé :

Vaccin pour voie buccale

Du B.C.G. pour voie buccale fut produit jusqu'en 1972. Des voiles de S₂ de 9 jours étaient utilisés pour les préparations de vaccin. La récolte des voiles et la technique de préparation étaient bien codifiées déjà (7).

La méthode de travail a dû cependant être révisée compte tenu des quantités maximales à produire annuellement, mais pratiquement jamais atteintes, à savoir 150.000 doses de 100 mg, ce qui représente une masse bacillaire de 15 kg de B.C.G. Le voile de S₂ de 9 jours ne pesant que 3 g environ, ceci suppose la manipulation de centaines de ballons de S₂ par préparation et partant de la facilité des contaminations. Pour y pallier, deux préparations distinctes étaient faites par semaine, ce qui correspondait à deux entretiens de souches sur pomme de terre, deux séries de S₁, deux séries de S₂ de 240 ballons chacune divisée en 20 séries de 12 ballons, chaque série ayant son contrôle de stérilité.

Avant toute récolte de voiles, les contrôles de stérilités bactérienne et fongique sont vérifiés et tous lots contaminés sont éliminés. Les ballons restants sont malgré tout mirés un à un devant une source lumineuse et tout milieu trouble, ou même simplement douteux de même que tous voiles noyés sont de nouveau éliminés. Ce mirage est fait avant toute préparation de vaccin.

La préparation est faite en deux lots : deux pots filtres SEITZ EK d'une capacité de 10 litres chacun étaient utilisés pour la récolte stérile des voiles, à raison de 80 ballons environ par pot.

Le contenu de chaque pot constituait un sous lot : A et B. Une pompe à vide assurait un bon essorage des voiles en 2 heures environ. La masse bacillaire essorée est ensuite recueillie dans du papier Kraft stérile, puis pesée, broyée en fiole Latapie, et mise en suspension.

L'excipient de lyophilisation était le suivant :

- . Solution de lactose à 15 p. 100
- . Tampon phosphate pH 7,8 : 10 p. 100
- . Glycérol : 2 p. 1000

Le sous lot final concentré à 100 mg/mg était réparti en ampoules de 10 ml à raison de 1 ml par ampoule à l'aide d'une seringue Cornwall. Le vaccin était congelé en cuve puis lyophilisé. Les ampoules étaient scellées sous azote sec rectifié «R» ou sous azote «U»* Les temps de sublimation et de résorption était de 24 heures environ.

Viabilité

Le B.C.G. buccal lyophilisé contenait une moyenne de 18.10^7 Unités viables par ampoule.

La validité du lot était de 6 mois à +4° C et à l'abri de la lumière.

Vaccin pour voie intradermique :

Le rapport dose intradermique et dose buccale est de 1 à 1000, la masse bacillaire utile à chaque préparation de vaccin pour intradermique était donc minime par rapport au B.C.G. buccal et les contaminations peu fréquentes.

Un pot filtre SEITZ, EK de 2 litres servait à la récolte des voiles de S₂, à raison de 12 à 15 ballons par préparation.

La masse bacillaire essorée par une pompe à vide était rincée une fois à l'eau distillée stérile puis essorée une deuxième fois.

L'excipient de lyophilisation était :

- . Solution de glucose à 50 p. 100
- . Tampon phosphate pH 7, 8 : 0,5 p. 100.

La suspension finale de vaccin concentrée à 30 mg/ml était répartie à raison de 0,2 ml par ampoule, dans 5.000 ampoules de 5 ml par préparation soit 10 boîtes de 500 ampoules. Le vaccin était congelé en cuve puis lyophilisé. Malgré la très faible quantité, 0,2 ml de suspension vaccinale, la lyophilisation du vaccin en excipient glucosé à 50 p. 100 demandait un temps très long de l'ordre de 100 heures environ. Le vide de la cuve était cassé sous azote «R» ou azote «U». Une machine STRUNCK permettait un scellage rapide des ampoules.

*L'azote sec «R» présente une teneur de 99,6 p.100

L'azote «U» une teneur de 99,999 p. 100.

Le vaccin en excipient glucosé lyophilisé est simplement desséché et non stable à la température de 37°C.

. La viabilité à la lyophilisation était bonne en générale de l'ordre de 3.10^6 à 8.10^6 Unités viables par mg de B.C.G.

. La validité du lot était de 6 mois à +4°C et à l'abri de la lumière.

Pour pallier à la destruction du B.C.G. par la lumière solaire directe, les ampoules blanches étaient enduites d'un vernis rouge protecteur.

Lots de vaccin lyophilisé stériles produits

De 1965 à 1972 le Service a produit une moyenne annuelle de 40 lots de B.C.G. pour voie buccale lyophilisé soit près de 300 pour la période étudiée, et de 6 lots de B.C.G. pour voie intradermique soit une quarantaine environ pour la période.

Les types et quantités de vaccin produits et livrés au service des vaccinations sont donnés dans le tableau I suivant :

TABLEAU I

Production de vaccin BCG de 1965 à 1972

ANNEE	B.C.G. FRAIS				B.C.G. LYOPHILISE			
	Buccal (doses de 100 mg)		Intradermique (doses)		Buccal (doses de 100 mg)		Intradermique (doses)	
	Produit	Livré	Produit	Livré	Produit	Livré	Produit	Livré
1965	29.286	23.635	482.840	388.920	19.138	12.576	237.200	44.600
1966	5.570	3.578	86.420	45.600	78.746	44.715	814.720	555.800
1967	—	—	314.880	144.880	60.847	70.236	1.020.430	465.000
1968	—	—	—	—	103.367	83.600	867.320	795.000
1969	—	—	—	—	76.942	94.324	895.000	766.640
1970	—	—	—	—	116.874	72.178	1.663.680	937.400
1971	—	—	—	—	116.339	62.260	1.112.640	609.460
1972	—	—	—	—	54.864	73.907	196.480	359.560
TOTAL	34.856	27.213	884.140	579.400	627.117	513.796	6.807.470	4.533.460

MISE AU POINT D'UN VACCIN SEC THERMOSTABLE POUR VOIE INTRADERMIQUE. PRODUCTION EFFECTUEE DE 1973 A 1981.

Une note circulaire en date du 31 juillet 1972 de Monsieur, le Ministre des Affaires Sociales avertit le Service de «L'abandon de la méthode buccale comme moyen de prophylaxie de masse au B.C.G.» La production de B.C.G. pour voie buccale fut donc progressivement diminuée jusque fin 1972.

Dès l'arrêt de cette production qui par ailleurs était une lourde charge pour le Service, note but était d'améliorer dans les meilleurs délais possible la qualité du vaccin pour voie intradermique par la production d'un vaccin lyophilisé, scellé sous vide. La méthode de vaccination par voie intradermique restant la seule préconisée puisqu'aucune autre ne devait encore remplacer la voie buccale.

Ceci était possible par les livraisons successives des différents matériels : un appareil à sceller manuellement les ampoules sous vide : appareil à trois rampes de marque USIFROID ; des chalumeaux à trois becs pour gaz butane-air comprimé ; un compresseur aérosol générateur d'air comprimé destiné à l'alimentation des chalumeaux ; un déshumidificateur d'air de marque EBCO, indispensable car la solution de glutamate de sodium utilisée comme excipient de lyophilisation du vaccin est très hygroscopique.

L'achat d'un lot de 11.000 ampoules de 5 ml en verre pyrex permit de démarrer assez tôt quelques essais déjà très prometteurs et de définir les conditions de lyophilisation en ce qui concerne : la température de sublimation du produit, la pression en cuve à laquelle doit être faite la sublimation, le réglage de l'injecteur d'air en fonction de la température du produit pendant la période de sublimation.

Choix de l'excipient de lyophilisation.

Ce dernier a été choisi en fonction de ce qui a donné de meilleurs résultats dans les différents laboratoires producteurs de vaccin BCG lyophilisé thermostable. Compte tenu de notre matériel, nous avons adopté également la solution de glutamate de sodium à 2 p. 100, pH 7.

La préparation de vaccin

Six séries de six ballons de S₂ sont préparées par lot de vaccin.

Les voiles de S₂ utilisés sont récoltés à 7 jours. Ils sont en général complets et de bonne qualité. Le poids moyen du voile est alors de 2 g à 2,5 g.

Toutes séries contaminées aux contrôles de stérilité sont éliminées, les ballons restants sont mirés devant une source lumineuse tel qu'il a été dit dans le chapitre précédent.

Récolte des voiles

La récolte des voiles se fait dans des pots de filtres en acier inoxydable à plancher mobile permettant l'égouttage du milieu de culture.

Quatre pots par préparation sont utilisés, chaque pot recevant trois à quatre ballons de culture.

Les ballons de S₂ sont agités puis vidés stérilement dans chaque pot. Après égouttage du milieu de culture, la masse bacillaire est rincée une fois à la solution de glutamate de sodium à 2 p. 100. L'essorage du vaccin se fait par centrifugation de 10 minutes à 4.000 tours/minute.

Les pots sont ensuite pesés, puis la masse bacillaire poussée dans une fiole de Latapie contenant 2 kg de billes d'acier de 6 et 4 mm de diamètre.

Le poids semi-humide du BCG est obtenu par pesée différentielle des pots.

Broyage du vaccin et mise en suspension.

L'appareil est un broyeur mécanique fabriqué par l'Institut Pasteur de Paris permettant l'adaptation simultanée de deux fioles. Depuis 1975 le service utilise une technique de broyage inspirée de celle du Statens Serum Institut de Copenhague :

La fiole de Latapie est d'abord secouée doucement à la main pour disperser la masse bacillaire compacte.

Elle est ensuite tournée à sec pendant 3 minutes à 20 tours/minute ; puis à 12 tours/minute pendant 1 minute avec 20 ml d'excipient, et enfin à 6 tours/minute pendant 30 secondes avec environ 300 ml d'excipient.

La fiole est de nouveau agitée manuellement puis la suspension est recueillie dans un ballon par filtration à travers un entonnoir muni d'une grille pour arrêter les billes d'acier. La fiole est rincée avec de l'excipient lequel est de nouveau filtré à travers l'entonnoir. Le reste de l'excipient permet de rincer les billes d'acier. Toute manipulation est faite stérilement près de la flamme de deux bunsen.

Concentrations du lot final de vaccin et répartition.

Deux concentrations de vaccin peuvent être préparées :

. Une suspension finale concentrée à 10 mg/ml, répartie en ampoules à l'aide d'une seringue de Cornwall à raison de 0,5 ml par ampoule.

. Une suspension finale concentrée à 6 mg/ml répartie à raison de 0,5 ml par ampoule.

Les ampoules

Les ampoules utilisées sont à fond plat, elles sont rangées d'avance dans les boîtes à lyophiliser.

Des ampoules en verre pyrex blanc de 5 ml ont été utilisées au départ. Le prix de revient élevée de ces derniers joint aux difficultés d'approvisionnement nous ont contraint à mettre à l'essai des ampoules en verre dur. Avec la pratique, le scellage sous vide manuel de ces dernières a donné assez rapidement de bons résultats.

Des ampoules brunes en verre dur de 5 ml puis de 10 ml sont actuellement utilisées, protégeant directement le BCG des rayons solaires directs. La qualité du verre n'a pas eu d'influence sur la marche de la lyophilisation.

La lyophilisation

Le matériel

Le microsублиmateur USIFROID de type SMIRS permet la congélation en cuve du vaccin.

Le compresseur frigorifique est à refroidissement par eau. La pompe à vide est à palettes à deux étages et lest d'air, sa capacité est de vingt huit mètres cube par heure sous une pression de un « Torr ».

La cuve d'une capacité de 1m³ est équipée d'un papier mobile à cinq étagères chauffantes pouvant recevoir dix boîtes rectangulaires en aluminium de 177 mm de hauteur, d'un couvercle isolant à turboventilateur et d'un couvercle normal muni de deux voyants.

La machinerie et le tableau de commande sont dans une pièce distincte de celle de la cuve.

Trois notices accompagnent le matériel :

- Installations de lyophilisation -- de production.
- Notice d'emploi.
- Notice descriptive d'entretien et de réparation.
- Pièces de rechange.

L'opération de lyophilisation.

Nous ne détaillerons pas les manoeuvres à effectuer à chaque lyophilisation. Toutes les consignes à suivre sont données clairement dans la notice technique d'emploi éditée à cet effet.

Nous soulignerons seulement les quelques points particuliers :

. Le nombre d'ampoules à lyophiliser est limité par opération à la capacité de six boîtes, soit environ 2.800 ampoules de 10 ml pour éviter un scellage sous vide manuel trop long au risque de réhydrater le vaccin.

. La congélation.

Le vaccin est congelé directement en cuve pendant une nuit. La température de congélation descend à -40°C . Elle est suivie à l'enregistreur.

. La sublimation.

La température de sublimation du vaccin en solution de glutamate de sodium à 2 p. 100 définie d'avance est de -38°C sous un vide de 0,062 mm de Hg correspondant à un espace sombre de 15 mm au tube gradué indicateur de vide (tube de Hittorf).

Des réglages sont effectués d'avance :

Le doseur d'injection d'air est à une position correspondant à la pression ci-dessus.

Au tableau de commande :

Les réglindex de température des plateaux sont mis à $+44^{\circ}\text{C}$, chauffage donnant une température finale du vaccin avoisinant $+37^{\circ}\text{C}$. Le potentiomètre de vide poussé est réglé à $+27^{\circ}\text{C}$ qui est la température inférieure de 10°C la température finale souhaitée pour le produit.

Le doseur cyclique de chauffage des plateaux réglé à 25 p. 100 permet la marche de l'appareil sans surveillance stricte.

La température de congélation étant atteinte, les contrôles de stérilité du lot final de vaccin sont vérifiés. Si le lot est contaminé, la cuve sera déchargée et le compresseur arrêté, sinon le sublimateur sera mis sous vide.

Pendant la sublimation la résistivité du produit mesurée dans des cellules disposées sur chaque plateau assure la régulation automatique du chauffage des plateaux.

L'opération de lyophilisation dure environ 24 heures avec onze heures de sublimation proprement dite et douze à treize heures environ de phase de résorption.

. L'arrêt des moulinets indicateurs d'évaporation et le maintien du produit à température constante pour tous les plateaux, vérifié sur l'enregistreur indiquent la fin de la lyophilisation.

. Le vide de la cuve cassé par de l'azote «U».

. Le déchargement des boîtes est fait le plus rapidement possible.

. Pendant toute l'opération de lyophilisation un deshumidificateur d'air fonctionne en permanence dans la pièce de la cuve.

. Piquage et scellage des ampoules.

Dans la pièce de piquage où l'air est également desséché par le deshumidificateur, les ampoules sont piquées sur des rampes de 64 ampoules.

Trois personnes procèdent au scellage manuel des ampoules sous vide dans une pièce attenante séparée de la première par un sas vitré. Ce scellage manuel nécessite un bon réglage des chalumeaux ; une certaine technicité et de la pratique sont demandées au personnel. Le scellage d'un lot de 2.800 ampoules demande environ 5 à 6 heures. Un appareil de type «H.F. TESTER» modèle T2 permet de contrôler le vide des ampoules après scellage.

Aspect du vaccin.

Le vaccin en excipient au glutamate de sodium lyophilisé, scellé sous vide se présente sous forme d'une poudre blanche. La remise en suspension est en général immédiate.

Quantité de vaccin produit.

De 1973 à 1981 le Service a produit 5.563.750 doses de 0,1 mg de BCG thermostable pour voie intradermique (dont 1.538.150 doses en 1980 et 1.795.000 doses en 1981).

Le vaccin est conditionné en ampoules brunes de 5 ml ou 10 ml contenant soit 5 mg de BCG (poids semi-humide) ou 50 doses de BCG par ampoule, soit 2,5 mg de BCG ou 25 doses de BCG par ampoule.

Conservation.

Les ampoules de vaccin sont gardées au congélateur à -20°C avant leur impression et leur livraison au service chargé des programmes de vaccination.

Vaccin livré au service chargé des programmes de vaccination.

3.309.970 doses de 0,1 mg de BCG ont été livrées à ce service de 1973 à 1981.

LES CONTROLES

Des contrôles *in vivo* et *in vitro* sont effectués sur chaque lot de vaccin.

Pour les contrôles *in vitro*, en particulier ceux relatifs au dénombrement des particules cultivables, les méthodes utilisées étaient avant 1975 celles préconisées par l'OMS dans WHO/TB/Techn. Guide/67.6. Actuellement les méthodes sont celles du WHO/TB/Techn. Guide/77.9. Une amélioration a été apportée dans les contrôles de la qualité du vaccin à la suite d'un stage de trois mois suivi en 1975 par le premier préparateur d'alors, au Statens Seruminstitut de Copenhague. Les connaissances qu'il a acquises ont beaucoup aidé le Service. Les contrôles effectués actuellement sont donnés par ordre :

1 — Absence de contaminations bactériennes et fongiques.

La stérilité bactérienne et fongique est recherchée sur le lot final du vaccin avant répartition en ampoules et sur des échantillons de 1 p. 100 des ampoules après scellage.

Les milieux utilisés sont :

- . La gélose ordinaire
- . La gélose de Sabouraud
- . L'eau peptonée
- . Le milieu de Bonnel et Raby

Les tubes inoculés sont incubés pendant :

- . au moins 8 jours à +37° C
- . 15 jours à +20° C

2 — Test d'Innocuité

. sur cobaye :

Trois cobayes de même sexe reçoivent chacun par voie sous-cutanée 5 mg de BCG soit 50 doses humaines pour voie intradermique. A six semaines, un test tuberculinique est effectué, le cobaye présentant la plus forte réaction est sacrifié.

Les organes : poumons, foie, rate, reins, et les ganglions sont vérifiés macroscopiquement et microscopiquement au besoin.

Les cobayes non sacrifiés sont gardés jusqu'à six mois. Si l'un ou l'autre meurt avant ce délai, organes et ganglions sont vérifiés macroscopiquement et microscopiquement.

. Sur le lapin :

A titre de recherche, des essais d'innocuité sur le lapin ont été poursuivis pendant un temps très limité.

3 — *Identité et dispersion.*

Une goutte de la suspension finale du vaccin ou une goutte de vaccin lyophilisé reconstitué est prélevée et étalée sur une lame porte objet.

Après séchage, fixation et coloration au Ziehl, la morphologie et la dispersion du vaccin sont contrôlées.

Les cultures sur milieu de Loewenstein-Jensen pour la numération des particules viables permettent par ailleurs d'apprécier les caractères cultureux.

4 — *Réactivité cutanée.*

Quatre cobayes de même sexe reçoivent par voie intradermique 0,1 ml de vaccin à 1mg/ml, puis des dilutions de 1/10, 1/100, 1/1000.

Le développement de la lésion vaccinale est suivi par mensuration toutes les semaines pendant 5 semaines.

Pour chaque lot de vaccin, on fait la moyenne des dimensions maxima d'induration observées chez les quatre cobayes.

5 — *La capacité germinative*

Le test est effectué sur milieu de Dubos gélosé sur lames.

Le vaccin lyophilisé est remis en suspension.

Une goutte de suspension est déposée sur quatre lames.

On laisse sécher.

Trois lames sont incubées à +37° C successivement pendant 24 heures, 48 heures, et 72 heures.

La quatrième laissée au réfrigérateur sert de témoin pour les lectures.

6 — *Numération des particules cultivables*

La numération des Unités Viables est un des tests les plus importants du contrôle de la qualité du B.C.G. Il est admis en effet que l'immunité apportée par le B.C.G. est due aux germes vivants. Ce contrôle constitue donc une étape essentielle.

Le nombre de particules cultivables est recherché sur le vaccin frais ; sur le vaccin lyophilisé il est recherché à la lyophilisation et

après incubation des ampoules pendant 28 jours à +37° C pour l'étude de la thermostabilité du vaccin scellé sous vide.

Le test de thermostabilité donne également un aperçu de la dessiccation du vaccin à la lyophilisation ce qui permet au Service de ne plus rechercher systématiquement l'humidité résiduelle du vaccin en solution de glutamate de sodium après lyophilisation.

Le milieu utilisé.

Nous utilisons le milieu de Loewenstein-Jensen fabriqué par notre laboratoire — Le milieu n'a pas toujours la même qualité d'un lot à l'autre car les oeufs utilisés proviennent souvent de fournisseurs différents. Ceci est à l'origine d'écarts souvent importants dans les résultats des numérations des unités viables en particulier pour ce qui concerne la thermostabilité.

Les dilutions de vaccin.

Techniques et méthodes sont données dans le guide WHO/TB/Tchen. Guide/77.9. Soulignons seulement que la thermostabilité du vaccin est recherchée sur des dilutions quatre fois plus concentrées qu'à la lyophilisation. Ceci permet d'avoir un nombre optimum de colonies comptables et utilisables statistiquement.

Trois dilutions par numération sont inoculées. La dilution la plus faible est inoculée sur deux fois plus de tubes, que les deux premières. Les tubes sont randomisés au préalable.

Chaque numération est faite en double par lot ; le résultat est la moyenne des comptes obtenus. Les tubes de milieu de Loewenstein-Jensen sont incubés à +37° C et les colonies comptées à 21, 28, 35 et 42 jours.

RESULTATS DES CONTROLES

Seuls les résultats des numérations des unités viables nous semblent les plus importants à porter ici.

Contrôles de viabilité — Thermostabilité*

Nous donnons dans le Tableau II les premiers résultats exploitables de contrôle de viabilité à la lyophilisation et de thermostabilité du vaccin pour voie intradermique que nous avons effectués.

*Les premiers lots de vaccin thermostable produits en 1973 ont donné à la lyophilisation de 3 à $4,5 \times 10^6$ UV/mg de B.C.G.

Des échantillons de chaque lot de vaccin ont été placés 28 jours à +4° C, puis à +37° C pendant des délais de uné à quatre semaines.

TABLEAU II

*Contrôles de thermostabilité
Résultats exprimés en nombre d'Unités viables :
N.U.V. x 10⁶ /mg de BCG*

Lots	Lyophilisé à la production	28 jours à +4°C	7 jours à +37°C	14 jours à +37°C	21 jours à +37°C	28 jours à +37°C	Survie après 28 jours à + 37°C
1/75	6,5	6,5	3,5	2,5	3	1,5	23 p. 100
2/75	5	5	2	2	1,5	1	20 p. 100
3/75	5	5	2,5	2	1,5	1	25 p. 100
1/76	5,5	5,5	—	2,5	—	1,7	27 p. 100

Par rapport au nombre d'Unités viables obtenues à la lyophilisation : le vaccin est stable 28 jours à +4° C ; les pourcentages de survie après 28 jours à +37° C sont réguliers de 20 p. 100 à 27 p. 100.

CONTROLES INTERNATIONAUX

CONTROLES EFFECTUES AU CENTRE COLLABORATEUR OMS DU STATENS SERUMINSTITUT DE COPENHAGUE*

Nous avons pu grâce à l'obligeance de Miss K. BUNCH-CHRISTENSEN faire contrôler dans le laboratoire de production de vaccin BCG qu'elle dirige, des échantillons de onze lots de vaccin produit de 1975 à 1978.

Ces échantillons ont été adressés en 1978 par voie aérienne sans réfrigération. La durée de transport était d'environ quatre jours.

Les échantillons ont été soumis au préalable à +4° C et à +37° C pendant 28 jours.

Les contrôles effectués :

- . Absence de contamination bactérienne et fongique.
- . Nombre de particules viables (cultivables) comprenant l'étude de la thermostabilité.
- . Taux de germination en milieu solide de DUBOS.
- . Homogénéité.
- . Opacité.

Chaque examen a été effectué sur un «pool» préparé à partir du contenu de deux ampoules.

* WHO Collaborating Centre for World-wide reference for BCG seed lots and for Co-ordination of Control of BCG products.

Résultats

Trois tableaux donnent les résultats obtenus au Statens Serum-institut.

. Tableau III — Le nombre de particules viables (cultivables)

. Tableau IV — La capacité germinative sur milieu solide de DUBOS

. Tableau V — La densité optique.

. Un quatrième tableau, le Tableau VI nous donnera en ce qui concerne la viabilité à la lyophilisation et la thermostabilité une comparaison des résultats obtenus dans notre laboratoire de l'Institut Pasteur de Madagascar et de ceux obtenus au Statens Serum-institut de Copenhague.

TABLEAU III

Nombre d'Unités viables

LOT NO	Conservation	Unités viables millions/ml	Survie (%) après 28 jours à 37°C
1/75	4°C	9.6	
1/75	4°C et 28 jours à 37°C	1.5	16
2/75	4°C	4.0	
2/75	4°C et 28 jours à 37°C	0.8	20
2/75 bis	4°C	1.7	
2/75	4°C et 28 jours à 37°C	0.3	18
3/75	4°C	5.7	
3/75	4°C et 28 jours à 37°C	2.0	35
1/76	4°C	6.4	
1/76	4°C et 28 jours à 37°C	1.7	27
4/77	4°C	6.9	
4/77	4°C et 28 jours à 37°C	1.0	14
5/77	4°C	3.9	
5/77	4°C et 28 jours à 37°C	1.1	28
2/78	4°C	4.2	
2/78	4°C et 28 jours à 37°C	0.6	14
3/78	4°C	4.4	
3/78	4°C et 28 jours à 37°C	1.4	32
4/78	4°C	3.9	
4/78	4°C et 28 jours à 37°C	1.2	31
6/78	4°C	3.8	
6/78	4°C et 28 jours à 37°C	1.1	29

TABLEAU IV

Capacité germinative sur milieu solide de Dubos

Lot N°	Conservation	Taux de germination (%) après incubation à 37°C de :			
		24 heures	48 heures	72 heures	96 heures
1/75	4°C	Croissance douteuse	25	50-75	90
1/75	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10	25	—
2/75	4°C	Croissance douteuse	25	50-(75)	75-(90)
2/75	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10	25	25-50
2/75bis	4°C	Croissance douteuse	25	50	75
2/75 bis	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	5-10	10-25	25-50
3/75	4°C	Croissance douteuse	25	50-75	75-(90)
3/75	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	25	25-50	50-75
1/76	4°C	Croissance douteuse	25-50	50-75	75-90
1/76	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	5-10	(10)-25	25-50
4/77	4°C	Croissance douteuse	25-10	75	90
4/77	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10-25	25	25-(50)
5/77	4°C	Croissance douteuse	25-50	50-75	75-90
5/77	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10	(10)-25	25
2/78	4°C	Croissance douteuse	25-50	50	75-90
2/78	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10	25	25-50
3/78	4°C	Croissance douteuse	25-50	50-75	75-90
3/78	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10	10-25	25
4/78	4°C	Croissance douteuse	25-50	50-75	75-90
4/78	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10-(25)	25-(50)	50
6/78	4°C	Croissance douteuse	25-50	(50)-75	90
6/78	4°C et 28 jours à 37°C	Pas de croissance	10	25	50

TABLEAU V

DENSITE OPTIQUE
(Opacité (en terme d'absorption))
Appareil : «Coleman Universal 14,
wavelength 390 mu»

Lot n°	Densité optique
1/75	0.76
2/75	0.65
2/75 bis	0.55
3/75	0.67
1/76	0.66
4/77	0.57
5/77	0.84
2/78	0.60
3/78	0.62
4/78	0.60
6/78	0.57

TABLEAU VI
VIABILITE – THERMOSTABILITE DU VACCIN B.C.G.
POUR VOIE INTRADERMIQUE

*Comparaison des résultats obtenus à l'Institut Pasteur
de Madagascar (IPM) et au Statens Seruminstitut de
Copenhague (SSiC)*

Résultats exprimés en Unités viables : UV x 10⁶ /mg de B.C.G.

Lots	Lyophilisé à la production		Après 28 jours à +37°C		Pourcentage de survie après 28 jours à -87°C	
	IPM	SSiC	IPM	SSiC	IPM	SSiC
1/75	6,5	9,6	1,5	1,5	23	16
2/75	5	4	1	0,8	20	20
3/75	5	5,7	1,25	2	25	35
1/76	5,5	6,4	1,5	1,7	27,2	27
2/77	5,25	—	2,25	—	42,85	—
4/77	5,75	6,9	1,5	1	26,1	14
5/77	3	3,9	1,75	1,1	56,6	28
2/78	3	4,2	1,25	0,6	41,6	14
3/78	4,75	4,4	1	1,4	26,3	32
4/78	5	3,9	1,5	1,2	30	31
5/78	5,25	—	1,25	—	23,8	—
6/78	3,75	3,8	1,75	1,1	46,6	29
7/78	4,5	—	1,5	—	33,3	—
8/78	4,25	—	1,5	—	37,5	—

Commentaires

- Nombre de particules cultivables

La méthode indiquée dans WHO/TB/Techn. Guide/77.9 fut utilisée.

Deux lots ont fait exception, le lot 1/75 contenait 10×10^6 UV/mg de BCG et le lot 2/75 bis environ 2×10^6 UV/mg.

Les neuf autres lots contenaient de $3,8 \times 10^6$ à $6,9 \times 10^6$ UV/mg de BCG ce qui indiquait une «bonne uniformité des lots».

La thermostabilité variait de 14 à 35 p. 100 de survie après 28 jours d'incubation à $+37^\circ$ C.

Il a été noté que trois des lots préparés en 1978 montraient une thermostabilité bonne et uniforme.

- Taux de germination en milieu solide de DUBOS

Il a été noté que pour les lots préparés en 1977 et 1978, les résultats indiquaient une bonne uniformité et le vaccin semble contenir un taux acceptable de particules viables.

Densité optique

La densité optique était de presque 1,5 fois plus élevée que celle normalement trouvée pour la dilution de 1mg/ml.

Deux lots 1/75 et 5/77 ont fait exception et ont donné des résultats uniformes.

Le tableau VI donne en ce qui concerne le B.C.G. lyophilisé à la production des comptes d'unités viables très comparables pour de nombreux lots.

Sept lots sur dix présentent même aux contrôles du Statens Serum institut, un nombre d'unités viables plus élevé.

Les pourcentages de survie après 28 jours à $+37^\circ$ C présentent un peu plus de variations (en plus ou en moins) aux contrôles du Statens Serum institut, mais sept lots sur dix ont eu malgré tout un pourcentage de survie correct variant de 20 à 35 p. 100.

CONTROLES EFFECTUES AU LABORATOIRE DE PRODUCTION DE VACCIN BCG A L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

Un deuxième contrôle de viabilité à la lyophilisation et de thermostabilité de 13 lots de vaccin pour intradermique produit en

1981 a été fait au Service du BCG de l'Institut Pasteur de Paris grâce à l'amabilité de Madame le Docteur Martin GHEORGHU qui dirige cette unité.

Notre demande a été motivée par le fait que les dénombrements des unités viables sur les milieux de Loewenstein Jensen de notre fabrication présentaient d'énormes variations suivant les lots de milieu de culture. La thermostabilité semblait même catastrophique pour quelques lots.

Des échantillons des 13 lots après avoir été soumis 28 jours à $+4^{\circ}\text{C}$ et à $+37^{\circ}\text{C}$ ont pu être testés par deux méthodes :

La mesure rapide la viabilité du BCG par dosage de l'A.T.P. (adénosine-5'-ribosotriphosphate) (14).

«La présence de l'ATP dans toute cellule vivante fait de l'ATP un indicateur de la viabilité des bactéries».

Ceci a été mis à profit pour déterminer la viabilité du BCG et pallier par la rapidité de la méthode aux nombreux inconvénients, parmi lesquels la lenteur des cultures, rencontrés dans le dénombrement des unités cultivables sur les milieux complexes tels que le milieu de Loewenstein Jensen.

Principe, matériel et méthodes sont clairement exposés dans la publication de M. CHEORGHU et M. LAGRANDEURIE.

Nous nous permettrons seulement de reprendre ici un paragraphe du résumé :

«Les techniques actuelles d'extraction de l'ATP des cellules vivantes et son dosage par la mesure de l'énergie émise sous forme de bioluminescence, permettent le dosage de l'ATP dans le BCG. La quantité d'ATP varie avec le nombre d'unités viables (proportionalité linéaire) et avec la dimension des amas contenus dans le vaccin et la souche de BCG».

Numération des unités viables sur milieu de MIDDLEBROOK 7 H 10.

Parallèlement à la mesure rapide précédente, un dénombrement des unités viables a été fait sur quelques lots pris au hasard. Le milieu utilisé était le milieu de MIDDLEBROOK 7 H 10 contenant de l'Oléate albumine dextrose catalase (O.A.D.C.).

Les cultures sont faites en boîtes de pétri rondes à 4 cases. La lecture est effectuée après incubation de 14 jours à $+37^{\circ}\text{C}$. Il s'agit également d'une méthode rapide de dénombrement des unités viables ne nécessitant qu'une lecture à 14 jours.

RESULTATS

Les résultats sont portés dans le tableau VII.

Par dosage de l'ATP, les résultats sont exprimés en ng/ml (ou ng/mg de BCG).

Le taux d'ATP trouvé par unité viable de BCG étant de 1 fg environ (1fg = 10^{-15} g).

Sur le milieu de MIDDLEBROOK 7 H 10, les résultats sont exprimés en nombre d'unités viables par ml de BCG (ou mg de BCG) ($UV \times 10^6$ UV/ml).

TABLEAU VII

Résultats comparatifs obtenus par la mesure rapide de viabilité du B.C.G. par dosage de l'ATP et par numération des unités viables (UV) sur Milieu de MIDDLEBROOK 7 H 10

No Lots	Méthode par dosage de l'ATP ng A.T.P./ml après 28 jours à			Numération des UV sur milieu de MIDDLEBROOK 7 H 10 N.U.V. x 10^6 /ml après 28 jours à		
	+4°C	+37°C	% survie	+4°C	+37°C	% survie
2/81	6.18	—	—	—	—	—
3/81	8.01	4.0	50	7.3	3.7	51
6/81	8.87	3.6	40	—	—	—
8/81	0.56	0.3	53	1.3	0.7	54
10/81	9.38	4.5	48	9.1	3.8	42
11/81	7.75	4.0	52	—	—	—
14/81	6.16	3.6	58	—	—	—
15/81	7.38	3.4	46	8.8	4.0	45
16/81	5.74	2.5	44	—	—	—
18/81	6.88	3.1	45	—	—	—
19/81	6.68	3.3	49	—	—	—
20/81	11.85	4.0	34	—	—	—
21/81	8.89	4.3	48	—	—	—

Les résultats obtenus par les deux méthodes utilisées sont très comparables en ce qui concerne l'équivalence en nombre d'unités viables puisque le taux d'ATP par unité viable est de 1 fg ; «les chiffres» des taux d'ATP exprimés en ng ATP/ml donnent donc l'équivalent en NUV x 10^6 / ml. Il en est de même des taux de survie après incubation de 28 jours à +37°C variant de 34 p. 100 à 58 p. 100.

Pour le lot 10/81 par exemple :

. A + 4°C — le taux d'ATP est de : 9,38 ng ATP/ml
— le nombre d'unités viables est de : 9.1×10^6 uv/ml
sur MIDDLEBROOK 7 H 10

. A +37° C après 28 jours :
— le taux d'ATP est de : 4.5 ng ATP/ml
— sur Milieu de MIDDLEBROOK : 3.8×10^6 uv/ml

Les taux de survie respectifs sont de 48 p. 100 et de 42 p. 100.

PRODUCTION ANNEXE POUR LA PERIODE DE 1973 A 1981

En annexe de la production de BCG thermostable pour voie intradermique, le Service a produit deux autres types de vaccin :

. Du vaccin lyophilisé pour aiguilles bifurquées.

Ce vaccin était destiné à mener des essais comparatifs de vaccination par voie intradermique et par aiguilles bifurquées chez le nouveau-né en 1978-1979.

. Des voiles de S₂ de 7 jours ont été utilisés

. L'excipient de lyophilisation est celui du BCG pour voie buccale.

. Le vaccin concentré à 160 mg/ml était présenté en ampoules de 4 doses.

. 7600 doses ont été produites.

. Un Immuno BCG frais.

A partir de janvier 1980, nous avons produit sur demande du Service de Pédiatrie de l'Hôpital Militaire d'Antananarivo, un immuno BCG frais destiné à de jeunes malades souffrant d'hémo-pathies malignes.

. Le vaccin est préparé à partir de voiles de S₂ de 7 jours.

. Le BCG est mis en suspension dans du liquide de Sauton au quart sous une concentration de 50mg/ml.

7 p. 100 de glycérol sont ajoutés pour garantir la stabilité du vaccin à la conservation.

. Le vaccin produit périodiquement selon les demandes est présenté en ampoule de 5 ml contenant 100 mg de BCG par ampoule, et conservé à -20°C pendant 8 à 10 semaines au maximum.

COMMENTAIRES

C'est volontairement que nous ne nous arrêtons pas sur la production de BCG frais ; seules les quantités de vaccin lyophilisé seront portées dans le tableau récapitulatif ci-après.

TABLEAU VIII

RECAPITULATION DES QUANTITES DE BCG LYOPHILISE PRODUIT

Type de vaccin BCG	Quantités Produites (doses)	Quantités Livrées au Service chargé des Programmes de vaccination (doses)
Buccal (doses de 100 mg) (1965 à 1972)	627.117	513.796
Intradermique (ID) en excipient glucosé doses de 0,1 mg (non thermostable) (1965 à 1972)	7.194.970*	4.920.960
Intradermique thermostable doses de 0,1 mg (1973-1981)	5.563.750	3.309.970
Pour aiguilles bifurquées (concentré à 160 mg/ml) (1978)	7.600	7.000

* Ce chiffre inclut deux productions de vaccin ID desséché (glucosé) effectuées parallèlement au vaccin sec en 1977 (112.500 doses) et 1978 (275.000 doses).

. De 1965 à 1972 le Service a produit : (tableau I)

. 627.117 doses de 100 mg de BCG pour voie buccale (pour mémoire cette production correspond à une masse bacillaire de près de 63 kg)

. 7.194.970 doses de 0,1 mg de BCG pour voie intradermique en excipient glucosé à 50 p. 100.

Cette production a permis de prémunir contre la tuberculose 375.464 nouveau-nés par la méthode orale, et plus de 2.600.000 sujets par la voie intradermique.

. Pour le laboratoire cette production de vaccin lyophilisé a exigé un travail qu'on peut qualifier de semi-industriel. Les dépenses inhérentes à la production à savoir celles en électricité, gaz butane, gaz oil, oxygène, azote «R» ou azote «U», milieux de culture divers, élevage de cobayes ne pourraient être chiffrées ici. Elles sont portées annuellement dans le rapport sur le fonctionnement du Service BCG (2 bis) , elles ont été par ailleurs déjà évoquées par l'un de nos prédécesseurs (7).

Nous rappellerons seulement qu'une telle production a nécessité la préparation hebdomadaire de deux lots de vaccin et la lyophilisation de ces derniers (congélation en cuve et sublimation).

Le vaccin en excipient glucosé à 50 p. 100 demandait environ 100 heures de sublimation — résorption.

De nombreuses opérations de stérilisation ont été effectuées pour le matériel, les milieux de cultures, etc...

Pour ne citer qu'une seule année : en 1968, le Service a effectué: 1.236 opérations de stérilisation (à l'autoclave et au four Pasteur) et 55 de lyophilisation, ces dernières totalisant environ 2.400 heures de marche du microsублиmateur.

Une conséquence directe : le matériel lourd (chaudière, autoclaves, microsублиmateur) a tourné au maximum de son rendement.

Courant 1969, ce microsублиmateur a été soumis à la première révision générale des 10.000 heures de marche.

Chaudière et autoclaves marquaient dès 1971 les premiers signes d'usure, et ont dû être révisés en 1973.

Un climatiseur autonome desservant la salle de préparation de vaccin a dû être installé en 1971, celui en place depuis 1963 pour l'ensemble du bloc stérile s'est révélé très insuffisant.

C'est dans de telles conditions peu favorables que nous avons dû assurer la production du vaccin sec dit «thermostable».

. De 1973 à 1981 : 5.563.750 doses de 0,1 mg de BCG sec dit «thermostable» pour voie intradermique ont tout de même été produites.

Les quantités annuelles étant très variables d'une année à l'autre, en fonction des conditions de travail.

Ne devant plus produire que du vaccin lyophilisé scellé sous vide, nous avons dû nous assurer de la fiabilité de nos techniques et partant de la qualité de notre production malgré des comptes d'unités viables plutôt corrects à la lyophilisation, lors de nos contrôles, pour au moins 9 sur 10 des lots produits annuellement ; compte tenu des problèmes posés pour la production des lots de milieu de Loewenstein-Jensen en ce qui concerne la qualité des oeufs.

Si le nombre d'unités viables joint aux taux de survie du BCG après incubation de 28 jours à +37°C sont l'un des critères de la-

boratoire admis pour juger de la qualité d'un lot de vaccin BCG, nous pouvons espérer être sur la bonne voie, en ce qui concerne la technique de production après les contrôles effectués par le département du BCG du Statens Seruminstitut de Copenhague en 1978 et après ceux de l'unité du BCG de l'Institut Pasteur de Paris en 1981.

Nous tenons à souligner en effet que parmi les échantillons contrôlés au Statens Seruminstitut de Copenhague des lots ont été produits un (en 1977), deux (en 1976) ou trois ans (en 1975) avant ces contrôles ; que malgré le temps de stockage des échantillons dans nos laboratoires, la viabilité à +4°C n'a pratiquement pas varié pour deux lots sur quatre produits en 1975, pour le lot de 1976 et pour les lots de 1977 :

de 3 à $6,5 \cdot 10^6$ UV/mg de BCG (IPM)

de 3,9 à $9,6 \cdot 10^6$ UV/mg de BCG (S.SIC)

Des pourcentages de survie corrects après 28 jours à +37°C ont été trouvés pour deux lots sur trois de 1975, le lot de 1976 et un lot sur deux (testés) de 1977 (tableau VI).

. lots 2/75 et 3/75 : respectivement : 20 p. 100 et 35 p. 100

. lot 1/76 : 27 p. 100

. lot 5/77 : 28 p. 100

. Actuellement nous n'avons pas encore un nombre suffisant de résultats de contrôles qui puisse nous permettre une exploitation statistique.

. Pour pouvoir y arriver le Service doit essayer d'adopter une méthode de compte d'unités viables qui puisse, lui donner dans ses conditions matérielles actuelles des résultats réguliers. Le milieu de MIDDLEBROOK 7 H 10 pourrait être mis à l'essai prochainement sur les conseils de Mme le Docteur M. GHEORGHIU.

. Impact sur le programme de vaccination.

Depuis 1976, le programme des vaccinations est confié à un Service du Ministère de la Santé Publique : le Service des maladies épidémiques, des vaccinations et des équipes mobiles connu sous le sigle de S.M.E.V.E.M., service rattaché à la direction de l'Hygiène publique et sociale.

Madagascar comme de nombreux pays a intégré la vaccination par le BCG aux autres vaccinations dans le cadre du programme élargi de vaccinations préconisé par l'OMS.

Une première période quinquennale de 1977 à 1981 a prévu : (note n° 06/SAN/DHPS/SMEV du 05.01.1977).

«. Dans la tranche d'âge de 0 à 1 an, la vaccination annuelle par voie intradermique de 70 p. 100 des enfants survivant de l'année, estimés à 231.391.

Dans la tranche d'âge de 1 à 14 ans, la vaccination par la même voie de 278.453 représentant le 1/5 de l'effectif estimé à 1.392.265 à atteindre en cinq ans».

Sujets vaccinés :

De 1977 à 1981 : 1.323.230 enfants ont été vaccinés par la voie intradermique. Ce chiffre représente une couverture de 34,5 p. 100 environ de la population enfantine de 0 à 14 ans estimée à 3.826.541. en 1981 (1).

Problème actuel.

La tuberculose demeure toujours un des problèmes prioritaires de Santé publique à Madagascar.

Selon les estimations : sa prévalence est de 4 p. 1000, son incidence annuelle de 1,5 p. 1000 intéresserait dans 50 p. 100 au moins des cas des femmes et des enfants.

La population totale est estimée à près de 9 millions en 1982 (23). «L'exploitation des rapports d'évaluation mensuels de dépistages des nouveaux malades» pour l'année 1980 (12) fait état de 3.636 cas de tuberculose dépistés (pour 11.986 à dépister). Chez 35 p. 100 de ces cas soit 1.254 malades, la preuve bactériologique de l'infection a été faite par examen direct.

Il existe donc probablement encore de nombreux malades non dépistés et pourtant contagieux pour leur entourage s'ils ne sont pas traités.

Il faut par conséquent prémunir les sujets vulnérables. L'âge joue ici un rôle important, car «S'il existe une personne contagieuse au foyer, les sujets de 0 à 14 ans auraient 38 p. 100 de chance de devenir tuberculeux, tandis que ce pourcentage ne serait plus que de 11 pour les sujets âgés de 15 à 25 ans et de 3 pour ceux de plus de 30 ans» (24).

A Madagascar la priorité est à juste titre donnée au groupe d'âge de 0 à 14 ans.

Pour la seconde période quinquennale de 1982-1986, une note ministérielle a défini la stratégie de vaccination par le BCG (1) qui peut se résumer comme suit :

- . Intégrer la vaccination BCG dans les activités routinières des formations sanitaires de base au nombre de 1.598 actuellement.
- . Pratiquer la vaccination BCG en méthode indiscriminée et par la voie intradermique stricte à «tout âge».
- . Vacciner la population cible qui est le groupe d'âge de 0 à 15 ans.

Les nouveau-nés à la maternité, ou dans les centres de soins maternels et infantiles au cours de la première année.

Le groupe d'âge de 0 à 1 an est estimé à 350.000 environ pour 1982.

Les enfants de 1 à 15 ans dans toutes les formations sanitaires générales de base et spécialisées : centre de santé scolaire et de surveillance maternelle et infantile ; la priorité étant accordée à la population préscolaire.

Dans ce groupe d'âge c'est un effectif total de 1.500.000 enfants qui devrait être couvert en cinq années.

Incidence sur la production de vaccin.

Notre Service produit du BCG sec pour voie intradermique présenté en ampoules contenant soit 50 doses, soit 25 doses de 0,1 mg de BCG.

Pour éviter un gaspillage de vaccin, un conditionnement en 10 doses semble indispensable car certaines formations comme les maternités ont fort peu de chance d'avoir vingt nouveau-nés à vacciner le même jour.

Or le nombre d'ampoules à lyophiliser donc à sceller sous vide reste par lot de vaccin le même, que le vaccin soit présenté en 50, 25 ou 10 doses, pour des quantités (doses) produites de deux à cinq fois moindre.

Le travail de lyophilisation et de scellage restera par conséquent le même par lot.

Cette production supplémentaire apportera un surcroît de travail non négligeable aussi bien pour le personnel que pour le matériel. En 10 doses en effet, il ne pourra être produit que 28.000 environ par lot.

Ceci suppose une production annuelle supplémentaire d'au moins 13 lots de 10 doses par ampoule, stériles de toutes contaminations bactérienne et fongique, ayant une bonne viabilité à la lyophilisation et un taux minimum de survie de 20 p. 100 après 28 jours à +37°C.

La capacité de production du Service n'a certes jamais été limitée «au million» de doses pour voie intradermique prévu dans la Convention. En 1981, en dépit de conditions matérielles de plus en plus difficiles cette production était de 1.795.000 doses.

Pour produire plus, il faudrait pouvoir résoudre en priorité les problèmes inhérents à la vétusté du matériel (en service depuis près de 20 ans pour certains), causes de nombreuses contaminations :

- . Remise en état des conditionnements d'air du bloc dit «stérile».
- . Révision générale ou remplacement d'un autoclave
- . Révision générale (au moins) du microsublimateur.

Tous les responsables directs sont conscients de ces problèmes. Le chef du Service de Lutte contre les maladies transmissibles a pu faire obtenir pour le Service dès 1980-1981 une chaudière BLOCTHERM, en dotation de l'UNICEF.

Une requête auprès du même organisme international vient d'être présentée par l'intermédiaire du chef de Service des Maladies épidémiques des vaccinations et des équipes mobiles, pour l'acquisition d'équipements neufs de remplacements et pour l'obtention d'un stock d'ampoules à lyophiliser.

Parmi cet équipement :

- . Un microsublimateur
- . Au moins une hotte à flux laminaire qui garantirait la stérilité des manipulations lors des entretiens de souche, de passage de voiles et de préparations de vaccin.
- . Une machine semi-automatique à sceller les ampoules sous vide dont l'acquisition permettrait de lyophiliser plus d'ampoules de vaccin pour un même temps de sublimation. Ce scellage rapide et de bonne qualité garantirait une meilleure stabilité au vaccin.

En conclusion.

S'il nous est permis d'espérer et même de penser que la mise au point du vaccin sec produit par notre laboratoire est techniquement en bonne voie tout devrait être fait pour maintenir l'effort actuel de production d'un vaccin de bonne qualité, sec et thermostable. La tuberculose, avons-nous dit, reste une des priorités de Santé Publique à Madagascar. Plus de 3.000 malades contagieux sont dépistés annuellement.

Si le traitement d'un tuberculeux est estimé à 10.000 francs malgaches et que la dose de BCG pour voie intradermique revient selon nos estimations à environ 10 frs malgaches à la production pour un million de doses produites annuellement (moins si cette production est doublée), nous pouvons penser qu'avec un vaccin de bonne qualité, la vaccination par le BCG pourra également être pour Madagascar, selon les termes de Mandé, «la mesure de Santé Publique la plus simple, la moins coûteuse et la plus efficace» dans sa stratégie de lutte contre la tuberculose.

RESUME

Les auteurs rappellent brièvement la situation épidémiologique de l'endémie tuberculeuse à Madagascar avant 1920. Peu de temps après la mise au point par CALMETTE et GUERIN du vaccin BCG, l'Institut Pasteur de Tananarive a dès 1924 entrepris la production de ce vaccin dans ses laboratoires.

En 30 ans, 229.834 personnes parmi lesquelles 108.628 nourrissons furent vaccinées.

La production fut cependant arrêtée en 1954, car les locaux et les installations où fut produit le BCG n'étaient pas conformes aux normes de l'OMS ; elle ne reprit qu'en 1964.

La situation de l'endémie tuberculeuse jugée très sérieuse depuis 1950 décida le Gouvernement Malgache à prendre des mesures d'urgence dont l'une d'elle était la prophylaxie de masse au BCG des sujets de 0 à 20 ans.

Pour cela il opta pour la production sur place du vaccin nécessaire en créant un « Service Malgache de production de vaccin BCG lyophilisé ».

Une convention signée en janvier 1963 entre le Gouvernement Malgache représenté par son Ministère de la Santé Publique et de la Population et le Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar mandataire de l'Institut Pasteur de Paris, définit les modalités de création de ce Service.

Le Laboratoire actuel de production de vaccin BCG démarra son fonctionnement en 1964. Laboratoire de Santé Publique Malgache il assure sa production sous la direction technique de l'Institut Pasteur.

De 1965 à 1972, il a produit du vaccin « desséché ».

— 627.117 doses de 100 mg de BCG pour voie buccale

— 6.807.470 doses de 0,1 mg de BCG pour voie intradermique

Dès l'arrêt de la production du BCG pour voie buccale en 1973, l'objectif du service était d'améliorer la qualité du vaccin pour voie intradermique en produisant du BCG sec en ampoules scellées sous vide.

De 1973 à 1981 : 5.563.750 doses de 0,1 mg de BCG furent produites. Deux contrôles effectués l'un en 1978 au Département du BCG du Statens Seruminstitut de Copenhague (Miss K. BUNCH CHRISTENSEN), l'autre en 1981 à l'Unité du BCG de l'Institut Pasteur de Paris (Madame le Docteur M. GHEORGHIU), donnèrent des résultats très encourageants tant en ce qui concerne la viabilité à la lyophilisation que la survie après 28 jours à +37° C.

Le vaccin BCG produit par le laboratoire actuel a permis de prémunir contre la tuberculose :

. 375.464 nouveau-nés par la méthode orale jusqu'en 1972,

. plus de 4 millions de sujets par la voie intradermique jusqu'en 1981.

. La période quinquennale de 1982-1986 prévoit :

. L'intégration de la vaccination BCG dans les activités routinières de toutes les formations sanitaires de base au nombre de 1.598.

. La vaccination indiscriminée par voie intradermique à « tout âge ».

. La vaccination en priorité des nouveau-nés, nourrissons et enfants d'âge préscolaire.

. La vaccination des enfants jusqu'à 15 ans.

Une production supplémentaire présentée en ampoules de 10 doses de 0,1 mg de BCG sera nécessaire dans certaines formations.

Ceci ne pourrait être fait si des solutions ne sont trouvées au problème inhérent à la vétusté actuelle du matériel dont certains comme les autoclaves

ou le microsублиmateur fonctionnent depuis près de vingt ans. Pour cela une requête auprès de l'UNICEF a prévu un équipement neuf de remplacement.

Dans l'immédiat cependant, c'est une révision de ce matériel qui est non seulement indispensable mais également urgent.

REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement :

. Miss K. BUNCH-CHRISTENSEN, Chef du Département de Production de vaccin BCG au Statens Serum Institut de Copenhague et Madame le Docteur M. GHEORGHIU, Chef de l'Unité de Production de vaccin BCG à l'Institut Pasteur de Paris pour l'énorme service qu'elles nous ont rendu en acceptant de contrôler des échantillons de lots de vaccin BCG produits par notre laboratoire, respectivement de 1975 à 1978 et en 1981.

. M. le Docteur V. PANSINI, Coordonnateur des programmes de l'OMS à Madagascar pour son intervention qui a permis à notre laboratoire de bénéficier d'une dotation de 750.000 ampoules à lyophiliser en 1979-1980.

. M. le Professeur L. CHAMBON, Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Paris pour ses conseils techniques et son encouragement.

. M. le Docteur P. COULANGES, Directeur de l'Institut Pasteur de Madagascar qui a toujours soutenu nos efforts par son aide psychologique et des aides matérielles non négligeables.

. M. le Professeur ANDRIANAIVO P.A., Chef du Service de lutte contre les maladies transmissibles, M. le Docteur ANDRIANTSEHENO R., Chef du Service des maladies épidémiques, des vaccinations et des équipes mobiles, et tous les techniciens qui dans les limites de leurs possibilités ont apporté à notre service leurs concours respectifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDRIANTSEHENO (R.L.), RAJAOBELINA (N.), RAZAFINDRASOA (C.), RAMANGALAHY (A.J.), RIBAIRA (E.). *Evaluation de la couverture vaccinale des enfants malagasy de 1977 à 1981.*

Direction de l'Hygiène publique sociale — Service des Maladies épidémiques des vaccinations et des équipes mobiles (n° 82/348/SAN/DHPS/SMEV) — Ministère de la Santé — Antananarivo — Août 1982.

2. *Archives de l'Institut Pasteur de Tananarive. Rapport sur le fonctionnement technique* — Rubrique : Service de la vaccination antituberculeuse (BCG). 1924 à 1954.

2 bis. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar, fasc. 2 — Rapports sur le fonctionnement.* Rubrique : Service du BCG — 1964 à 1980.

3. BUNCH-CHRISTENSEN (Kirsten) 1970 (1971) — Control methods on vaccins lots with reference to the meaning of different viability tests. *Int. Symposium on BCG vaccine* Franckfurt (Main) 1970, Symp. Series immunobiol. Standard, 17 : 199-204 (Karger : Basel/München/New-York 1971).

4. CARNUS (H.) 1972 — Aspects biologiques du rôle des bacilles morts et vivants du vaccin BCG. *Med. et Armées*, 1972, 1 (2), 19-26.

5. CARNUS (H.) 1972 — Aspects biologiques actuels concernant le vaccin BCG — *Revue Corps de Santé*, 1972, 13 (2), 165-180.

6. CLOIX (J.M.) et RAMAROSON (Th.) 1966 — Les problèmes de la stérilisation d'une salle d'ensemencement des cultures de vaccin BCG. *A.I.P.M.* 35 : 149-154.

7. CLOIX (J.M.) 1967 — Trente mois de vaccin BCG buccal. *A.I.P.M.* 36 : 11-20.

8. CLOIX (J.M.) 1968 — Expérimentation d'un vaccin B.C.G. intradermique lyophilisé en excipient lactose. *A.I.P.M.*, 37 (1) : 9-11.

9. Convention (Projet de) pour l'établissement et le fonctionnement d'un Service de production de vaccin B.C.G. lyophilisé. 1963.

En annexe : Lettre de Présentation au Conseil des Ministres [textes inédits]

10. ESTRADE (F.), SCHAFFNER-RAZAFINDRAHABA (M.) et RAKOTONIRINA-RANDRIAMBELOMA (J.) 1968 (1970). Le BCG buccal à Madagascar — *Santé et développement*, Tananarive, 1 : 323-359.

11. ESTRADE (F.), SCHAFFNER-RAZAFINDRAHABA (M.), RAMARLAH (Ch.) 1968 (1970). Le B.C.G. ID à Madagascar (Résultats obtenus à la station pilote et pendant la campagne de vaccination de 1962 à 1967). *Santé et développement*, 1, 361-399.

12. Exploitation des rapports d'évaluation mensuels des dépistages des nouveaux malades et de contrôle mensuel des décès relevant des Grandes Endémies.

Ministère de la Santé Publique — Direction des Services Sanitaires et Médicaux — Service de lutte contre les maladies transmissibles — Année 1980.

13. FILLASTRE (C.), CHIPPAUX-HYPPOLITE (C.), GUERIN (N.), CHIPPAUX (A.). Vaccins et vaccinations chez l'enfant africain. *Etudes médicales*. Mars 1982, n° 1.

14. GHERORGHU (M.) et LAGRANDERIE (M.) 1979. Mesure rapide de l'activité du B.C.G. par dosage de l'ATP. *Ann. de Microbiologie* — 130 B, 2, Août Sept. 1979, 147-156.
15. GIRARD (G.), ROBIC (J.) et RAHOERSON (R.) 1928. Enquête épidémiologique sur l'infection tuberculeuse. L'index tuberculinique à Tananarive. *S.S.m.M.* 19 juil. et *B.S.P.e.*, 1928, 21 : 716-720.
16. GIRARD (G.), ROBIC (J.) et RAHOERSON (R.) 1929. L'index tuberculinique chez l'indigène en dehors de Tananarive. *S.S.m.M.* 19 déc. et *B.S.P.e.* — 1929, 23 : 426-250.
17. LEFEVRE M., GATEFF G., CHAMBON L., JUGIARD G. Etude de la thermosensibilité du BCG lyophilisé. Dakar — *Bull. Soc. méd. afr. noire*, 1967, 12, 3, 441 —
18. MANDE (R.) 1954 — Manuel pratique de vaccination par le B.C.G. C.I.E. Travaux et documents — VI.
19. RAHARINIVO (M.) 1972. La lutte antituberculeuse à Madagascar, priorité au B.C.G. Thèse doctorat Médecine Université Bordeaux II — 1.03.1977.
20. RANDRIAMBOLOLONA (R.) 1963. Historique du B.C.G. à Madagascar. Perspectives d'avenir — *A.m.*, 21 nov. et *B.A.m.*, — 1963, 41 : 121-131.
21. RAPPORTS sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Dakar. 1971-1972-1973 et 1974-1975-1976. Rubrique : Activités du laboratoire du B.C.G.
22. Rapports annuels de 1964 à 1973 — Service de Lutte contre les Maladies transmissibles. Division de la Tuberculose — Section des vaccinations.
23. Rapport annuel — 1980. Ministère de la Santé — Direction des services sanitaires et médicaux — Service des Statistiques sanitaires et démographiques.
24. REY J.L., VILLON A. et MOREAU J.P. La tuberculose en Afrique Aujourd'hui — *Etudes médicales* — juin 1978 — n° 2.
25. ROBIC (J.) 1948 . La tuberculose à Madagascar. Le vaccin B.C.G. *Mém. Académie Malgache* — 1948 (fasc. hors séries), 107-122.
26. STYBLO K. et SUTHERLAND J. Indices épidémiologiques en vue de la planification de la surveillance et de l'évaluation des programmes antituberculeux (Conf — Tokyo 1973) *Bull. Union Inter-Tuberc.*, 1974, 49, 1, 74-83.
27. TOMMASI R., BRUNEL M., LEPROUX Ph. — Le point de vue de l'O.M.S. sur la lutte antituberculeuse en pays Africains. *Bull. Soc. Med. Afr. noire Langue Frse*, 1967, 12, 456-457.
28. UICT — O.M.S. — Vaincre la tuberculose maintenant et pour toujours — 1982 — Centième anniversaire de la découverte du bacille de la tuberculose par Robert Koch.
29. WHO/TB/Technical Guide/67-6.
30. WHO/TB/Technical Guide/77-9.
31. WHO-Manual for the designer, equipping and staffing of facilities for the production and quality control of bacterial vaccines — BLG/UNDP/78.1.
32. W.H.O. Consultation régionale des Directeurs des Centres de Production et de contrôle des vaccins — Brazzaville — 2-6 Avril 1979.
— HENDERSON (R.H.) — Expérience internationale sur la production et le contrôle de la qualité des vaccins dans les pays en voie de développement. PDT.1/WP/09.

- IMAM (Z.Imam) - Production de vaccin et contrôle de la qualité des produits biologiques - PDT.1/WP/01.
- SALAUN (J.J.) - Formation de personnel de toutes les catégories pour la production et le contrôle de qualité des vaccins. PDT.1/WP/07.