Études comparées des caractères biologiques conditionnant la valeur antigénique du vaccin BCG et leur interprétation au microscope électronique

Autor(en): **Grasset, E. / Bonifas, V.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **7 (1951)**

Heft 1

PDF erstellt am: **29.04.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-306995

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Séance scientifique du 3 juin 1950 à Genève

C. D. 576.809:616.002.5:614.4

Institut d'Hygiène – Université de Genève

Etudes comparées des caractères biologiques conditionnant la valeur antigénique du vaccin BCG et leur interprétation au microscope électronique

Par E. Grasset et V. Bonifas

Selon le procédé classique de préparation du vaccin antituberculeux BCG, utilisé dans les divers Instituts producteurs de ce vaccin, on utilise la culture en voile sur milieu de Sauton, dispersée à l'âge de 2 à 3 semaines au moyen de billes d'acier inoxydable.

Bien que dérivant de souches de BCG d'origine commune, les vaccins BCG préparés dans divers Instituts sont susceptibles de présenter des propriétés antigéniques, allergisantes, assez différentes, à en juger par le pourcentage de conversion des réactions cutanées à la tuberculine chez les individus immunisés avec ces vaccins.

En janvier 1950, un nouveau procédé de culture homogène du BCG fut proposé par *Dubos* (1), utilisant une modification de la méthode de culture du bacille tuberculeux en profondeur déjà décrite par lui-même (2), et dans lequel l'élément albuminique, originellement introduit sous la forme de «bovine plasma albumine fraction V», a été remplacé par des albumines d'origine humaine.

Aux avantages d'une culture rapide du BCG sous une forme homogène, assurant une croissance précoce ainsi qu'un haut degré de dispersion de la suspension bactérienne, vient s'ajouter celui du caractère homologue de l'albumine d'origine humaine, dont le prix, en outre, est considérablement inférieur à celui du dérivé bovin.

Du point de vue technique, la dispersion des éléments microbiens de la culture bacillaire, due à la présence dans le milieu d'une très faible quantité de mouillant (Tween 80), permet, une semaine déjà après l'ensemencement, d'utiliser la culture telle quelle sans que l'on ait l'obligation de recourir à la dissociation mécanique indispensable à la préparation du vaccin classique.

Du point de vue biologique, ce mode de culture possède des avantages considérables, du fait qu'il permet d'utiliser les éléments microbiens de

la culture après un simple ajustement de leur concentration par le néphélomètre, sans donc que l'on ait de risques de dénaturation par le procédé mécanique de dispersion. Comme la valeur antigénique d'un vaccin vivant tel que le BCG dépend plus du nombre d'éléments viables que de la concentration totale en corps bactériens, qu'elle dépend aussi du degré de cette viabilité, on conçoit aisément l'avantage qu'il peut y avoir à s'abstenir de toute influence mécanique ou autre, susceptible d'entraîner une atteinte de ce caractère.

Les moyens de contrôle de la viabilité par ensemencement sur des milieux solides tels que celui de *Loewenstein* ou de *Dorset* permettent de penser que la proportion des éléments viables n'atteint parfois que le 50% ou même moins de la totalité des bacilles formant la suspension originale du BCG, obtenue de pellicule sur Sauton.

Ce sont ces raisons qui nous ont poussé à entreprendre la préparation du vaccin BCG selon la méthode suggérée par *Dubos*, en parallèle avec la méthode classique déjà mise en œuvre dans cet Institut pour la production du BCG employé par le Centre antituberculeux de Genève.

Nous avons effectué par ailleurs des études au microscope électronique de suspensions de vaccin BCG à divers stades de préparation dans le but de mettre éventuellement en valeur des détails de morphologie ou de physiologie cellulaire qui échappent à l'examen par les méthodes d'étude microscopique et de coloration sélective usuellement utilisées dans de telles recherches.

Grâce à l'obligeance de nos collègues chargés de la préparation du vaccin BCG à l'Institut Pasteur de Paris ainsi qu'à l'Institut sérothérapique danois de Copenhague, nous avons pu étendre cette étude comparative au microscope électronique à des échantillons de diverses origines examinés à des dates sensiblement les mêmes après leur préparation.

Ce sont les résultats succints de ces recherches que nous nous proposons d'exposer dans le présent travail.

Préparation du BCG en culture homogène, dans le milieu modifié de Dubos

Nous basant sur les données techniques décrites dans l'article susmentionné de *Dubos*, nous avons reproduit sans difficulté réelle le milieu indiqué. Le seul point délicat qui mérite d'être mentionné est lié à la technique d'extraction du dérivé albuminique humain, préparé à partir de plasma humain obligeamment mis à notre disposition par le Dr *R. Fischer*, directeur du Centre de transfusion sanguine de Genève.

Les flacons de verre Pyrex contenant 50 cm³ de milieu furent ense-

mencés en profondeur avec une suspension de BCG provenant d'une culture de 12 jours sur Sauton soumise à une agitation en contact de billes d'acier inoxydable pendant 20 minutes.

24 heures après ensemencement, nous notions déjà un développement au fond des flacons sous la forme de fin dépôt augmentant nettement après 48 heures pour couvrir au cours des jours suivants tout le fond des flacons d'une culture blanc-crème, abondante, floconneuse, avec un centre légèrement surélevé.

Une légère agitation par rotation manuelle suffit à obtenir une distribution finement homogène de la culture dans toute la hauteur du milieu. Des colorations effectuées par la méthode de Ziehl, de Much et de Gram montrent que cette culture est composée d'éléments bacillaires isolés et en petits amas partiellement résistant à la décoloration par l'acide sulfurique au ¼, avec des granulations retenant fortement le Ziehl, et d'autres colorées par le Much. Une petite proportion d'éléments sont encore colorés par le Gram. Durant les premiers jours de culture, on observe assez fréquemment des formes bacillaires avec renflement terminal en massue. Ces premières formes tendent à disparaître après 3 à 5 jours de culture montrant alors une beaucoup plus grande homogénité des éléments bacillaires de forme et de taille classiques, d'acido-résistance croissante.

Si l'on procède à une légère agitation quotidienne des flacons ensemencés dès le premier jour de croissance, on obtient une distribution homogène de la culture qui continue à se développer sous cette forme homogène et dont l'opacité augmente progressivement au cours des 8 à 10 jours suivant l'ensemencement. Le trouble se maintient pendant 5 à 6 jours entre le 4e et 10e jour d'incubation sans qu'il soit nécessaire d'agiter les flacons.

Le maximum de développement de la culture homogène est observé après 10 à 15 jours. Au cours des semaines suivantes, les cultures ont tendance à perdre ce caractère d'homogénité pour former des amas plus ou moins volumineux qui ne se dissocient plus par rotation manuelle comme observé au stade antérieur. Les examens microscopiques effectués durant ce dernier stade mettent en évidence la formation d'amas bacillaires augmentant progressivement en nombre et volume avec l'âge de la culture.

Le stade optimum de développement pour utiliser la culture sous sa forme homogène, paraît être, comme le suggère *Dubos*, vers le 8e ou le 10e jour d'incubation.

L'agitation manuelle quotidienne que nous avons introduite dans cette technique paraît accroître le caractère d'homogénité de la culture.

Etudes au microscope électronique

Nos études au microscope électronique ont porté sur:

1. une souche de BCG lyophilisée;

2. divers vaccins BCG produits selon la méthode classique à partir de cultures en voile sur Sauton;

3. des lots de vaccins BCG produits en cultures homogènes, en milieu de *Dubos*.

Des études furent faites aux divers stades de croissance de la culture devant servir à la préparation de ce dernier vaccin. Ces examens furent de même effectués sur un spécimen 8 jours après obtention de ce dernier.

Ces recherches furent orientées dans le but d'étudier les caractères morphologiques et de structure de la souche BCG aux divers stades de son développement et d'en comparer les caractères à ceux des suspensions vaccinales et des divers échantillons de BCG susmentionnés, et d'en tirer éventuellement des informations concernant les caractères de viabilité des éléments constituant ces suspensions vaccinales de BCG en rapport avec le milieu de culture et les procédés utilisés pour leur préparation respective.

La technique de base utilisée a consisté à centrifuger la suspension microbienne directement sur le porte-objet (microcentrifugation) (3). Les suspensions trop denses ont été diluées à 1/20 dans le tampon phosphaté de la base du milieu de *Dubos* à pH 6,6–6,8. Cette technique permet d'obtenir des images montrant le minimum d'artefact. Cependant, pour bien des lots de BCG examinés, la substance interbacillaire constitutive du voile est tellement abondante que la dilution ne suffit pas à donner de bonnes préparations. Il faut alors laver par centrifugations répétées dans la solution tampon. Le culot de centrifugation ne contient au deuxième lavage presque plus de cette substance. Le culot est repris dans l'eau distillée, on dépose une goutte de la suspension sur le porte-objet que l'on porte sous un vide de quelques mm de mercure à 45° en présence de P_2O_5, ce qui permet de dessécher la préparation en quelques secondes. On évite de cette manière l'influence de la concentration progressive des électrolytes dans la cellule, qui provoque habituellement des lyses non spécifiques dont l'influence est très grande sur la morphologie microbienne. Il faut noter que les mycobactériacées paraissent beaucoup moins sensibles que la plupart des microorganismes à ce genre d'influence. Notons aussi que le passage dans l'eau distillée rend les corps microbiens beaucoup plus sensibles aux influences extérieures, en plus de l'action propre de l'eau distillée (plasmolyse, etc.).

Tous les specimens furent examinés après ombrage à l'or-manganine; quelques-uns seulement par transparence, sans ombrage.

Chaque spécimen a fait l'objet d'une observation de plus d'une centaine de champs microscopiques. Les prises photographiques concernent les champs microscopiques présentant les éléments les plus caractéristiques de l'ensemble de chaque spécimen.

1. Souche lyophilisée. Institut Pasteur de Paris. N° 880.

a) Examen effectué 45 minutes après resuspension dans l'eau distillée de la masse desséchée lyophile et après dilution 1 20 dans le tampon du milieu de Dubos.

Les images obtenues par transparence, ainsi qu'après ombrage à l'or correspondent dans l'ensemble à celles de corps bacillaires de morphologie normale pour le genre de culture dont provient la suspension lyophilisée: membrane bacillaire intacte, contenu bacillaire présentant des condensations irrégulières le plus souvent polaires, mais fréquentes sur la longueur du bacille, et qui sont les témoins d'une structure biologique vitale (fig. 1).

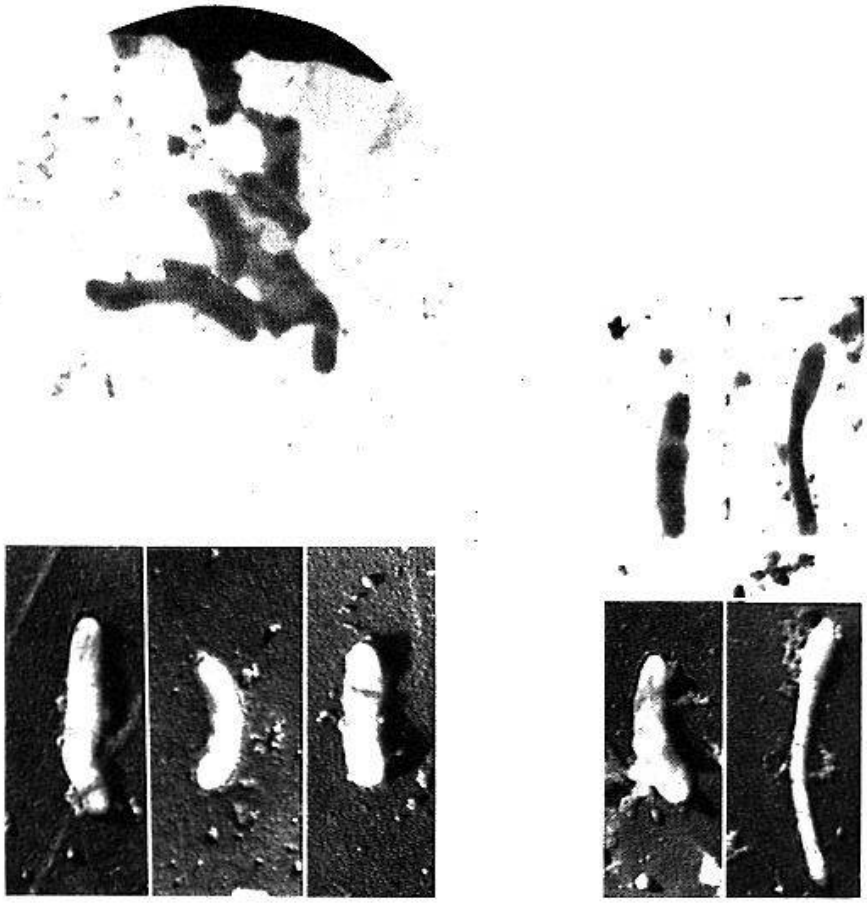

Fig. 1. Fig. 2.

Fig. 1. Souche BCG lyophylisée no 888. Institut Pasteur, Paris. 45 min. après dissolution.
Fig. 2. Souche BCG lyophilisée no 888. Institut Pasteur, Paris. 6 heures de culture en milieu de Dubos.

b) Culture de la souche BCG susmentionnée après 6 heures d'incubation à 37° dans le milieu de Dubos.

En dehors d'éléments de dimensions normales (3 à 4 μ) on remarque des formes bacillaires plus allongées jusqu'à 6 à 8 μ, soit le double de la dimension du grand axe des formes usuelles, très faible diamètre transversal.

Un bon nombre de ces dernières présente des extrémités renflées en massue. A l'examen par transparence, on note que la structure de ces extrémités renflées donne une image nettement moins opaque que la partie centrale des bacilles, qui est occupée par une masse dense et homogène (fig. 2). De ces observations, il apparaît donc que cette souche lyophilisée est en état biologique très satisfaisant.

2. *Vaccins BCG d'origines diverses*

a) *Vaccin BCG. Institut Pasteur, Lot 161, pour scarification. Examiné 8 jours après sa préparation, dilué 20 fois dans tampon Dubos, pH 6,6.* Image bacillaire d'aspect assez variable. Environ 50 à 60% des éléments microbiens présente des caractères correspondant à une intégrité morphologique apparente comparable à ceux observés pour la souche lyophilisée et représentée par des corps bacillaires présentant une structure interne organisée avec condensations caractéristiques. D'autres éléments montrent des images bacillaires «squelettiques» («Ghost forms» des auteurs anglo-saxons) qui sont des membranes bacillaires rupturées, disloquées formant l'image de corps bacillaires aplatis, collapsés, plus ou moins vidés de leur protoplasme (fig. 3).

Ces dernières images correspondent à celles d'altérations incompatibles avec la viabilité de ces microorganismes qui sont, par conséquent, dénués de valeur immunisante.

Des images semblables ont été observées avec la même suspension BCG, diluée 20 fois comme précédemment mais examinée après 20 minutes de lavage par centrifugation dans ce même tampon et resuspendue dans ce dernier (mc.).

b) *Vaccin BCG pour injection intradermique. Institut Pasteur de Paris N° 165. Examiné 8 jours après la préparation.* Les images observées au microscope électronique rappellent beaucoup dans l'ensemble celles décrites plus loin pour le BCG scarification.

A côté d'éléments bacillaires bien conservés, on a pu observer que plus de la moitié des corps microbiens composant la suspension, présentaient des altérations morphologiques et structurales plus ou moins marquées (fig. 4).

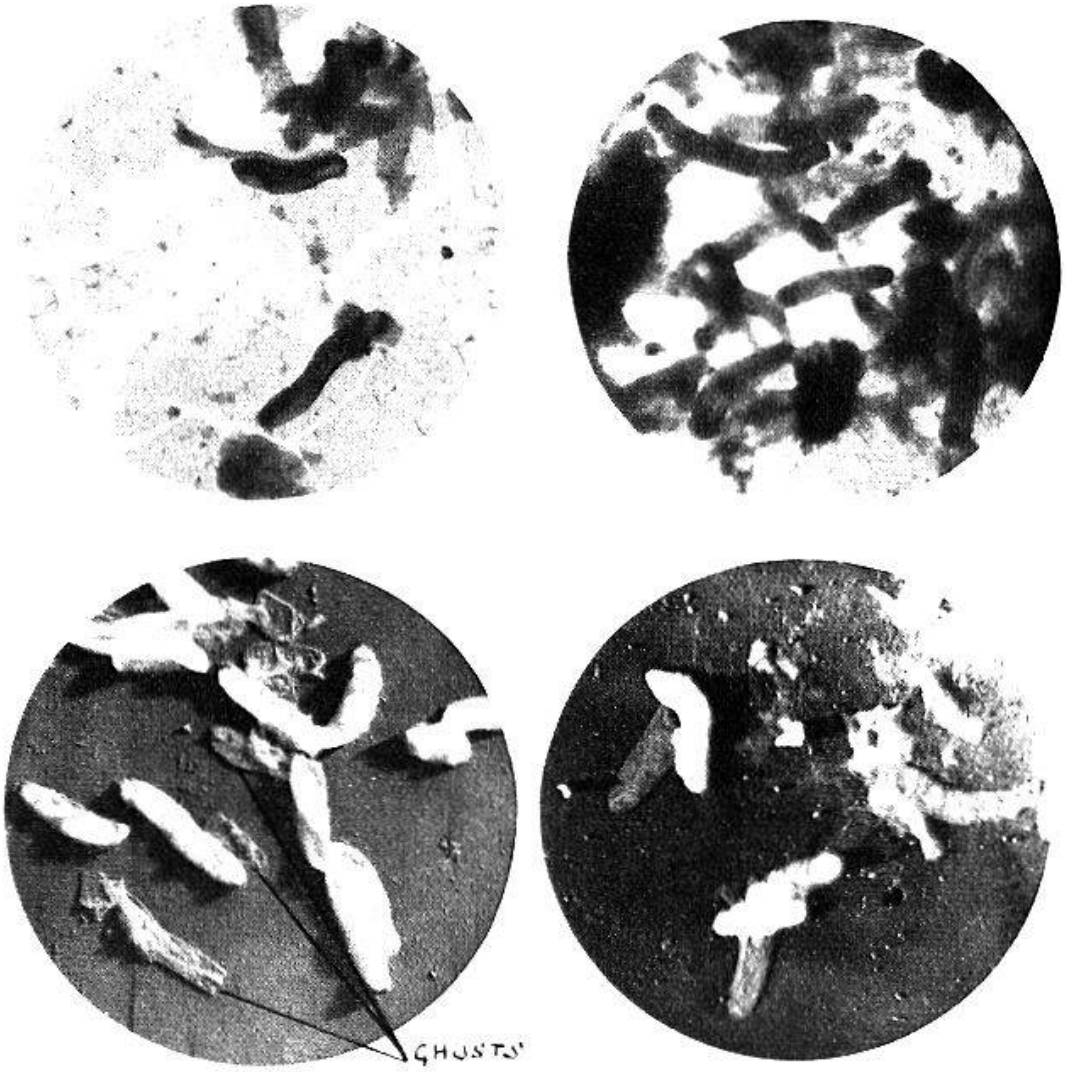

Fig. 3. Fig. 4.

Fig. 3. Vaccin BCG. Lot no 161 pour scarifications. Institut Pasteur, Paris.
Fig. 4. Vaccin BCG. Lot no 165 pour injection intradermique. Institut Pasteur, Paris.

c) *BCG intradermique de l'Institut sérologique de Copenhague. Lot N° 884, examiné 8 jours après préparation. Lavage dans tampon, mc.* Lavé 20 minutes dans le tampon du milieu de Dubos, les formes notées à l'examen de la suspension vaccinale rappellent à divers point de vue celles observées pour le vaccin BCG de l'institut Pasteur de Paris décrites plus haut: d'une part, éléments à morphologie et structure normales, provenant des corps morphologiquement intacts; d'autre part, nombreux éléments bacillaires montrant des altérations plus ou moins marquées de la structure et qui constituent près de la moitié de la suspension vaccinale (fig. 5).

Comme dans le cas des vaccins précédents, il est peu vraisemblable que de telles altérations soient conciliables avec la vitalité et la multiplication éventuelle de ces éléments ainsi dégradés.

d) *Vaccin BCG scarification, préparé à l'Institut d'Hygiène de Genève à partir de culture en pellicule sur le milieu de Sauton.* L'examen au microscope électronique avec et sans ombrage de cette suspension vaccinale, 8 jours après sa préparation, aboutit aux mêmes constatations que pour les vaccins BCG provenant de l'Institut Pasteur de Paris et de l'Institut de Copenhague, comme décrit plus haut, et pouvant se résumer comme suit:

Conservation pour une bonne proportion des éléments d'un bon état morphologique et structurel de ces bacilles. Par contre, altération plus ou moins marquante du reste des éléments, limitant le pourcentage des éléments viables de la suspension vaccinale à un ordre de grandeur approximatif éventuel de 50% de la totalité (fig. 6).

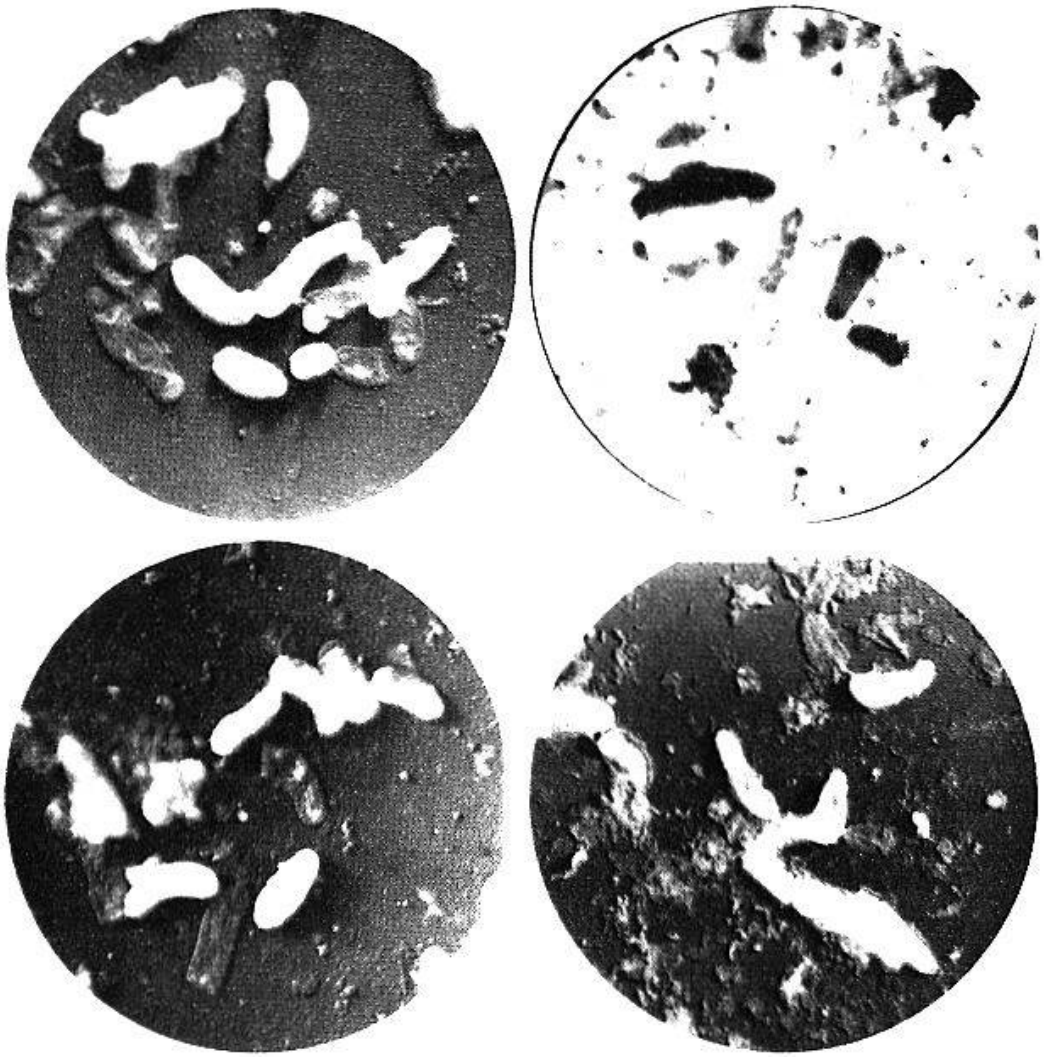

Fig. 5. Fig. 6.

Fig. 5. Vaccin BCG. Lot no 884 pour injection intradermique. Institut Sérologique de l'Etat Danois.

Fig. 6. Vaccin BCG. Lot no 26 pour scarifications. Institut d'Hygiène, Genève.

3. Vaccin BCG obtenu en culture homogène en milieu de Dubos à l'albumine humaine

a) Inoculum: culture de 17 jours dans ce même milieu ensemencé d'une pellicule fine de culture BCG sur pomme de terre. Les bacilles apparaissent courts, relativement plats et montrent des masses polaires surélevées. Morphologie très homogène de toute la suspension (fig. 7).

b) Après 5 heures de culture à 37°. Les bacilles sont dans la phase de «lag» ou phase de latence: leur longueur n'a pas changé, mais ils sont épaissis et turgescents. Les masses polaires subsistent mais sont moins visibles à cause de l'épaississement général (fig. 8).

Fig. 7.

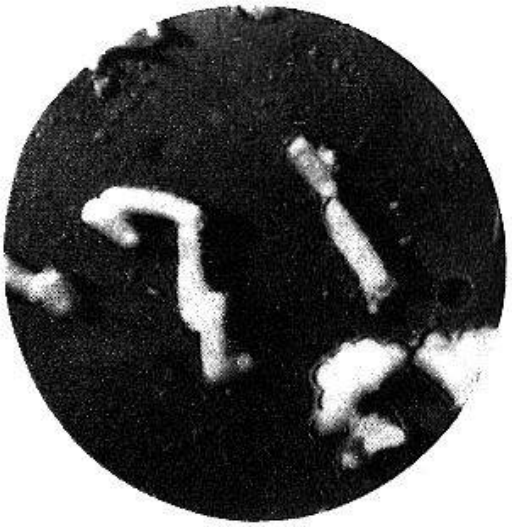

Fig. 8.

Fig. 7. BCG en culture homogène. 17 jour d'incubation à 37°. (Matériel d'ensemencement.)

Fig. 8. BCG en culture homogène. 5 heures d'incubation à 37°.

c) Après 22 heures de culture. Macroscopiquement, à ce stade, on voit déjà une augmentation nette de la poussière floconneuse au fond des flacons de culture. Il ne se forme pas de trouble homogène notable si l'on disperse par légère rotation du flacon ce dépôt. A ce stade, les bacilles sont dans une phase d'allongement très nette, la plupart des corps bacillaires sont 2 à 3 fois plus longs que précédemment. Il faut noter que c'est à ce stade qu'apparaissent des formations intrabacillaires qui seront visibles pendant toute la période de multiplication active, et qui disparaîtront lors de la phase terminale de repos au-delà de deux semaines. Ils se présentent comme de petits disques situés aux extrémités des bacilles, là où l'on voyait précédemment les masses polaires. Ces figures sont très probablement en relation avec la structure nucléaire,

Fig. 9.

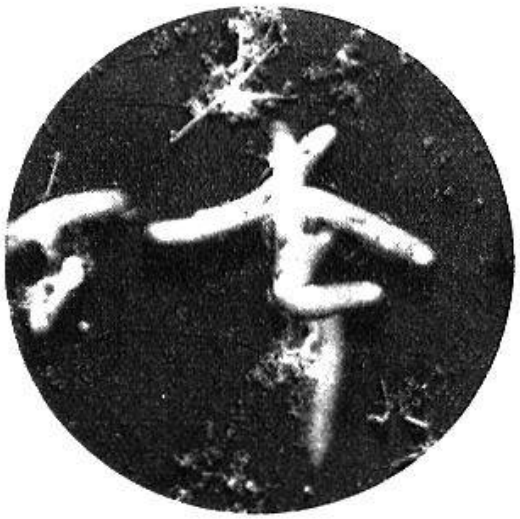

Fig. 10.

Fig. 9. BCG en culture homogène. 22 heures d'incubation à 37°.

Fig. 10. BCG en culture homogène. 48 heures d'incubation à 37°.

puisqu'on les voit se répartir à la phase d'allongement sur la longueur du corps bacillaire, à un stade précédant la sementation de ces derniers.

On peut constater qu'à cette époque tous les bacilles ne sont pas au au même stade, et que si la plupart d'entre eux sont dans la période d'allongement, il en est encore de nombreux qui sont à la période de «lag». (fig. 9).

d) Après 48 heures de culture dépôt très fin. Le trouble qui résulte de l'agitation commence à être appréciable.

La turgescence des germes commence à devenir moins forte. On ne voit plus que deux figures discales par bacille, mais on ne les voit pas partout sur les images ombrées à l'or à cause du manque de contraste au sein des corps bacillaires. On observe encore des bacilles longs, qui voisinent avec des formes courtes (fig. 10).

e) Après 72 heures. Persistance d'une assez grande proportion de formes longues rectilignes ou légèrement incurvées qui paraissent correspondre à des formes en voie de division. Déjà à cette période, on ne trouve plus de formes très longues indivisées, et les masses polaires se reforment plus régulièrement chez tous les éléments (fig. 11).

Ce stade correspond à la division maximum des éléments de la culture, car le trouble croît le plus rapidement à partir du 3e jour jusqu'au 4e. C'est à partir de cette période que le trouble persiste sans qu'il soit nécessaire d'agiter les flacons.

f) Après 10 jours. Jusque là, la culture s'est maintenue en suspension sans agitation, depuis le 4e jour. Elle est cependant moins abondante

Fig. 11.

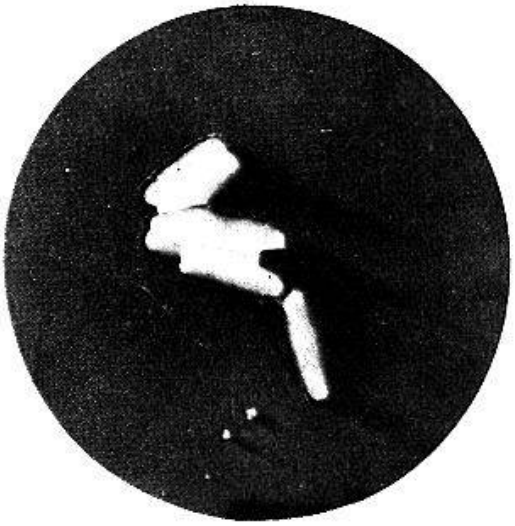

Fig. 12.

Fig. 11. BCG en culture homogène. 72 heures d'incubation à 37°.

Fig. 12. BCG en culture homogène. 10 jours d'incubation à 37°.

que celles qui ont été agitées quotidiennement. Dès le 10e jour, le milieu s'éclaircit remarquablement si on ne l'agite pas, par sédimentation de la culture au fond du flacon. Il semble donc que c'est à partir de cette date que la multiplication se ralentit, bien que la turbidité après agitation continue à augmenter (ex. néphélométrique). La taille des éléments de 10 jours est plus homogène qu'auparavant et tend vers celle des bacilles de l'inoculat. La turgescence est moins marquée. Les masses polaires sont visibles sur presque tous les éléments. L'examen d'un grand nombre de champs microscopiques confirme qu'à ce stade de 10 jours de culture, la presque totalité des corps microbiens présente une intégrité morphologique et structurelle témoignant d'un haut degré de vitalité (fig. 12).

g) Après 17 jours. Le caractère de la prolifération de la culture change: les bacilles prolifèrant en amas. Les frottis faits sans dissocier les éléments montrent, après coloration de Ziehl et de Much, la formation en «corde», décrite par *Dubos* et par *Gernez-Rieux*, caractéristique de la forme antigénique du BCG. La culture cesse cependant d'être utilisable dans le but vaccinal, à cause de la grande dimension des amas. Cette phase tardive paraît être le témoin de la conservation du caractère d'antigéniquité des éléments constituant les amas.

Dans d'autres cas, on observe parfois, si les conditions physiochimiques du milieu ne sont pas équilibrées de façon adéquate, qu'il y a formation précoce de fins agglomérats qui augmentent progressivement de volume et qui se multiplient sans aboutir à une culture homogène.

h) Après 25 jours. Le milieu éclairci reste limpide sur toute la hauteur du flacon dont le fond est recouvert d'une masse visqueuse blanc-crème, compacte, qui s'élève en spirales filamenteuses après que l'on ait agité le flacon par rotation, et qui est très difficilement dissociable par agitation manuelle.

Du point de vue production du vaccin BCG, le stade optimum de croissance paraît correspondre d'après les caractères microscopiques et courbes d'accroissement de la culture à 8 à 10 jours de culture. Cette période de culture correspond également à un état physique de fine dispersion des éléments bacillaires dans le milieu de culture, qui permet d'utiliser ce dernier tel quel sans qu'on soit dans l'obligation de le soumettre à des moyens physiques de dissociation et de dispersion complémentaires et d'obvier aux risques d'altération que ce dernier comporte. Ces conditions assurent l'obtention d'une suspension vaccinale présentant le maximum d'éléments viables et d'un haut pouvoir antigénique.

Vaccinations expérimentales

Afin de nous rendre compte de la tolérance de l'organisme animal, nous avons injecté cette suspension vaccinale à des cobayes par voie intradermique: 8 cobayes furent injectés avec 0,1 cm³ d'une suspension vaccinale provenant d'une culture de 8 jours en milieu de *Dubos*, ajustée à la concentration correspondant à 0,75 mg par cm³ (correspondant ainsi à la concentration utilisée pour la vaccination humaine par voie intradermique (0,075 cm³, sous un volume de 0,1 cm³). Cette dose est en fait considérablement supérieure à ce qu'elle représente pour le vaccin préparé par le procédé classique, étant donné la proportion beaucoup plus élevée des éléments vivants qu'elle contient. La petite papule formée

Résultats des cutiréactions à la Tuberculine aux cobayes injectés avec le vaccin BCG obtenu en culture homogène

Cobaye No	PPD injectée le 18 IV. 1950	Cutiréaction après 48 heures le 20 IV. 1950
189	10 U.	12 × 15 mm
135	10 U.	10 × 10 mm
184	10 U.	5 × 6 mm
153	10 U.	10 × 8 mm
134	10 U.	10 × 10 mm
181	10 U.	10 × 10 mm
117	10 U.	12 × 12 mm
308	10 U.	12 × 12 mm

par l'injection persiste pendant les trois jours suivant l'administration du vaccin.

Trois semaines plus tard, ces animaux reçoivent une injection intradermique de tuberculine purifiée PPD de 10 U. Les réactions, lues après 48 heures, sont nettement positives, traduisant un état allergique manifeste chez tous les animaux.

L'expérimentation en cours nous montre que cet état allergique peut être obtenu avec des doses beaucoup plus faibles de ce vaccin.

Appréciation de la vitalité des suspensions vaccinales par ensemencement sur milieux appropriés

0,1 cm^3 de la suspension originale de même que des dilutions à 1/10, 1/100 et 1/1000 de ces dernières furent ensemencées à la surface de milieu de Lœwenstein et de Dorset.

15 jours plus tard, on pouvait déjà compter sur *Lœwenstein* de nombreuses colonies de la suspension-mère ainsi qu'à la dilution à 1/10. L'inoculum de la suspension de la dilution à 1/100 donnait également une croissance de caractère plus limité.

L'ensemencement de la dilution à 1/1000 se montrait encore positif à raison de quelques dizaines de colonies pour 0,1 cm^3 d'inoculum.

Des résultats analogues ont été observés pour les ensemencements sur *Dorset* à l'exception des tubes ensemencés avec la solution au 1/1000 qui restèrent stériles.

Conclusions

La vitalité des éléments constituant le vaccin BCG, dont dépend essentiellement la valeur antigénique de ce dernier, paraît être conditionnée dans une large mesure par le procédé de préparation de ce vaccin.

Les examens comparatifs effectués au microscope électronique des suspensions vaccinales de BCG d'origines diverses mettent en évidence les faits suivants:

1. Altérations morphologiques et structurales plus ou moins profondes d'une proportion importante des éléments bacillaires des vaccins BCG obtenus à partir de culture en pellicule sur milieu de Sauton et dont la masse bacillaire est soumise à une action de dissociation mécanique susceptible d'exercer une influence préjudiciable à la vitalité des éléments bactériens ainsi traités.

2. Degré d'intégrité cellulaire considérablement supérieur observé pour les éléments bacillaires constituant les suspension vaccinales BCG obtenues de culture homogène dans le milieu modifié de *Dubos*, technique ne nécessitant aucun procédé de dissociation de la suspension vaccinale.

dont la dispersion est réalisée au cours même de la culture par l'introduction d'un mouillant dans le milieu.

3. Le haut degré de vitalité des suspensions vaccinales homogènes obtenues de milieu de *Dubos*[1], trouve son corollaire dans un pouvoir allergisant élevé du vaccin BCG ainsi préparé, chez les animaux immunisés par ce dernier, de même que dans les résultats de cultures de contrôle sur milieux de *Dorset* et *Lœwenstein*, dont l'ensemencement se montre encore positif pour la dilution 1:1000 de la dose usuelle pour vaccination humaine par voie intradermique.

Schlußfolgerungen

Die Lebenskraft der die BCG-Vaccine bildenden Elemente, von denen hauptsächlich der Antigenwert der letzteren abhängt, scheint in großem Maße durch das Herstellungsverfahren dieser Vaccine bedingt zu sein.

Die vergleichenden Untersuchungen von BCG Vaccineaufschwemmungen verschiedener Herkunft im Elektronenmikroskop zeigen folgende Tatsachen:

1. Mehr oder weniger ausgeprägte morphologische und strukturelle Veränderungen eines erheblichen Teiles der bazillären Elemente der aus einer Häutchenkultur auf Nährboden Sauton hervorgegangenen BCG-Vaccinen, deren bazilläre Masse einer mechanischen Aufspaltung unterworfen wurde, welch letztere eine ungünstige Auswirkung auf die Lebenskräfte der so behandelten bakteriellen Elemente haben könnte.

2. Bei der aus einer homogenen Kultur aus dem von *Dubos* modifizierten Nährboden hervorgegangenen BCG-Vaccine wird eine viel häufigere Integrität der Zellen beobachtet. Nach dieser Technik ist es nicht nötig, irgendeine Aufspaltung der Vaccineaufschwemmung vorzunehmen, denn die letztere wird bereits während des Wachstums durch das Einführen eines Benetzungsmittels in die Nährlösung verwirklicht.

3. Der hohe Vitalitätsgrad der in der Nährflüssigkeit von *Dubos* hergestellten homogenen Vaccineaufschwemmungen findet seine Bestätigung einerseits in einer hohen allergisierenden Kraft der so fabrizierten BCG-Vaccine bei den damit immunisierten Tieren, anderseits in den Ergebnissen der Kontrollkulturen von *Dorset* und *Löwenstein*, wo eine Beimpfung noch positiv ausfällt, selbst für die Verdünnung von 1:1000 der bei den Menschen gebräuchlichen intradermalen Dosis.

---

[1] Au cours des travaux susmentionnés parut la publication récente de *Dubos* (4) (mars 1950) relative au pouvoir antigénique et allergisant du vaccin BCG en culture homogène. Nous avons pu constater que certaines des expériences que nous avions entreprises avaient été réalisées par cet auteur et que la nature de nos observations se superposait de près aux résultats obtenus décrits par ce dernier.

Conclusioni

La vitalità degli elementi che costituiscono il vaccino B.C.G., vitalità che ne determina essenzialmente il valore antigenico, sembra sia in gran parte in rapporto al modo di preparazione del vaccino.

Gli esami comparativi fatti al microscopio elettronico delle sospensioni di vaccini B.C.G. d'origine diversa mostrano i fatti seguenti:

1. Alterazioni morfologiche e strutturali più o meno profonde d'una parte importante degli elementi bacillari dei vaccini B.C.G., ottenuti da culture in superficie su terreno di Sauton, la cui massa bacillare è sottoposta a dissociazione meccanica che può esercitare un'azione dannosa sulla vitalità dei bacilli così trattati.

2. Grado d'integrità cellulare molto superiore dei bacilli che costituiscono le sospensioni di vaccini B.C.G. ottenuti in cultura omogenea sul terreno modificato di *Dubos*: questa tecnica non richiede la dissociazione della sospensione batterica perchè la dispersione si produce di già durante la cultura per l'azione del «mouillant» contenuto nel terreno.

3. L'alto grado di vitalità delle sospensioni vaccinali omogenee ottenute sul terreno di *Dubos* trova il suo corollario in un potere allergizzante elevato del vaccino B. C. G. così preparato negli animali che lo ricevono: come pure nel fatto che le culture di controllo su terreno di *Dorset* e di *Löwenstein* si mostrano ancora positive coll'insemenzamento di una diluzione 1:1000 della dose solita impiegata nella vaccinazione umana per via intradermica.

Conclusions

The vitality of the elements constituting the BCG vaccine, of which the antigenic power of the latter essentially depends, appears to be conditioned, in a large measure, by the process of preparation of this vaccine.

Comparative examinations carried out by means of the electronic microscope on BCG vaccinal suspensions of various origins, bring in evidence the following facts:

1. Considerable structural and morphological alterations of a relatively important proportion of the bacillary elements of the BCG vaccines obtained from surface growth on Sauton medium, the bacillary mass of which is submitted to a dissociated mechanical process, susceptible of exercising a harmful influence on the vitality of the bacterial elements thus treated.

2. A far greater degree of cellular integrity is observed in the bacillary elements constituting the BCG vaccinal suspensions obtained in homogeneous culture in the modified *Dubos* medium, a technic which neces-

sitates no process of dissociation of the vaccinal suspension and the dispersion of which is obtained during the growth itself, by the introduction of a tween in the medium.

3. The high degree of vitality of the homogenous vaccinal suspensions obtained in *Dubos* medium finds its corollary in the high allergic power of the BCG vaccine thus prepared, in animals immunized by the latter, as well as in the results of the control cultures on *Dorset* and *Lœwenstein* media, which appear still positive in the 1:1000 dilution of the usual dose for human intradermic immunization.

Nous désirons exprimer nos remerciements à M. *Ed. Kellenberger*, Chef du laboratoire de Microscopie Electronique de l'Institut de Physique de l'Université, pour les facilités que nous avons reçues de sa part dans la réalisation de ces recherches.

1. *Dubos, R. J., Fenner, F.*, et *Pierce, C.:* Amer. Rev. Tbc. **61,** 66 (1950). – 2. *Dubos, R. J.*, et *Middlebrook, G.:* Amer. Rev. Tbc. **56,** 334 (1947). – 3. *Kellenberger, E.:* Experientia V/**6,** 253 (1949). – 4. *Dubos, R. J.*, et *Fenner, F.:* J. exper. (Am.) **91,** 261 (1950); *Fenner, F.*, et *Dubos, R. J.:* J. exper. Med. (Am.) **91,** 269 (1950).