

Les bases immunologiques de la vaccination

2

La diphtérie



Programme élargi
de vaccination



Organisation mondiale de la santé
Genève, 1993

Les bases immunologiques de la vaccination

Module 1 : Immunologie générale

Module 2 : Diphtérie

Module 3 : Tétanos

Module 4 : Coqueluche

Module 5 : Tuberculose

Module 6 : Poliomyélite

Module 7 : Rougeole

Module 8 : Fièvre jaune

Le Programme élargi de vaccination tient à remercier ceux dont l'aide a permis la réalisation de ces modules:

Le Programme des Nations Unies pour le développement (PNUD)
La Fondation Rockefeller
Le Gouvernement suédois

Les bases immunologiques de la vaccination

2

La diphtérie

Dr Artur M. Galazka

Docteur en médecine

Programme élargi de vaccination



Programme élargi
de vaccination



Organisation mondiale de la santé
Genève, 1993

©1993 Organisation Mondiale de la Santé

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), qui en possède néanmoins tous les droits. Ce document peut toutefois être utilisé, résumé, reproduit et traduit librement, en totalité ou en partie, sauf à des fins commerciales.

Les vues exprimées dans ces documents sont sous la responsabilité des seuls auteurs.

Table des matières

Préface	v
1. La toxine diphtérique	1
2. Nature de l'immunité envers la diphtérie	1
3. Techniques de mesure de la réponse anticorps	1
3.1 Test de Schick	2
3.2 Test de neutralisation chez l'animal	2
3.3 Test de neutralisation en culture cellulaire sur microplaques	2
3.4 Hémagglutination passive	3
3.5 ELISA	3
4. Taux protecteur d'anticorps	3
5. Production d'anticorps après stimulation naturelle	3
5.1 L'époque de la prévacination dans les pays industrialisés	3
5.2 Les pays en développement dans les années 1960	4
5.3 Les pays en développement aujourd'hui	4
6. Immunité liée à la vaccination	5
6.1 Mise en place et durée de l'immunité induite par la vaccination	5
6.2 Variations du profil immunitaire de différentes tranches d'âge après la campagne de vaccination	7
6.3 Stratégies de vaccination contre la diphtérie	8
7. Implications pour les programmes de vaccination	9
Abréviations	10
Références	10

Préface

Cette collection de modules sur les bases immunologiques de la vaccination résulte de l'expérience des personnes impliquées dans le Programme élargi de vaccination (PEV) de l'OMS. Le PEV a été mis en place en 1974, pour élargir les services de vaccination à d'autres maladies que la variole, et surtout pour les rendre accessibles aux enfants des pays en développement.

Six maladies pouvant être prévenues par la vaccination ont été incluses dès le début dans le PEV: la diphtérie, la rougeole, la coqueluche, la poliomyélite, le tétanos et la tuberculose. Pour protéger les nouveau-nés contre le tétanos néonatal, l'anatoxine tétanique est administrée aux mères durant leur grossesse, ou aux femmes en âge de procréer.

Deux autres maladies évitables par la vaccination auront été rajoutées au PEV au cours des années 1990. L'Assemblée mondiale de la santé s'est fixé l'objectif d'inclure le vaccin contre la fièvre jaune dans le PEV avant 1993, dans les pays exposés à cette maladie. Le vaccin contre l'hépatite B est rajouté progressivement, avec la date butoir de 1997 pour son incorporation aux programmes de vaccination de tous les pays.

La liste des modules de cette collection figure en deuxième de couverture. Ces ouvrages ont été conçus pour fournir les bases immunologiques des stratégies et des schémas de vaccination recommandés par l'OMS. Ils s'adressent principalement :

- aux responsables des programmes de vaccination, dont les interrogations et les inquiétudes sont à l'origine de cette collection,
- aux consultants et conseillers en vaccinologie,
- aux professeurs d'université responsables de cours de vaccination et aux animateurs de séminaires,
- aux étudiants en médecine et aux étudiants des professions paramédicales, qui en bénéficieront pour leur formation de base,
- aux scientifiques des laboratoires chargés du diagnostic ou impliqués dans la recherche sur les maladies qui peuvent être prévenues par des vaccins, et
- aux chercheurs impliqués dans la recherche fondamentale visant à améliorer les vaccins ou leur administration.

Les autres modules de cette collection, ainsi que les informations sur le PEV sont disponibles auprès du Programme élargi de vaccination, Organisation mondiale de la santé, 1211 Genève 27, Suisse.

La diphtérie

1. La toxine diphtérique

La diphtérie est une maladie bactérienne dont les symptômes cliniques sont liés à la production d'une protéine extracellulaire (exotoxine) par *Corynebacterium diphtheriae*, un bacille de forme incurvée.

La toxine diphtérique est une toxine de type A-B. En effet, cette protéine d'un poids moléculaire de 62000 d est constituée de deux fragments A et B. Le fragment B permet son attachement à des récepteurs cellulaires et son internalisation. Le fragment A est responsable de l'action toxique, par une réaction enzymatique inhibant la synthèse protéique, entraînant ainsi la mort des cellules. La toxine diphtérique diffuse dans l'organisme et agit plus particulièrement sur le cœur (myocardite) et les systèmes nerveux centraux et périphériques (faiblesse allant jusqu'à la paralysie).

Toutes les souches toxigènes de *C. diphtheriae* produisent la même toxine. Pour être toxigène, une souche doit être infectée par un virus bactérien, le bactériophage. On parle alors de conversion lysogène. Lors de l'irruption d'une souche toxigène dans une communauté, le transfert du bactériophage aux souches de corynébactéries initialement non toxigènes et normalement présentes dans l'appareil respiratoire des membres de cette communauté, peut entraîner l'apparition de la diphtérie. Ainsi, lors d'une résurgence de cette maladie, on peut isoler des souches toxigènes et non toxigènes (Mortimer 1988).

Après chauffage et traitement au formol, la toxine diphtérique est transformée en un dérivé atoxique appelé anatoxine, qui a perdu sa capacité à se lier aux cellules et son activité enzymatique, tout en conservant son immunogénicité. Cette anatoxine est utilisée pour la vaccination antidiphtérique. Cependant, dans certaines conditions encore mal définies, le mécanisme de conversion de la toxine en anatoxine est réversible. Ainsi, en 1948, un groupe pharmaceutique japonais a commercialisé une anatoxine diphtérique qui est retournée à l'état de toxine, entraînant alors la mort de nombreux enfants au cours de la vaccination antidiphtérique (Kurokawa & Murata 1961). Depuis ce drame, les industries pharmaceutiques ont mis en place des contrôles destinés à écarter tout risque de réversion vers l'état toxique.

La diphtérie se transmet entre les humains par contact direct, avec une période d'incubation allant de 2 à 5 jours. Cette infection affecte les amygdales, le pharynx, le larynx et le nez. Dans les pays en développement, une forme cutanée de la diphtérie s'observe fréquemment avec des lésions similaires ou associées à un impétigo. La forme laryngée de la diphtérie est grave tandis que la forme nasale est peu sérieuse et souvent chronique. Le nombre de cas cliniques est sous-estimé car l'infection présente également des formes non apparentes. A un stade avancé de la maladie, on observe des paralysies motrices et sensorielles ainsi que des myocardites, avec une mortalité de 5 à 10 %.

2. Nature de l'immunité envers la diphtérie

L'immunité envers la diphtérie est médiée par des anticorps. La mortalité lors de cette maladie est directement liée à la présence de la toxine diphtérique et l'immunité repose essentiellement sur la réponse anticorps dirigée contre la toxine. L'anticorps désigné sous le terme d'antitoxine est de type IgG. Cette antitoxine circule à travers tout l'organisme et passe aisément la barrière placentaire, procurant ainsi une immunité passive au nouveau-né durant les premiers mois de sa vie. L'antitoxine peut être induite soit directement par la toxine diphtérique produite par *C. diphtheriae* chez le malade ou le porteur sain, soit par la vaccination avec l'anatoxine diphtérique. Dans les deux cas, les anticorps sont identiques et indiscernables par les techniques actuelles.

3. Techniques de mesure de la réponse anticorps

Pour évaluer la réponse anticorps contre la diphtérie, on utilise deux propriétés majeures de la toxine diphtérique. La première repose sur son pouvoir dermonécrotique, c'est à dire sa capacité à provoquer une réaction inflammatoire après injection intradermique chez l'homme ou l'animal. Le test de Schick chez l'humain utilise cette propriété et permet de déterminer le pouvoir de neutralisation des anticorps *in vivo* dans des modèles animaux. Deuxièmement, en présence de la toxine diphtéri-

que, les cellules des mammifères sensibles meurent suite au blocage de leur synthèse protéique par la toxine. Ainsi, des systèmes de neutralisation *in vitro*, utilisant des cultures de cellules sensibles à la toxine diphtérique, permettent de mesurer les titres d'anticorps antidiphtériques. D'autres essais *in vitro* tels que l'hémagglutination passive et le test immunoenzymatique ELISA permettent également de mesurer la réponse anticorps envers la diphtérie. Pour des raisons éthiques, économiques et pratiques, les tests *in vitro* sont les plus utilisés.

3.1. Test de Schick

Le test de Schick a constitué la méthode de référence pour les premières études. Lors de ce test, on injecte par voie intradermique 0,1 ml de toxine diphtérique (soit 1/50^e de la dose minimale létale pour le cobaye) dans l'avant-bras du sujet à tester. Lorsqu'il possède un taux d'antitoxines diphtériques circulantes compris entre 0,01 et 0,03 UI/ml, la toxine injectée est neutralisée et la réaction négative. En revanche, une réaction positive signifie que la personne n'est pas immunisée, et cela se traduit 24 à 36 heures après l'injection par une réaction inflammatoire qui persiste au moins 4 jours. Lors de ce test, on effectue toujours un contrôle sur le bras opposé avec la toxine inactivée à 60°C pendant 15 minutes. Une réaction positive à l'anatoxine et à la toxine indique une réaction allergique à la toxine. Les résultats de ce test peu coûteux présentent une bonne corrélation avec les taux sériques d'antitoxines. Cependant, ce test présente la difficulté technique de pratiquer une injection intradermique, et nécessite deux injections (l'une avec la toxine, l'autre avec la toxine inactivée contrôle) et deux consultations (l'une pour les injections, l'autre pour la lecture des réactions 4 à 7 jours plus tard). De plus, les résultats de ce test dépendent de la sensibilité cutanée individuelle à la toxine injectée (Vahlquist 1949). En effet l'anergie de la peau fréquente chez les nouveau-nés et les jeunes enfants entraîne des résultats faussement négatifs qui peuvent être interprétés comme le signe d'une immunité antidiphtérique (Papadatos *et al.* 1967, Vogelsang & Krivy 1945, Wright & Clark 1944).

3.2 Test de neutralisation chez l'animal

Le test de neutralisation *in vivo* est habituellement réalisé sur la peau rasée du lapin (Jensen 1933) ou du cobaye (Glenny & Llewellyn-Jones 1931). Différentes dilutions du sérum à tester, mélangées à des quantités connues de toxine diphtérique, sont injectées dans la peau rasée de l'animal et la concentration sérique d'antitoxine

est déterminée en fonction de la réaction inflammatoire. Les résultats de ces tests de neutralisation *in vivo* varient en fonction de l'avidité de l'anticorps testé, de la concentration de toxine utilisée pour le titrage, et de l'animal de laboratoire. Ces tests sont laborieux, longs, chers et nécessitent les animaux adéquats, mais ils permettent, d'évaluer la capacité fonctionnelle de l'anticorps à neutraliser la toxine. Les systèmes *in vitro* mettent en évidence non seulement la neutralisation de la toxine par les anticorps sériques mais aussi d'autres réactions antigène-anticorps. C'est pourquoi, ils doivent être régulièrement calibrés et vérifiés par des tests de neutralisation *in vivo*.

3.3 Test de neutralisation en culture cellulaire sur microplaques

Ce test de neutralisation en microculture cellulaire repose sur l'inhibition de la croissance des cellules de mammifères en culture par la toxine diphtérique. Cet effet est neutralisé en présence de l'antitoxine diphtérique (Miyamura *et al.* 1974a et 1974b). On réalise le titrage de l'antitoxine en incubant des dilutions du sérum à tester avec la toxine diphtérique dans les puits d'une microplaque en plastique. Après une courte incubation, on ajoute des cellules Vero (épithélium rénal de singe vert) ou HeLa en suspension dans le milieu de culture approprié. En présence d'une dilution de sérum contenant l'antitoxine en excès, la croissance cellulaire se poursuit et s'accompagne au bout de 3 ou 4 jours, d'une acidification du milieu dont la couleur vire du rouge au jaune suite à la formation d'acides au cours du métabolisme cellulaire. Les cellules Vero sont plus sensibles à la toxine diphtérique car elles portent un grand nombre de récepteurs et lient donc la toxine de façon hautement spécifique en fonction du temps et de la température (Middlebrook *et al.* 1978). Ce test a été récemment amélioré par la détermination spectrophotométrique d'un point d'équivalence entre la toxine et l'antitoxine et l'analyse informatisée des valeurs d'absorbance (Aggerbeck & Heron 1991).

Cette technique *in vitro* sur microplaque est très sensible (limite de détection à 0,005 UI/ml), reproductible et nécessite une faible quantité de sérum. Un seul test permet de titrer une centaine d'échantillons. Ce test a été utilisé pour déterminer la réponse anticorps antidiphtériques chez les humains (Palmer *et al.* 1983) et les animaux (Kreeftenberg *et al.* 1985). Chez l'homme et le cobaye, il existe une bonne corrélation entre les résultats obtenus avec les tests de neutralisation *in vitro* et les tests de neutralisation *in vivo* sur la peau de lapin (Kjeldsen *et al.* 1988, Kriz *et al.* 1974, Miyamura *et al.* 1974a et 1974b). Le test de

neutralisation *in vitro* a été modifié (*Padouan et al.* 1991); il nécessite cependant un personnel expérimenté en culture cellulaire et un équipement de laboratoire adapté.

3.4 Hémagglutination passive

Le test d'hémagglutination passive (HA) est souvent utilisé pour détecter les anticorps antidiphtériques (*Allerdist & Ehrengut-Lange* 1982, *Cellesi et al.* 1989a, *Crossley et al.* 1979, *Fulthorpe* 1962, *Galazka & Abgarowicz* 1967, *Galazka & Kardymowicz* 1989, *Koblin & Townsend* 1989, *Millian et al.* 1967, *Ruben et al.* 1978, *Thorley et al.* 1975). Lors du test HA, des érythrocytes de mouton, de dinde, de cheval ou des érythrocytes humains (précédemment traités par l'acide tannique ou la benzidine diazotée et sensibilisés à l'anatoxine diphtérique) sont agglutinés par les anticorps antidiphtériques. Le test HA ne coûte pas cher et peut être réalisé dans un laboratoire peu équipé. Il est rapide (résultats obtenus en 1 heure), reproductible et sensible. Pour la diphtérie, il existe une bonne corrélation entre les résultats du test HA et ceux des tests de neutralisation, mais le test HA a tendance à sous-estimer les faibles concentrations d'anticorps antidiphtériques (*Galazka & Abgarowicz* 1967, *Scheibel et al.* 1962, *Simonsen* 1989), alors que pour le tétanos, il tend à surestimer les titres d'anticorps (cf. module 3). La présence dans le sérum d'agglutinines non spécifiques dirigées contre les antigènes de surface des globules rouges peut modifier les résultats du test HA pour la diphtérie. Cet effet peut être minimisé par chauffage du sérum à 56°C, prétraitement avec le 2-mercaptoéthanol ou adsorption des sérums sur des érythrocytes non sensibilisés.

3.5 ELISA

Le test immunoenzymatique (ELISA) repose sur la capacité de l'antigène à se lier au polystyrène. Les exotoxines comme la toxine diphtérique (ou l'anatoxine) possèdent un groupement moléculaire très lipophile permettant une bonne adhérence au polystyrène des tubes (*Svenson & Larsen* 1977). Les résultats de l'ELISA direct sont très reproductibles (*Camargo et al.* 1984, *Melville-Smith & Balfour* 1988). Lorsque le taux d'anticorps est supérieur à 0,1 UI/ml, les résultats de l'ELISA concordent avec ceux du test de neutralisation *in vivo* chez le cobaye (*Knight et al.* 1986) et *in vitro* dans les cultures cellulaires (*Melville-Smith & Balfour* 1988). Lorsque le titre d'anticorps est bas, la corrélation de l'ELISA avec les tests de neutralisation est faible. Ainsi avec un ELISA direct on obtient des titres 10 à 100 fois supérieurs (0,01 à 0,1 UI/ml) à ceux obtenus avec le test de

neutralisation (0,001 UI/ml) (*Knight et al.* 1986, *Melville-Smith & Balfour* 1988). Cependant on obtient de meilleures corrélations avec des versions modifiées de l'ELISA (*Hendriksen et al.* 1989, *Knight et al.* 1986). L'une de ces versions, le test d'inhibition de la liaison de la toxine (ToBI), présente une bonne corrélation ($r = 0,91$) avec le test de neutralisation *in vitro* sur les cellules Vero (*Hendriksen et al.* 1989).

Le test ELISA offre comme principal avantage de permettre le dosage des anticorps antidiphtériques de type IgG (*Dengrove et al.* 1986).

4. Taux protecteur d'anticorps

On considère qu'un taux circulant d'antitoxines diphtériques de 0,01 UI/ml, déterminé par les tests de neutralisation chez l'animal et sur les cultures cellulaires, assure une immunité clinique envers la maladie. Ce taux d'antitoxine correspond à un test de Schick négatif. Il existe une bonne concordance entre protection clinique et présence sérique de l'antitoxine suite à la maladie ou à la vaccination. En 1984, lors d'une épidémie de diphtérie en Suède, les sept patients décédés ou souffrant de complications neurologiques avaient des taux d'antitoxines $< 0,01$ UI/ml, tandis que 92% des porteurs sains présentaient des taux d'antitoxines $> 0,16$ UI/ml (*Bjorkholm et al.* 1986). Il est cependant, difficile de définir précisément le taux d'antitoxine assurant une protection totale contre la diphtérie (*Ipsen* 1946) et on peut accepter une certaine marge de variation. Le même taux d'antitoxine assure une protection différente selon les individus. La dose et la virulence du bacille ainsi que l'état immunitaire du sujet infecté influencent également la sensibilité à la maladie (*Christenson & Bottiger* 1986). Ainsi, on considère qu'une concentration d'anticorps de 0,01 à 0,09 UI/ml assure une immunité relative, tandis qu'un titre plus élevé assure une protection totale. D'après des études réalisées à l'aide de tests *in vitro*, le taux protecteur serait de 0,1 UI/ml (*Cellesi et al.* 1989a, *Galazka & Kardymowicz* 1989).

5. Production d'anticorps après stimulation naturelle

5.1 L'époque de la prévacination dans les pays industrialisés

Avant l'époque de la vaccination, lorsque la présence de *C. diphtheriae* était importante et les cas de diphtérie nombreux, l'immunité naturelle acquise lors des formes apparentes ou non apparentes de l'infection était la seule source de protec-

tion. La diphtérie était avant tout une maladie infantile. Les premières études réalisées à Vienne en 1919 et à New York en 1921, mettaient en évidence un profil immunitaire particulier. La plupart des nouveau-nés avaient acquis une immunité passive par leur mère. Cette immunité diminuait entre 6 mois et 1 an, puis augmentait rapidement pendant la jeune enfance, traduisant une exposition accrue aux corynébactéries (Figure 1). Tous les sujets entre 1.5 et 20 ans avaient acquis une immunité naturelle envers la diphtérie. Ce profil a été observé aux Etats-Unis en 1935 (Chason 1936), en Pologne de 1954 à 1955 (Daniel et al. 1957) et au Japon en 1955 (Miyamura et al. 1983).

5.2 Les pays en développement dans les années 1960

Les données concernant les pays en développement dans les années 60 montrent le même profil d'immunité naturelle acquise envers la diphtérie que ceux observés en Europe et aux Etats-Unis avant l'époque de la vaccination. Ces données proviennent d'Afghanistan, de Birmanie et du Nigeria (Kriz et al. 1980), d'Inde (Chakraborty & Choudhuri 1969, Robinson et al. 1964, Suri et al. 1967), du Sri Lanka (Gunatillake & Taylor 1981) et du Zaïre (Muyembe et al. 1972). Le processus d'acquisition de cette immunité naturelle était ra-

pide avec, dans certains pays, 80% des enfants immunisés avant l'âge de 10 ans (Figure 1)

5.3 Les pays en développement aujourd'hui

Dans les pays en développement, les infections cutanées à *C. Diphtheriae* sont fréquentes et constituent le principal réservoir de corynébactéries. Elles jouent un rôle important dans l'acquisition précoce de l'immunité naturelle envers la diphtérie (Baum et al. 1985, Bray et al. 1972). Ces infections cutanées étant à l'état endémique, ces pays ne déclarent pas d'épidémies de diphtérie comme c'était le cas dans les pays industrialisés avant la vaccination. Aujourd'hui dans les pays en développement, la répartition des cas de diphtérie en fonction de l'âge traduit le statut immunitaire de la population, la diphtérie restant essentiellement une maladie du jeune enfant avant l'âge de 15 ans.

Les changements socio-économiques, en particulier la migration des zones rurales vers les villes et les changements socioculturels liés à l'amélioration de l'hygiène et aux changements de mode de vie, peuvent modifier le profil épidémiologique de la diphtérie. Cette maladie pourrait réapparaître sous l'aspect épidémique avec des formes plus ou moins graves et parfois mortelles comme la diphtérie laryngée ou pharyngée.

Figure 1 : Immunité naturelle envers la diphtérie, avant l'époque de la vaccination dans les pays industrialisés de 1919 à 1921 et dans les pays en développement de 1965 à 1969. (Zingher 1923 pour la ville de New York; Stransky & Felix 1949 pour Vienne; Kriz et al. 1980 pour la Birmanie, le Nigeria et l'Afghanistan)

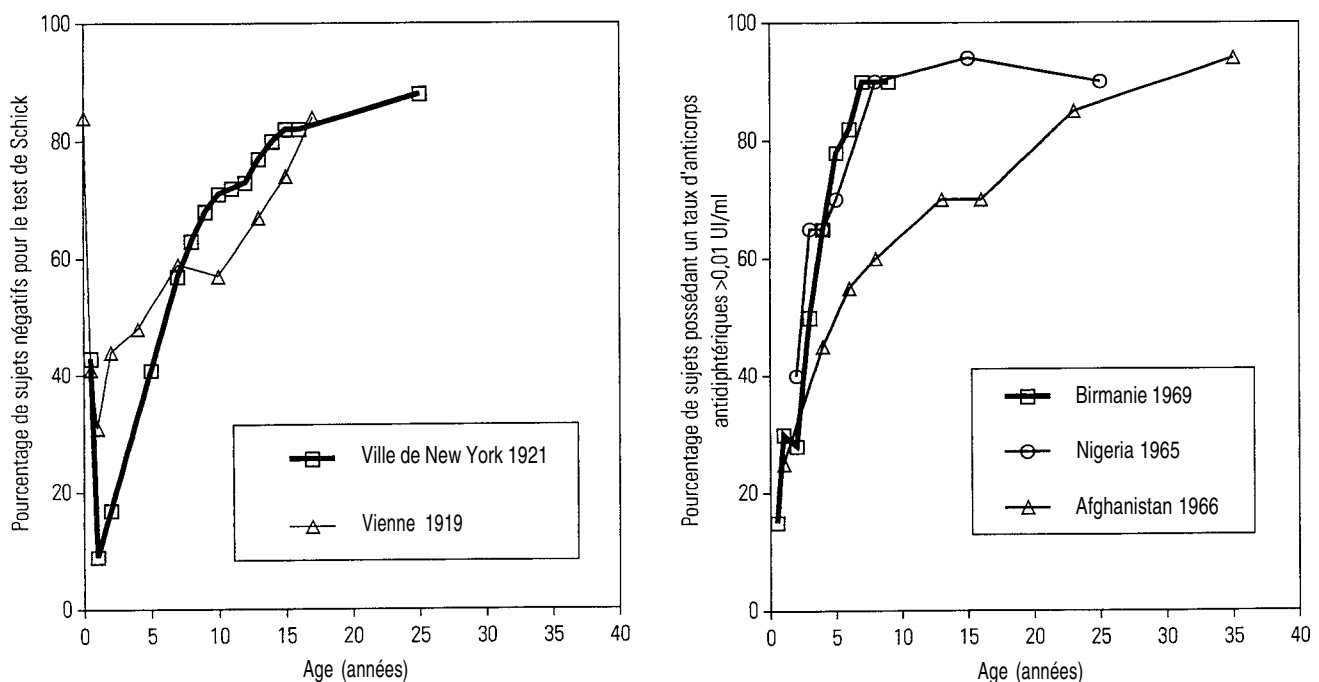


Tableau 1. Réponse immunitaire envers la diphtérie, après la vaccination avec le DTC contenant un constituant acellulaire de la coqueluche chez des enfants d'âges variés (Kimura et al. 1991).

Age (mois)	Moyenne géométrique des titres d'anticorps antidiphtériques en UI/ml				
	Avant la 1ère dose	Avant la 3ème dose*	Après la 3ème dose	Avant le rappel**	Après le rappel
3 à 8	<0,01	0,8	1,6	0,3	6,7
9 à 23	<0,01	0,5	1,5	0,3	10,2
24 à 30	<0,01	0,7	1,7	0,3	8,3

* les 3 premières doses sont administrées à intervalles de 6 à 10 semaines
 ** le rappel (4ème dose) est administré 12 à 18 mois après la 3ème dose

6. Immunité liée à la vaccination

6.1 Mise en place et durée de l'immunité induite par la vaccination

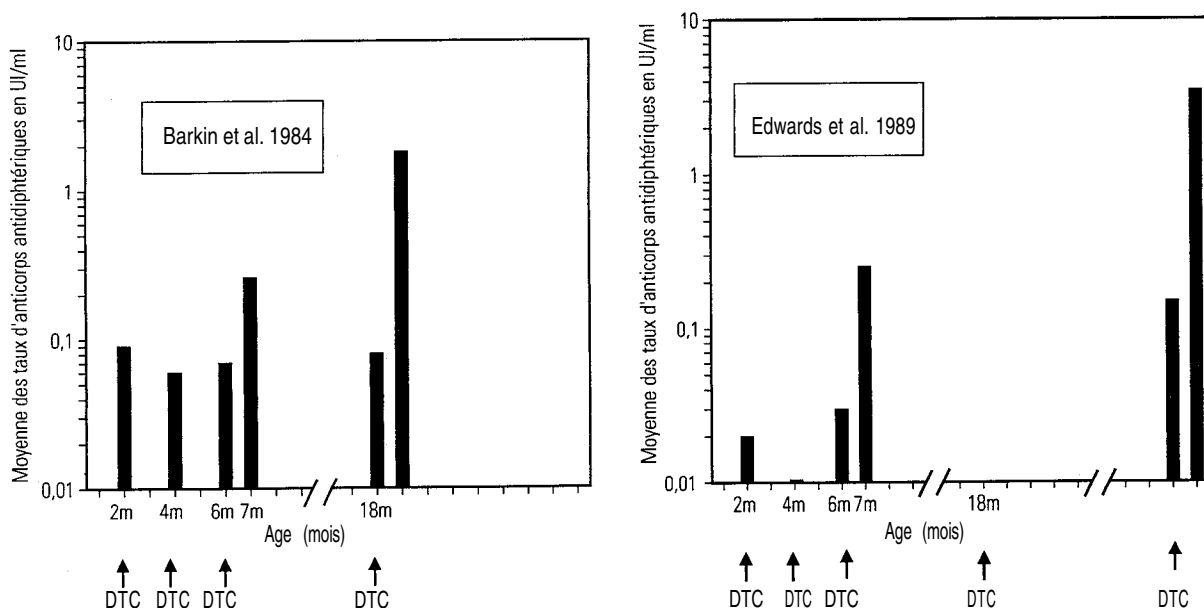
La réponse immunitaire de l'individu à la vaccination par l'anatoxine diphtérique varie en fonction de l'âge. L'immunité passive d'origine maternelle chez le jeune enfant joue le rôle le plus important (Halsey & Galuzka 1985). Les premières études avaient démontré que la plupart des enfants ne possédant pas d'anticorps maternels répondaient aussi bien à l'anatoxine diphtérique

que les enfants plus âgés (Barr et al. 1950, Vahlquist 1949). Au Japon une étude récente a montré que la réponse immunitaire au vaccin diphtérie-tétanos-coqueluche acellulaire (DTC) est identique chez les enfants de 3 à 8 mois et les enfants de 24 à 30 mois (Tableau 1).

Les anticorps acquis passivement interfèrent temporairement avec l'immunisation active chez le jeune enfant quand leur titre dépasse 0,1 UI/ml, tandis qu'un titre inférieur à 0,02 UI/ml n'a pas d'effet (Barr et al. 1950, Vahlquist 1949). Des études effectuées aux Etats-Unis, suggèrent que l'immunité passive envers la diphtérie interfère avec la réponse précoce au vaccin DTC. Chez les enfants présentant un titre élevé d'anticorps lors du prélèvement de sang de cordon (0,24 UI/ml), ce titre diminue jusqu'à 0,05 UI/ml vers 2 mois. A cet âge, la première dose de vaccin DTC n'empêche pas la diminution du taux d'anticorps (Andersen et al. 1988). Selon d'autres études, l'effet inhibiteur de l'immunité passive est moins apparent quand le titre d'antitoxines au moment de la première dose de vaccin est inférieur à 0,1 UI/ml, (Figure 2). Cette immunité passive semble encore exercer un effet inhibiteur transitoire lors de la seconde dose de vaccin, mais n'a aucun effet sur la réponse immunitaire lors de la troisième dose de DTC.

Dans les régions où *C. diphtheriae* est présente dans la population et notamment là où les formes cutanées sont fréquentes, les mères et leurs enfants peuvent posséder des titres d'anticorps très élevés envers la diphtérie. Au Mali, 87% des prélèvements de sang de cordon, montrent un taux d'anticorps supérieur à 0,1 UI/ml et 50% d'entre eux

Figure 2. : Taux d'anticorps antidiphtériques chez des enfants vaccinés avec 3 doses de vaccin DTC à l'âge de 2, 4 et 6 mois et après 1 ou 2 rappels.



un taux d'au moins 1 UI/ml (*Allerdist et al. 1981*). En revanche, dans les régions où le réservoir de *C. dyptheriae* est moins important (cf. partie 6.2), les mères ne sont pas forcément immunisées et leurs bébés possèdent rarement une immunité passive. La perte de l'immunité passive des bébés suit une courbe logarithmique avec une décroissance de 14% par semaine (*Barr et al. 1949*), la demi-vie de l'antitoxine diphtérique étant d'environ 30 jours (*Anderson et al. 1988*).

La primo-vaccination avec 3 doses de vaccin DTC stimule la production d'anticorps à des taux considérablement plus élevés que le minimum requis pour une protection (Figure 2). La figure 2 représente les résultats de deux études au cours desquelles une série de 3 injections de DTC a été réalisée à l'âge de 2, 4 et 6 mois, suivies d'un rappel à 18 mois. Après la seconde injection, le taux d'anticorps commence à augmenter pour atteindre un niveau élevé après la troisième injection. A la suite de ces 3 premières doses, 94% à 100% des enfants ont un titre d'anticorps supérieur à 0,01 UI/ml (*Barkin et al. 1984, Bhandari et al. 1981, Chen et al. 1956, Guerin et al. 1988; Pichichero et al. 1986, Schou et al. 1987*) avec un titre moyen entre 0,1 et 1 UI/ml (*Anderson et al. 1988, Barkin et al. 1984 et 1985, Edwards et al. 1989, Kimura et al. 1991*) ou plus (*Bhandari et al. 1981*).

La nature de la composante coqueluche du vaccin DTC ne semble pas affecter la réponse immunitaire à l'anatoxine diphtérique. D'après de nombreuses études, la réponse immunitaire envers la diphtérie est la même avec un vaccin DTC contenant des constituants cellulaires ou acellulaires du bacille de la coqueluche (*Anderson et al. 1988, Edwards et al. 1989, Pichichero et al. 1987*).

Le pourcentage d'enfants possédant un taux d'anticorps antidiphtériques supérieur à 0,01 UI/ml est identique après 2 injections de DTC effectuées à deux mois d'intervalle ou après 3 doses administrées à un mois d'intervalle. Cependant le titre moyen d'anticorps est plus faible avec 2 doses (*Bhandari et al. 1981, Guerin et al. 1988*) et la durée de l'immunité est plus courte.

La durée de l'immunité après la première série d'injections d'anatoxine diphtérique dans l'enfance a été bien étudiée au Danemark où la primo-vaccination a été réalisée avec le vaccin DT (1950 à 1961), le vaccin DTC (1961 à 1970) ou le vaccin DT-polio (après 1970). Les rappels de vaccination ne sont pas régulièrement suivis, sauf pour les appelés militaires qui reçoivent un rappel de vaccin DT. Immédiatement après la vaccination, la concentration sérique d'antitoxines décroît rapidement puis de façon exponentielle avec le temps. Lorsqu'on compare les résultats des premières études avec ceux d'études plus récentes, on constate que les taux d'antitoxines diphtériques, chez les en-

fants scolarisés ont continuellement diminué, à partir de 1940 et au cours des années 1950 jusqu'en 1985, bien que le nombre de rappels soit resté le même. On n'observe pas la même baisse pour les titres d'anticorps antitétaniques. Le faible niveau d'immunité observé chez les écoliers danois pourrait être dû à une moindre exposition aux corynébactéries et par conséquent à un nombre limité d'occasions d'acquérir une immunité naturelle (*Schou et al. 1987, Simonsen et al. 1987, Simonsen 1989*).

En ce qui concerne la durée de l'immunité induite par la vaccination, il existe également des différences entre les premières études et les plus récentes effectuées aux Etats-Unis. Dans les années 1960, seulement 10% des enfants de 7 à 13 ans avaient perdu l'immunité obtenue après vaccination avec l'anatoxine diphtérique (*Volk et al. 1962*). Des résultats récents ont mis en évidence un déclin rapide de cette immunité antidiphtérique un an après la vaccination pour 10% des enfants (*Pichichero et al. 1987*), 3 à 13 ans après la vaccination pour 67% des enfants et 14 à 23 ans après la vaccination pour 83% des enfants (*Crosley et al. 1979*).

En France et à Taiwan, respectivement 25% et 37% des enfants ne sont pas immunisés contre la diphtérie un an après les trois injections de vaccin DTC (*Chen et al. 1956, Guerin et al. 1988*). D'autres recherches ont montré que les taux d'antitoxines étaient quatre à cinq fois plus faibles dans la première année suivant la primo-vaccination avec le DTC (*Kimura et al. 1991, Pichichero et al. 1986*).

Au contraire, en Angleterre et en Italie, 96% à 100% des enfants possèdent une bonne immunité 4 à 8 ans après la primo-vaccination avec le vaccin DTC ou DT (*Cellesi et al. 1989a, Jones et al. 1989*).

Des schémas de vaccination différents avec divers types de vaccins et une immunité naturelle envers la diphtérie plus ou moins élevée en fonction du niveau d'exposition aux corynébactéries, peuvent en partie, expliquer ces variations entre les résultats. La durée de la protection chez les enfants qui ne sont pas continuellement exposés à la diphtérie est peut-être plus courte que chez les enfants du même âge vivant dans des populations où la diphtérie est fréquente.

Un rappel effectué à la fin de la deuxième année de l'enfant ou entre l'âge de 4 et 6 ans stimule fortement la production d'antitoxines diphtériques à des taux supérieurs à 1 UI/ml (*Anderson et al. 1987, Barkin et al. 1984, Edwards et al. 1989, Kimura et al. 1991, Lewis et al. 1986, Pichichero et al. 1987*).

Le résultat de la vaccination chez l'adulte dépend de plusieurs facteurs dont le protocole de

vaccination et l'immunogénicité des anatoxines utilisées pour la primo-vaccination, le temps écoulé depuis la dernière injection d'anatoxine diphtérique et l'âge des individus. Au Danemark, on utilise pour la primo-vaccination de fortes quantités d'anatoxine. La revaccination des adolescents danois, des jeunes recrues militaires ou des adultes avec le vaccin Td à teneur réduite en anatoxine stimule une rapide et forte production d'antitoxines diphtériques, avec un taux moyen supérieur à 1 UI/ml (Simonsen *et al.* 1986a et 1986b, Volk *et al.* 1962). Lors d'une nouvelle vaccination, la réponse immunitaire diminue d'autant plus rapidement qu'elle est éloignée de la primo-vaccination, mais même si plus de vingt ans se sont écoulés, un simple rappel suffit à assurer une bonne protection (Simonsen 1989). Cependant selon d'autres études, 35% à 88% des adultes sont immunisés après une seule dose de vaccin à teneur réduite en anatoxine diphtérique (Allerdist & Ehrengut-Lange 1982, Palmer *et al.* 1983, Ruben *et al.* 1978). Une faible quantité d'anatoxine diphtérique peut induire une réponse immunitaire secondaire chez des adultes ou des écoliers déjà vaccinés; mais cela ne suffit pas à induire une réponse immunitaire efficace chez ceux qui n'ont pas été vaccinés ou qui n'ont pas acquis d'immunité naturelle (Feery *et al.* 1981, Galazka & Olakowski 1962, Trinca *et al.* 1975). Pour être efficace la primo-vaccination doit inclure trois doses d'anatoxine; l'intervalle doit être de 4 à 6 semaines entre la première et la seconde injection et doit être de 6 à 12 mois entre la seconde et la troisième dose (Feery *et al.* 1981).

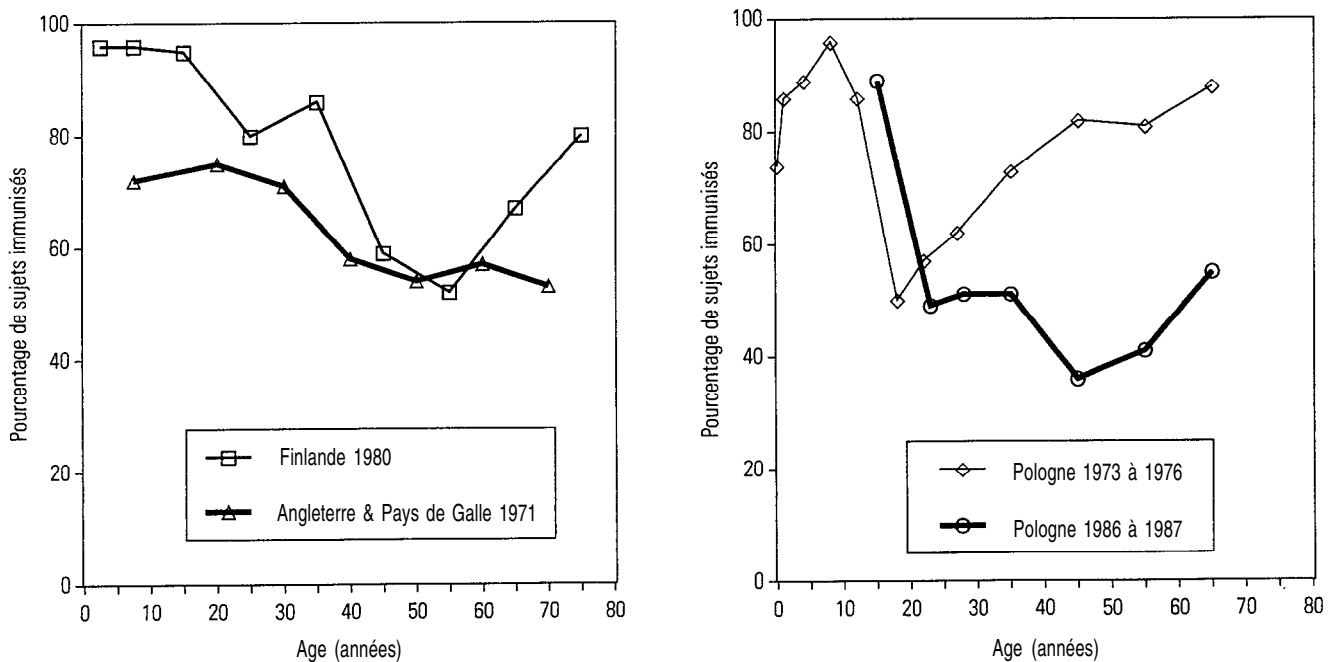
6.2 Variations du profil immunitaire de différentes tranches d'âge après la campagne de vaccination

Les programmes de vaccination des populations entraînent une réduction considérable de l'incidence de la diphtérie. Ils modifient également en profondeur le statut immunitaire des différentes tranches d'âge. Bien que les différentes méthodes de mesure de la réponse immunitaire envers la diphtérie rendent difficile une comparaison des niveaux d'immunité dans différents pays, on note certaines caractéristiques communes.

La vaccination du jeune enfant lui permet d'acquérir une forte immunité envers la diphtérie. Cette immunité décroît chez l'enfant plus âgé et l'adolescent en fonction du schéma de vaccination et de l'incidence de la diphtérie (Figure 3). Une immunité élevée chez l'enfant entraîne une diminution de la fréquence de la maladie. La diphtérie devenant rare, les occasions d'acquérir ou de renforcer l'immunité naturelle sont aussi réduites.

Ainsi, la réduction de la fréquence des infections non apparentes, susceptibles de stimuler l'immunité, pourrait entraîner une sensibilité accrue envers la diphtérie chez les adultes. La probabilité d'acquérir un taux d'anticorps protecteur diminue avec l'âge et dans certains pays industrialisés, moins de 50% des adultes posséderaient une immunité antidiphtérique. Les tranches d'âge possédant le plus faible taux d'anticorps diphtériques sont: celles entre 20 et 40 ans en Allemagne (Naumann *et al.* 1983), dans différentes régions de l'ex-URSS

Figure 3 : Immunité envers la diphtérie après la vaccination en Finlande, en Angleterre et au Pays de Galles et en Pologne (Kertulla *et al.* 1980, PHLS 1978, Galazka & Sporzynska 1979 et Galazka & Kardymowicz 1989)



(Dalmatov *et al.* 1986, Maksimova *et al.* 1984, Schwartz *et al.* 1987) et au Japon (Miyamura *et al.* 1974a); entre 40 et 50 ans en Pologne (Galazka & Kardymowicz 1989), en Australie (Forsell 1972) et en Angleterre (PHLS 1978); et les personnes de plus de 50 ans au Danemark (Kjeldsen *et al.* 1988), en Finlande (Kerttula *et al.* 1980), en Suède (Christenson & Bottiger 1986) et aux Etats-Unis (Sargent *et al.* 1984). Dans certains pays, les sujets les plus âgés sont encore immunisés contre la diphtérie, probablement grâce à leur immunité naturelle acquise lors des dernières épidémies de diphtérie. Dans une province chinoise où le programme de vaccination a considérablement réduit l'incidence de la diphtérie, les plus faibles niveaux d'immunité ont été observés chez les individus âgés de 10 à 20 ans (Programme élargi de vaccination 1989b).

Dans certains pays, le statut immunitaire est différent chez les hommes et chez les femmes. En effet, chez les hommes de plus de 20 ans l'immunité est plus élevée que chez les femmes du même groupe d'âge, au Danemark et en Suède (mais pas en Pologne ou aux Etats-Unis) (Christenson & Bottiger 1986, Galazka & Kardymowicz 1989, Sargent *et al.* 1984, Simonsen 1989). Ceci s'explique par le fait que les hommes effectuent un service militaire dans ces pays (26% à 83% des hommes de différentes tranches d'âge au Danemark - Simonsen *et al.* 1987) et reçoivent un rappel avec les anatoxines diphtérique et tétanique (Christenson & Bottiger 1986, Kjeldsen *et al.* 1988, Simonsen 1989). Dans d'autres pays, il est difficile d'expliquer pourquoi les hommes sont nettement moins protégés que les femmes envers la diphtérie (Cellesi *et al.* 1989a).

L'existence d'une large proportion de sujets à risque constitue un potentiel épidémique. Récemment, un risque accru de diphtérie a été observé dans plusieurs pays européens. Depuis le début jusqu'au milieu des années 1980, quelques cas de diphtérie ont été déclarés en Suède, en Allemagne et au Portugal (Bjorkholm *et al.* 1986, Programme élargi de vaccination 1988a, Galazka & Keja 1988, Rappuoli *et al.* 1988). Après une interruption de 12 ans, 6 cas de diphtérie ont été déclarés entre 1986 et 1989, dans la partie Est de l'Allemagne (Programme élargi de vaccination 1991). En ex-Union soviétique, le risque de diphtérie est réapparu et a augmenté au début des années 1980, pour atteindre un premier pic entre 1983 et 1985 et un second entre 1990 et 1991. En Russie, un total de 1876 et 3897 cas de diphtérie ont été déclarés, respectivement en 1991 et 1992 (Programme élargi de vaccination 1993, Galazka 1992). L'épidémie s'est étendue à l'Ukraine où 1552 cas ont été déclarés en 1992. Lors de ces résurgences, les adolescents et les adultes ont été les plus tou-

chés.

On a également observé des modifications de la distribution des cas de diphtérie dans les pays en développement. En Jordanie, les enfants de moins de 10 ans étaient les plus touchés par la diphtérie, mais lors de sa réapparition en 1982 et 1983, les adolescents et les adultes furent largement affectés (Khuri-Bulos *et al.* 1988). En Indonésie, les taux de mortalité chez les enfants de 0 à 4 ans sont inférieurs à ceux des enfants de 5 à 9 ans (Kim-Farley *et al.* 1987). Ces résultats traduisent le changement du statut immunitaire des différentes tranches d'âge grâce à une meilleure protection avec le vaccin DTC. Quand la diphtérie resurgit, les adultes sont les premiers touchés. Ce fut le cas en Chine où parmi les 103 cas déclarés, 80 avaient plus de 16 ans. Cette épidémie est apparue dans une région où la diphtérie avait été bien contrôlée (aucune déclaration de la maladie dans les 3 années précédentes) et où l'immunité des adultes avait diminué (Youwang *et al.* 1992).

6.3 Stratégies de vaccination contre la diphtérie

Il n'existe pas de technique de vaccination simple et universelle contre la diphtérie. Le choix d'une technique dépend du profil épidémiologique de la maladie et du niveau de développement des services de vaccination.

Dans les pays en développement, où le réservoir de *C. diphtheriae* est encore important et où l'immunité naturelle joue un rôle protecteur appréciable contre la forme pharyngée la plus dangereuse de la maladie, la priorité essentielle est d'assurer une forte protection aux enfants avec une première série de trois injections de vaccin DTC. L'objectif principal est d'assurer une protection d'au moins 90%.

Dans les pays en développement qui ont déjà obtenu une bonne protection avec trois doses de vaccin DTC chez les enfants de moins d'un an, le choix d'effectuer un rappel de DTC à la fin de la deuxième année et/ou d'injecter une dose de DT ou de Td lors de l'entrée à l'école devrait dépendre de la répartition des cas de diphtérie et de la disponibilité des vaccins. Si la diphtérie pose un réel problème de santé chez les enfants en âge scolaire ou préscolaire, il faudrait administrer des doses supplémentaires d'anatoxine diphtérique. Lors de la décision d'administrer des rappels, des études sérologiques ont montré que des taux d'anticorps en baisse constitueraient un facteur décisif. Le principal souci est de savoir si l'enfant viendra ou non au centre de médecine préventive. Dans tous les cas, si l'enfant est présent, il serait tout à fait approprié de lui administrer une quatrième dose (voire une cinquième dose de VPO).

L'utilisation du vaccin DT ou Td, lors de l'entrée à l'école ou lors de la sortie, est importante, car elle immunise contre le tétanos pour ces différentes tranches d'âge; cela sera discuté dans le module sur le tétanos. Les autorités médicales doivent considérer le temps nécessaire pour administrer des doses supplémentaires par rapport au temps nécessaire à d'autres services. Le coût des doses supplémentaires doit aussi être pris en considération.

Dans les pays en développement, la primo-vaccination s'effectue dès l'âge de 2 ou 3 mois, en trois injections de vaccin DTC à 4 semaines d'intervalle ou plus. Elle est renforcée par une quatrième dose au cours de la deuxième année de l'enfant. La politique de rappels avec des doses de vaccin contenant l'anatoxine diphtérique (et tétanique) varie considérablement. Dans certains pays, le rappel est réalisé après l'âge de 3 ans avec le vaccin DTC (Tchécoslovaquie, Hongrie, Etats-Unis). Dans de nombreux autres pays, des rappels sont réalisés avec le vaccin DT lors de l'entrée à l'école primaire et à la sortie de l'école. Cependant, dans plusieurs pays, seule l'anatoxine tétanique est administrée aux enfants scolarisés plus âgés.

Le niveau d'immunité acquis chez le nourrisson et tout au début de l'enfance doit être maintenu grâce à des rappels, réalisés au bon moment, avec le vaccin DT ou Td. Le vaccin Td doit être utilisé pour les enfants plus âgés ou les adolescents sortant de l'école primaire ou secondaire.

A partir du moment où il existe une large proportion de sujets à risque constituant un potentiel épidémique, il faut considérer l'utilisation du vaccin Td chez ces adultes à haut risque. Il existe quelques controverses à ce sujet. Certains auteurs proposent de vacciner chaque année les adultes avec le vaccin Td spécifique de l'adulte, et d'utiliser le vaccin Td chaque fois que le recours à l'anatoxine tétanique est nécessaire, c'est à dire lors des soins en salle d'urgence (Karzon & Edwards 1988). D'autres auteurs préconisent l'utilisation du vaccin Td pour les groupes à haut risque, notamment les sujets qui risquent d'être contaminés par une souche virulente de *C. diphtheriae*: voyageurs se rendant dans les pays en développement, militaires, personnel médical, personnel des crèches et des jardins d'enfants, professeurs, alcooliques et toxicomanes (Edwards 1990, Galazka & Kardymowicz 1989). Au Canada, certains auteurs se demandent s'il est nécessaire d'effectuer une revaccination générale de la population adulte contre la diphtérie et le tétanos (Mathias & Schechter 1985). La mortalité liée à la diphtérie est en effet relativement basse au Canada et l'immunité antidiphtérique ne diminue pas de façon évidente après la primo-vaccination. Cependant, au Canada, des centaines de cas de diphtérie ont été

déclarés dans les années 1970 et l'immunité naturelle acquise à cette époque peut avoir contribué à l'immunité élevée d'aujourd'hui.

Le résultat de la vaccination des adultes contre la diphtérie dépend largement de la réactivité de l'anatoxine diphtérique. On pense que l'anatoxine diphtérique peut induire des réactions locales et parfois générales, chez les individus préalablement sensibilisés (immunisés). Ces symptômes sont bien atténués en utilisant de faibles doses de vaccin pour adulte (Td) préparé avec une anatoxine hautement purifiée. Cependant, même avec le vaccin Td, un nombre non négligeable de sujets vaccinés présente des réactions locales de moyenne importance (Allerdist & Ehrengut-Lange 1982, Trinca 1975) et certains d'entre eux souffrent de réactions locales assez graves et de symptômes systémiques (Palmer *et al.* 1983). Quelques auteurs ont proposé le dépistage pré-vaccinal des personnes à risque, en utilisant le test de Schick ou en déterminant les titres d'anticorps antidiphtériques (Palmer *et al.* 1983). Cependant, le dépistage est fastidieux, long et peu pratique.

7. Implications pour les programmes de vaccination

La primo-vaccination réalisée dans l'enfance avec trois doses de vaccin procure une immunité durable envers la diphtérie (sur plusieurs années). La durée de cette immunité, suite à la primo-vaccination, varie considérablement en fonction de la situation épidémiologique, de la fréquence de la stimulation naturelle et du renforcement de l'immunité antidiphtérique.

Il est expressément recommandé d'effectuer une primo-vaccination diphtérique chez l'enfant et de maintenir cette immunité tout au cours de la vie. Les schémas de vaccination doivent être adaptés aux conditions spécifiques des pays concernés, prenant en compte le profil épidémiologique de la diphtérie et le niveau de développement des services de vaccination.

Dans tous les pays, priorité doit être donnée aux efforts visant à assurer au moins 90% de protection avec trois doses de vaccin DTC chez les enfants de moins d'un an.

Dans les pays en développement, où la diphtérie est endémique, les trois premières doses doivent permettre d'éviter la résurgence d'épidémies. Dans ces pays, l'immunité se maintient grâce à des mécanismes naturels, tels que les fréquentes infections cutanées causées par *C. diphtheriae*.

Dans les autres pays en développement, où la protection immunitaire est élevée chez les enfants de moins d'un an, les rappels avec l'anatoxine

diphtérique doivent s'effectuer en fonction des données épidémiologiques. Si la diphtérie pose un réel problème de santé chez les enfants d'âge scolaire ou préscolaire, on doit considérer l'administration de doses supplémentaires d'anatoxine diphtérique. On choisira le plus souvent une quatrième dose de vaccin DTC à la fin de la deuxième année ou une dose de DT lors de l'entrée à l'école.

Dans les pays où la diphtérie a été contrôlée avec succès, il faut maintenir l'immunité acquise après vaccination dans l'enfance et la prime enfance, grâce à des rappels planifiés dans le temps, avec les vaccins DT ou Td. Il faut utiliser ces vaccins pour les enfants plus âgés ou les adolescents quittant l'école primaire ou secondaire.

Lors des récentes résurgences de la diphtérie dans les pays en développement, ce sont les adultes et les adolescents qui ont été les plus touchés. Les études sérologiques effectuées dans plusieurs de ces pays ont montré que les adultes entre 20 et 50 ans n'avaient qu'une faible immunité antidiphtérique. De telles études peuvent servir d'outils pour la révision des protocoles de vaccination. Quand il existe des groupes représentant un potentiel épidémiologique, les pays où l'immunité antidiphtérique est faible chez l'adulte, doivent envisager l'introduction de rappels avec le vaccin Td spécifique de l'adulte, dans ces groupes à haut risque de la population.

Abréviations

DT	vaccin diphtérie-tétanos, type spécifique à l'enfant
DTC	vaccin diphtérie-tétanos-coqueluche (pertussis)
ELISA	test immunoenzymatique (enzyme-linked immunosorbent assay)
HA	test d'hémagglutination passive
Td	vaccin pour adulte composé d'anatoxines diphtérique et tétanique, l'anatoxine diphtérique étant en faible quantité
ToBi	test d'inhibition de la liaison de la toxine
UI	unités internationales
VPO	vaccin polio oral

Références

- Aggerbeck H, Heron I. Improvement of a Vero cell assay to determine diphtheria antitoxin content in sera. *Biologicals* 1991;19:71-76.
- Allerdist H, Ehrengut W, Fofana Y. Diphtheria immunity in Mali (mothers and their neonates and children under two years of age). *Tropenmed Parasit* 1981; 32:274-275.
- Allerdist H, Ehrengut-Lange J. Serokonversion nach Diphtherieschutzimpfung bei Jugendlichen und Erwachsenen. Eine Studie am Hamburger Krankenhauspersonal. *Dtsch Med Wochenschr* 1982;107:1755-1760.
- Anderson EL, et al. Clinical and serological responses to acellular pertussis vaccine in infants and young children. *Am J Dis Child* 1987;141:949-953.
- Anderson EL, Belshe RB, Bartram J. Differences in reactogenicity and antigenicity of acellular and standard pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus in infants. *J Infect Dis J* 1988;157:731-737.
- Barkin RM, Samuelson JS, Gotlin LP. DTP reactions and serologic response with a reduced dose schedule. *J Pediatr* 1984;105:189-194.
- Barkin RM, et al. Primary immunization with diphtheria-tetanus toxoids vaccine and diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine adsorbed: comparison of schedules. *Pediatr Infect Dis J* 1985;4:168-171.
- Barr M, Glenny AT, Randall KJ. Concentration of diphtheria antitoxin in cord blood and rate of loss in babies. *Lancet* 1949;2:324-326.
- Barr M, Glenny AT, Randall KJ. Diphtheria immunisation in young babies. A study of some factors involved. *Lancet* 1950;1:6-10.
- Baum KF, et al. *Corynebacterium diphtheriae* in sickle cell leg ulcers in Jamaica. *West Indian Med J* 1985;34:24-28.
- Bhandari B, Pamecka RK, Mandowara SL. Seroconversion following primary immunization with D.P.T. vaccine: two versus three doses. *Indian J Pediatr* 1981;18:41-47.
- Bjorkholm B, et al. Antitoxin antibody levels and the outcome of illness during an outbreak of diphtheria among alcoholics. *Stand J Infect Dis* 1986;18:235-239.
- Bray JP, et al. Epidemic diphtheria and skin infections in Trinidad. *J Infect Dis* 1972;126:34-40.
- Camargo ME, et al. Immunoenzymatic assay of anti-diphtheric toxin antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1984;20:772-774.
- Cellesi C, et al. Immunity to diphtheria in a sample of adult population from central Italy. *Vaccine* 1989a;7:417-420.
- Cellesi C, et al. Immunity to diphtheria, six to 15 years after basic three-dose immunization schedule. *J Biol Stand* 1989b;17:29-34.
- Chakraborty SM, Choudhuri AB. Isolation of toxinogenic strains of *C diphtheriae* from skin lesion of children in a rural West Bengal community. *Indian J Med Res* 1969;57:1651-1658.
- Chason OL. Diphtheria immunity in rural Alabama. *Am J Hyg* 1936;23: 539-557.
- Chen B-L, et al. Studies on diphtheria-pertussis-tetanus combined immunization in children. II. Immune responses after primary vaccination. *J Immunol* 1956;77:39-45.
- Christenson B, Bottiger M. Serological immunity to diphtheria in Sweden in 1978 and 1984. *Stand J Infect Dis* 1986;18:227-233.
- Crossley K, et al. Tetanus and diphtheria immunity in urban Minnesota adults. *JAMA* 1979;242:2298-2300.
- Dalmatov W, et al. Serological surveillance of diphtheria infection (in Russian). *J Microbiol Epidemiol Immunol* 1986;no 12:43-47.

- Daniel E, et al. The assessment of the potency of diphtheria toxoid on the basis of the Jensen test (in Polish). *Medyk i Medycyna* 1957;2:5-12.
- Dengrove J, et al. IgG and IgG subclass specific antibody responses to diphtheria and tetanus toxoids in newborns and infants given DTP immunization. *Pediatr Res* 1986;20:735-739.
- Edwards KM, et al. Evaluation of a new highly purified pertussis vaccine in infants and children. *J Infect Dis* 1989;160:832-837.
- Edwards KM. Diphtheria, tetanus, and pertussis immunization in adults. *Infect Dis Clin North Am* 1990;4:85-103.
- Expanded Programme on Immunization. Reported trends of EPI diseases in Europe. *Wkly Epidemiol Rec* 1988a;63:81-85.
- Expanded Programme on Immunization. Diphtheria and measles control, China. *Wkly Epidemiol Rec* 1988b;63:225-227.
- Expanded Programme on Immunization. Outbreak of diphtheria, USSR. *Wkly Epidemiol Rec* 1991;66:181-184.
- Expanded Programme on Immunization. Outbreak of diphtheria, update, Russian Federation. *Wkly Epidemiol Rec* 1993;68:134-138.
- Feery BJ, et al. Diphtheria immunization in adolescents and adults with reduced doses of adsorbed diphtheria toxoid. *Med J Aust* 1981;1:128-130.
- Forsell P. Diphtheria immunity in Victoria. *Med J Aust* 1972;1:1023.
- Fulthorpe A. Multiple diphtheria antigen-antibody systems by passive haemagglutination techniques. *Immunology* 1962;5:30-45.
- Galazka A. Diphtheria in adults. Presented at the International Symposium on Working Towards New and Improved Vaccines, Madrid, Fundacion Ramon Areces, 12-14 February 1992.
- Galazka A, Abgarowicz A. Assays of diphtheria and tetanus antibodies by the passive hemagglutination method. *Epidemiol Rev (Warsaw)* 1967;21:237-252.
- Galazka A, Kardymowicz B. Immunity against diphtheria in adults in Poland. *Epidemiol Infect* 1989;103:587-593.
- Galazka A, Keja J. Diphtheria: incidence trends and age-wise changes of immunity. *Stand J Infect Dis* 1988;20:355-356.
- Galazka A, Olakowski T. Immunization of school-age children against diphtheria. *Przegl Epidemiol* 1962;16:431-442.
- Galazka A, Sporzynska Z. Immunity to tetanus and diphtheria in various age groups of the Polish population. *Arch Immunol Ther Exper* 1979;27:715-726.
- Glenny AT, Llewellyn-Jones M. The intracutaneous method of testing diphtheria toxin and antitoxin. *J Path Bacteriol* 1931;34:143-156.
- Guerin N, et al. Evaluation de l'immunité diphtérique chez les enfants. *Pédiatrie* 1988;24:77-80.
- Gunatillake PDP, Taylor C. The role of cutaneous diphtheria in acquisition of immunity. *J Clin Microbiol* 1981;13:83-88.
- Halsey N, Galazka A. The efficacy of DPT and oral poliomyelitis immunization schedules initiated from birth to 12 weeks of age. *Bull WHO* 1985;63:1151-1169.
- Hendriksen CFM, van der Gun JW, Kreeftenberg JG. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the *in vitro* Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test. *J Biol Stand* 1989;17:191-200.
- Ipsen J. Circulating antitoxin at the onset of diphtheria in 425 patients. *J Immunol* 1946;54:325-347.
- Jensen C. Die intrakutane Kaninchenmethode zur Auswertung von Diphtherietoxin und Antitoxin, Copenhagen, 1933.
- Jones AE, et al. Durability of immunity to diphtheria, tetanus and poliomyelitis after a three dose immunization schedule completed in the first eight months of life. *Vaccine* 1989;7:300-302.
- Karzon DT, Edwards KM. Diphtheria outbreaks in immunized populations. *N Engl J Med* 1988;318:41-43.
- Kerttula Y, et al. Immunity to diphtheria in Helsinki in 1975. *Stand J Infect Dis* 1980;12:37-39.
- Khuri-Bulos N, et al. The changing epidemiology of diphtheria in Jordan. *Bull WHO* 1988;66:65-68.
- Kim-Farley R, et al. Assessing the impact of the Expanded Programme on Immunization: the example of Indonesia. *Bull WHO* 1987;65:204-206.
- Kimura M, et al. A comparative trial of the reactogenicity and immunogenicity of Takeda acellular pertussis vaccine combined with tetanus and diphtheria toxoids: outcome of 3- to 8-month-old infants, 9- to 23-month-old infants and children, and 24- to 30-month-old children. *Am J Dis Child* 1991;145:734-741.
- Kjeldsen K, Simonsen O, Heron I. Immunity against diphtheria and tetanus in the age group 30-70 years. *Stand J Infect Dis* 1988;20:177-185.
- Knight PA, Tilleray J, Queminet J. Studies on the correlation of a range of immunoassays for diphtheria antitoxin with the guinea-pig intradermal test. *Dev Biol Stand* 1986;64:25-32.
- Koblin BA, Townsend TR. Immunity to diphtheria and tetanus in inner-city women of childbearing age. *Am J Public Health* 1989;79:1297.
- Kreeftenberg JG, et al. An investigation of a mouse model to estimate the potency of the diphtheria component in vaccines. *J Biol Stand* 1985;13:229-234.
- Kriz B, et al. Determination of diphtheria antitoxin in guinea-pig sera by the Jensen and tissue-culture methods. *J Biol Stand* 1974;2:289-295.
- Kriz B, et al. Immunological surveys of diphtheric antitoxin antibodies in some African and Asian countries. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1980;24:42-62.
- Kurokawa M, Murata R. On the toxicity of the "toxoid" preparation responsible for the Kyoto catastrophe in 1948. *J Med Sci Biol* 1961;14: 249-256.

- Lewis K, et al. A double-blind study comparing an acellular pertussis-component DTP vaccine with a whole-cell pertussis-component DTP vaccine in 18-month-old children. *Am J Dis Child* 1986;140:872-876.
- Maksimova NM, et al. State of immunity to diphtheria and tetanus in some administrative regions of the RSFSR (in Russian). *J Microbiol Epidemiol Immunol* 1984;4:58-63.
- Mathias RG, Schechter MT. Booster immunization for diphtheria and tetanus: no evidence of need in adults. *Lancet* 1985;1:1089-1091.
- Melville-Smith M, Balfour A. Estimation of *Corynebacterium diphtheriae* anti-toxin in human sera: a comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with the toxin neutralization test. *J Med Microbiol* 1988;25:279-283.
- Middlebrook JL, Dorland RB, Leppla SH. Association of diphtheria toxin with Vero cells: demonstration of a receptor. *J Biol Chem* 1978;253: 7325-7330.
- Millian SJ, et al. A serologic survey of tetanus and diphtheria immunity in New York City. *Arch Environ Health* 1967;15:776-781.
- Miyamura K, et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using Vero cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J Biol Stand* 1974a;2:189-201.
- Miyamura K, et al. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titers using VERO cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies. *J Biol Stand* 1974b;2:203-209.
- Miyamura K, Murata R, Kono R. Status of antitoxic immunity against diphtheria in Japan: a report of the National Epidemiological Surveillance for Important Communicable Diseases. *Jpn J Med Sci Biol* 1983;36:177-190.
- Mortimer EA. Diphtheria toxoid. In: *Vaccines* (SA Plotkin and EA Mortimer Jr, editors). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988.
- Muyembe JJ, et al. L'épidémiologie de la diphtérie en République du Zaïre: le rôle de l'infection cutanée. *Ann Soc Belg Med Trop* 1972;2: 141-152.
- Naumann P, Hagedorn HJ, Paatz R. Diphtherie-Immunität und ihre epidemiologische Bedeutung. *Dtsch Med Wochenschr* 1983;108:1090-1096.
- Padovan E, et al. Determination of diphtheria toxin neutralizing antibody titers with a cell protein synthesis inhibition assay. *Med Microbiol Immunol Berl* 1991;180:29-35.
- Palmer SR, Balfour AH, Jephcott AE. Immunisation of adults during an outbreak of diphtheria. *Br Med J* 1983;286:624-626.
- Papadatos C, Papavangelou G, Koukou D. Diphtheria antitoxin levels and the Schick reaction in mothers and their newborns. *Acta Paediatr Stand* 1967;172 (suppl):181-185.
- Pichichero ME, Barkin RM, Samuelson JS. Pediatric diphtheria and tetanus toxoids-adsorbed vaccine: immune response to the first booster following the diphtheria and tetanus toxoids vaccine primary series. *Pediatr Infect Dis J* 1986;5:428-430.
- Pichichero ME, et al. Acellular pertussis vaccine; immunogenicity and safety of an acellular pertussis vs. a whole cell pertussis vaccine combined with diphtheria and tetanus toxoids as a booster in 18- to 24- month old children. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:352-363.
- Public Health Laboratory Services (PHLS). Susceptibility to diphtheria: a survey by an ad hoc working group. *Lancet* 1978;1:428-430.
- Rappuoli R, Perugini M, Falsen E. Molecular epidemiology of the 1984- 1986 outbreak of diphtheria in Sweden. *N Engl J Med* 1988;318:12-14.
- Robinson P, Lalitha Bai M, Narendran S. A Schick test survey in Bangalore with a discussion on the problem of diphtheria in India and other tropical countries. *J Trop Pediatr* 1964;10:39-46.
- Ruben FL, Nagel J, Fireman P. Antitoxin responses in the elderly to tetanus-diphtheria (Td) immunization. *Am J Epidemiol* 1978;108:145-149.
- Sargent RK, et al. Diphtheria immunity in Massachusetts: A study of three urban patient populations. *Am J Med Sci* 1984;287:37-39.
- Scheibel I, et al. Duration of immunity to diphtheria and tetanus after active immunization, with mention of non-conformity between haemagglutinating and neutralizing diphtheria antitoxin titers in some human sera. *Acta Path Microbiol Stand* 1962;55:483-495.
- Schou C, Simonsen O, Heron I. Determination of tetanus and diphtheria antitoxin content in dried samples of capillary blood: a convenient method applied to infants. *Stand J Infect Dis* 1987;19:445-451.
- Schwartz SA, Bukova VE, Pichushkov AV Time course of diphtheria morbidity and population immunity (in Russian). *J Microbiol Epidemiol Immunol* 1987;no 2:26-32.
- Simonsen O. Vaccination against tetanus and diphtheria. Evaluation of immunity in the Danish population, guidelines for revaccination, and the methods for control of vaccination programs. *Dan Med Bull* 1989;36: 24-47.
- Simonsen O, et al. Revaccination of adults against diphtheria. I: Responses and reactions to different doses of diphtheria toxoid in 30- 70-year-old persons with low serum antitoxin levels. *APMIS (Copenhagen)* 1986a;94(C):213-218.
- Simonsen O, et al. Revaccination of adults against diphtheria. II: Combined diphtheria and tetanus revaccination with different doses of diphtheria toxoid 20 years after primary vaccination. *APMIS (Copenhagen)* 1986b;94(C):219-225.
- Simonsen O, et al. Susceptibility to diphtheria in populations vaccinated before and after elimination of indigenous diphtheria in Denmark. *APMIS (Copenhagen)* 1987;95(C):225-231.

- Stransky E, Felix NS. Susceptibility of Filipini children to diphtheria. *J Philipp Med Assoc* 1949;25:491-495.
- Suri JC, et al. Schick test survey in Punjab. *Indian J Med Res* 1967; 55:179-184.
- Svenson SB, Larsen K. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of diphtheria toxin antibodies. *J Immunol Methods* 1977; 17:249-256.
- Thorley JD, et al. Passive transfer of antibodies of maternal origin from blood to cerebrospinal fluid in infants. *Lancet* 1975;1:651-653.
- Trinca JC. Combined diphtheria-tetanus immunization of adults. *Med J Aust* 1975;2:543-546.
- Vahlquist B. Response of infants to diphtheria immunisation. *Lancet* 1949;1:16-18.
- Vogelsang TM, Krivy BO. Schick reactions in recently confined women and their new-born infants. *J Hyg* 1945;44:437-441.
- Volk VK, et al. Antigenic response to booster dose of diphtheria and tetanus toxoids seven to thirteen years after primary inoculation of noninstitutionalized children. *Public Health Rep* 1962;77:185-194.
- Wright PG, Clark WM. Schick reactions in recently confined women and their infants. *Br Med J* 1944;2:146-143.
- Youwang Y, et al. Epidemiological features of an outbreak of diphtheria and its control with diphtheria toxoid immunization. *Int J Epidemiol* 1992;21:807-811.
- Zingher A. The Schick test performed on more than 150 000 children in public and parochial schools in New York (Manhattan and the Bronx). *Am J Dis Child* 1923;25:392-405.

