

**PROGRAMME  
ÉLARGI  
DE VACCINATION**



**STABILITÉ DES VACCINS**

**Dr Artur Galazka  
Fonctionnaire médical, PEV**



**ORGANISATION  
MONDIALE  
DE LA SANTÉ**

Artur Galazka

Médecin au Programme élargi de vaccination

STABILITE DES VACCINS

1. INTRODUCTION.....	4
2. ANATOXINES DIPHTERIQUE ET TETANIQUE.....	6
3. VACCIN ANTICOQUELUCHEUX.....	10
3.1. Influence de la température sur l'activité et la toxicité du vaccin.....	10
3.2. Vaccins anticoquelucheux monovalents contre composante coqueluche des vaccins associés.....	13
3.3. Méthodes d'inactivation de <u>B.pertussis</u> .....	14
3.4. Souches de <u>B.pertussis</u> .....	15
3.5. Influence du conservateur et de l'adjuvant.....	16
4. VACCIN BCG.....	18
4.1. Effet de la température sur la viabilité du vaccin BCG.....	18
4.2. Stabilité des vaccins produits à partir de différentes souches dérivées de BCG.....	20
4.3. Présentation du vaccin BCG.....	21
4.4. Effet de la lumière sur la stabilité du vaccin BCG.....	22
4.5. Stabilité du vaccin reconstitué.....	22
5. Vaccins antirougeoleux, antiourlien et antirubéoleux.....	23
5.1. Vaccin antirougeoleux.....	23
5.1.1. Vaccin lyophilisé.....	23
5.1.2. Vaccin reconstitué.....	26
5.2. Vaccin antiourlien.....	26
5.3. Vaccin antirubéoleux.....	28
6. VACCIN ANTIPOLIOMYELITIQUE.....	29
6.1. Vaccin polio oral.....	29
6.1.1. Facteurs affectant la stabilité du vaccin polio.....	29
Différence de thermosensibilité des types viraux.....	29
Nature du stabilisant.....	31
Valeurs du PH des suspensions virales.....	32
Répartition du vaccin dans divers récipients.....	35
6.1.2. Stabilité générale des vaccins polio.....	35
6.2. Vaccin polio inactivé.....	38

7. STABILITE D'AUTRES VACCINS.....	40
7.1. Vaccins viraux.....	40
7.1.1. Vaccin contre l'hépatite B.....	40
7.1.2. Vaccin contre la fièvre jaune.....	40
7.1.3. Vaccin contre la rage.....	43
7.2. Vaccins bactériens.....	43
7.2.1. Vaccin antiméningococcique polysidique.....	43
7.2.2. Vaccin anticholérique à cellules entières.....	44
7.2.3. Vaccin contre la typhoïde .....	44
8. CONCLUSIONS.....	46
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	50

## 1. INTRODUCTION

Les services de vaccination des pays en développement permettent d'éviter que chaque année plus de 350 000 enfants ne soient atteints de paralysie poliomyélitique et que plus de deux millions ne décèdent par rougeole, tétanos néonatal ou coqueluche (117). Les progrès des programmes de vaccination sont dus en partie à la formation du personnel aux techniques adéquates de stockage et de transport des vaccins utilisés dans le cadre du Programme élargi de vaccination (PEV) et aux améliorations apportées au système connu sous le nom de chaîne du froid.

Cependant, dans de nombreuses régions, la conservation et le transport des vaccins ne sont toujours pas satisfaisants. On s'interroge souvent sur le sort à réserver aux stocks de vaccins qui ont été exposés, pendant des durées variables, à des températures élevées. Il n'existe pas de méthodes simples et bon marché que l'on puisse utiliser sur le terrain pour déterminer si un vaccin conservé à la température ambiante a gardé au moins l'activité minimale requise. Seules des épreuves réalisées en laboratoire peuvent la préciser. Mais elles sont coûteuses, les résultats demandent souvent plusieurs mois et seul un nombre de doses important (de 2 000 pour les vaccins antipoliomyélitique et antirougeoleux à 200 000 pour le vaccin DTC) justifie l'envoi des vaccins pour un nouveau contrôle (35).

Ce que l'on sait concernant la stabilité d'un vaccin et, en particulier, le taux de perte d'activité à une température donnée, sera utile au moment de décider si le vaccin doit être détruit, expédié pour un nouveau contrôle ou être utilisé. Depuis le bilan précédent (31), un nombre important de données sont devenues disponibles en ce qui concerne la stabilité des vaccins stockés et transportés à des températures ambiantes. Mais la synthèse de ces données est difficile à faire, car les techniques utilisées pour évaluer la stabilité des vaccins ne sont pas normalisées.

Certains auteurs sont d'avis de déterminer la période de validité d'un vaccin en estimant la baisse d'activité subie lors des longues périodes de stockage à des températures différentes. L'épreuve de dégradation accélérée (EDA) constitue à ce sujet une méthode plus courte et plus réaliste. Cette méthode vise, dans son principe, à soumettre les échantillons à une gamme de températures élevées qui provoquent une dénaturation plus rapide des vaccins que les températures de conservation normales. Ainsi, une dégradation significative et facilement identifiable peut être induite en un laps de temps relativement court. En mesurant le taux de dégradation à une température élevée et en supposant que ce taux suive une loi constante de dépendance à l'égard des températures (Equation d'Arrhenius), il sera alors possible d'extrapoler pour les températures plus basses auxquelles les vaccins doivent être conservés (106).

Les EDA permettent de prévoir les taux de dégradation avec une précision éminemment variable étant donné qu'elles sont affectées par la gamme des températures utilisées, le nombre d'échantillons éprouvés et le schéma de l'épreuve.

L'utilisation des résultats des EDA peut être encore compliquée par les différentes méthodes et techniques utilisées pour évaluer l'activité des vaccins. La détermination du titre de virus des vaccins vivants atténués poliomyélitique, orgueilleux ou rubéoleux fait appel à une technique simple. Par contre, le titrage biologique des vaccins bactériens et des anatoxines implique des épreuves difficiles nécessitant un grand nombre d'animaux, l'activité du vaccin étant exprimée en unités fixées arbitrairement ou en doses réelles assurant une protection à 50%. Les résultats de ces épreuves sont souvent sujets à de larges variations biologiques et il est difficile d'obtenir des données précises sur la détérioration d'un vaccin à moins qu'une nette détérioration ne se soit produite (89).

Les vaccins et les anatoxines sont faits de protéines, d'acides nucléiques et d'hydrates de carbone, et subissent des modifications s'ils sont exposés à la chaleur. C'est la température de conservation qui conditionne le taux de dégradation des vaccins, quels qu'ils soient; plus la température est élevée, plus la dégradation est forte. Les taux de dégradation des vaccins du PEV présentent des différences considérables. Cependant, le taux de dégradation (b) n'est pas l'unique facteur déterminant l'activité résiduelle ( $Y_t$ ) d'un vaccin. Les deux autres facteurs sont le temps (T) pendant lequel le vaccin est conservé à une température donnée et son activité initiale ( $Y_0$ ). Le rapport entre ces trois facteurs peut être exprimé au moyen de la formule suivante :

$$Y_t = Y_0 - bT$$

L'utilité d'une telle formule est limitée par le fait que les responsables de programme ou de magasin ne connaissent pas l'activité initiale d'un vaccin. Toutefois, il peut être précieux pour un agent de santé de connaître les caractéristiques relatives au taux de dégradation à diverses températures et le temps d'exposition d'un vaccin à une température donnée pour savoir la conduite à tenir avec un vaccin suspect.

Le présent document examine les informations actuelles concernant la stabilité des vaccins. On s'est particulièrement attaché aux vaccins qui font actuellement partie du PEV mondial, mais on y a présenté également des informations au sujet des vaccins viraux utilisés pour prévenir la rubéole, les oreillons, l'hépatite B, la fièvre jaune et la rage, et des vaccins bactériens employés pour lutter contre le méningocoque, le choléra et la typhoïde.

## 2. ANATOXINES DIPHTERIQUE ET TETANIQUE

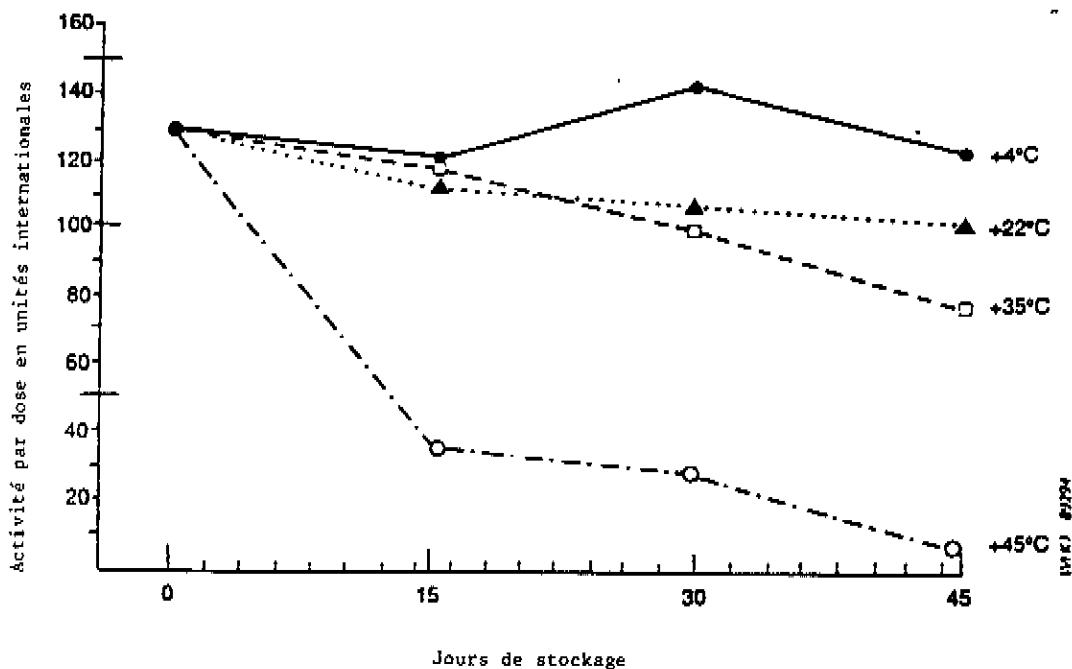
Les anatoxines diphtérique et tétanique adsorbées sous forme monovalente ou en tant que composantes des vaccins associés sont les plus stables des vaccins du PEV. Elles sont stables à des températures élevées, même pendant de longues périodes de stockage, mais elles peuvent changer d'aspect et perdre de leur activité si elles sont congelées.

L'activité de la composante tétanique des vaccins adsorbés DTC ou DTC-polio n'a pas montré de changement significatif à des températures de +4°C à +8°C pendant 3 à 7 ans (56, 58, 92, 97). La durée de conservation aux températures recommandées généralement par les fabricants (+2°C à +8°C) dépend de la nature du vaccin : la période de validité est normalement plus longue pour les anatoxines monovalentes ou le vaccin associé diphtérie/tétanos (généralement 3 ans) que pour les vaccins DTC ou DTC-Polio (18-24 mois). Pour les vaccins associés, les composantes coqueluche ou poliomyélite constituent des facteurs limitants.

La composante anatoxine des vaccins DTC ou DTC-polio montre une diminution négligeable de l'activité quand elle est conservée pendant un an et demi à 18°C (97), pendant 6 à 12 mois à 24°C (101) et pendant 2 à 6 mois à 37°C (58, 92, 101).

Mais un stockage à 37°C jusqu'à 22 semaines a fait baisser de 50% l'activité initiale des composantes diphtérique et tétanique des vaccins DTC-polio provenant d'un fabricant (92). Pour d'autres vaccins DTC, la composante anatomie tétanique, stockée pendant 45 jours à 22°C et 35°C, a présenté une détérioration plus marquée; la baisse quotidienne était d'environ 0,5% et 1% respectivement (Figure 1).

Figure 1  
Activité de la composante tétanique du vaccin DTC stockée pendant 45 jours à diverses températures (UI par dose humaine unitaire, moyenne obtenue avec deux lots éprouvés). Selon Kumar et al. (59)



Les composantes anatoxine diphtérique et tétanique de certains vaccins DTC peuvent résister, plusieurs semaines, à une exposition à des températures élevées. On n'a observé aucune baisse significative de l'activité de l'une ou l'autre composante avec le vaccin DTC d'un fabricant, stocké à 45°C pendant 2 à 4 semaines. Cependant, le stockage à cette température pendant 8 semaines a abouti à une perte de l'activité de l'ordre de 40% (58). Le processus de détérioration a été plus rapide pour un certain nombre d'autres vaccins DTC; à 45°C, la perte d'activité de la composante tétanique a été de 5% par jour pendant la première quinzaine et de 1% par jour au cours du mois de stockage suivant (59).

À des températures supérieures à 45°C, la dégradation de l'activité de l'anatoxine est accélérée. L'anatoxine tétanique adsorbée monovalente, soumise au test de dégradation accélérée, a perdu 20% et 50% de son activité initiale au bout de quatre et huit heures d'exposition, respectivement, à une température de 53°C (Tableau 1). Une température élevée de l'ordre de 60°C a conduit à une destruction rapide (3 à 5 heures) de l'anatoxine tétanique ou diphtérique (22, 100).

Tableau 1. Activité de l'anatoxine tétanique adsorbée après diverses périodes de stockage à différentes températures  
Selon Cohen et al. (22).

Température (°C)	Durée de l'exposition (heures)	Activité restante
53	96	83
	192	53
55	32	97
	72	52
	144	44
	288	35
65	3	20

Les observations examinées plus haut se rapportent à l'activité des anatoxines telle qu'elle résulte de l'expérimentation animale. Une exposition prolongée à une température élevée peut aboutir à un certain nombre de modifications des caractéristiques physiques de la composante aluminium qui ne sont pas mises en évidence par les épreuves d'activité sur l'animal. Stocké comme composante unique ou comme adjuvant des vaccins D, DT et DTC (3, 118, 119), l'hydroxyde d'aluminium, utilisé comme adjuvant, a montré des symptômes de

"vieillissement" se traduisant par des changements morphologiques et structurels. On a observé une baisse constante de sa capacité à absorber le rouge Congo au cours d'un stockage à une température de +4°C à +10°C pendant 5,5 ans. De plus, des études recourant au microscope électronique et à la radiographie ont montré que les modifications morphologiques et structurelles progressent plus rapidement à 10°C qu'à 4°C (118, 119).

Le point de congélation pour les vaccins DTC adsorbés se situe entre -5°C et -10°C (32). Les vaccins adsorbés, sous forme monovalente ou en associations vaccinales, changent d'aspect après congélation. La présence de particules agrégées, de flocons ou autres particules granuleuses accélère la vitesse de sédimentation (7, 32, 76, 97). La taille des particules semble augmenter avec la répétition du cycle congélation/décongélation, et elles ne forment pas une suspension homogène même si l'on agite énergiquement le flacon (76). La congélation des gels d'hydroxyde d'aluminium provoquent de profondes modifications morphologiques visibles dans les enquêtes recourant au microscope électronique, ce qui contribue à accélérer la vitesse de sédimentation (3).

Ces modifications physiques induites par la congélation sont à la base de "l'épreuve d'agitation du vaccin" ("shake test"), utile pour détecter les vaccins adsorbés qui ont été congelés (32). Cette épreuve est d'exécution facile : après avoir agité vigoureusement le récipient contenant le vaccin, on en examine le contenu pour voir si d'éventuelles modifications physiques sont intervenues. Puis on contrôle l'ampleur de la sédimentation au bout de 30 minutes. La présence de particules granuleuses ou de flocons dans le vaccin lorsqu'il est secoué ou la formation d'un dépôt surmonté d'une colonne de liquide clair dans les 30 minutes indique que le vaccin a été congelé (32).

La congélation peut réduire l'activité de l'anatoxine tétanique. La littérature fait état d'un comportement légèrement différent des produits congelés, selon la composition du vaccin contenant l'anatoxine tétanique. Sur 5 vaccins DTC conservés à -30°C pendant 12 heures, la composante tétanique de deux vaccins a accusé une baisse d'activité de l'ordre de 30%. On a enregistré aucune diminution de l'activité pour les vaccins stockés à des températures de -5°C à -10°C. Toutefois, on a noté une diminution de l'activité de la composante anatoxine tétanique de vaccins DT adsorbés après congélation aux températures de -5°C et -30°C (32).

L'anatoxine tétanique monovalente congelée, utilisée chez de jeunes recrues, en particulier l'anatoxine congelée à quatre reprises, a suscité une réponse moyenne plus faible et une proportion moindre de titres élevés par rapport au produit congelé. Mais chez toutes les personnes vaccinées au moyen d'anatoxines congelées se sont constitués des taux protecteurs d'anticorps antitétaniques. La congélation ne semble pas affecter l'immunogénicité de l'anatoxine non adsorbée (qui reste moins immunogène que le produit adsorbé) (Tableau 2).

Tableau 2. Réponse immunitaire chez des recrues vaccinées au moyen d'une anatoxine adsorbée congelée et non congelée  
Selon Menon et al. (76)

Anatoxine	Traitement	10 jours après le dose		10 jours après 2e dose		10 jours après 3e dose	
		% > 0,01 UI/ml	moyenne en UI/ml	% > 1,0 UI/ml	moyenne UI/ml	% > 6,0 UI/ml	moyenne en UI/ml
Adsorbée sur ALPO <sub>4</sub>	non congelée	50	0,07	89	4,0	90	13,5
	congelée 1x	47	0,07	84	3,0	73	9,7
	congelée 4x	46	0,05	77	2,4	69	9,2
Non adsorbée	non congelée	50	0,04	27	0,6	21	3,2
	congelée 1x	50	0,05	36	0,7	34	3,3
	congelée 4x	54	0,06	30	0,7	21	3,2

Les vaccins DTC, DT ou antitétanique adsorbés, susceptibles d'avoir été congelés, seront examinés pour voir s'ils présentent des modifications physiques. Si c'est le cas, on devra les jeter. La quantité d'antigène administrée, si le vaccin est non homogène, peut être sujette à de fortes variations et l'administration d'un tel vaccin peut s'accompagner d'une réponse immunitaire diminuée et/ou d'une augmentation de l'incidence des réactions locales.

### 3. VACCIN ANTICOQUELUCHEUX

L'absence d'une épreuve simple, économique et reproductible, apte à déterminer l'activité du vaccin anticoquelucheux, limite les études de stabilité pour ce vaccin. L'épreuve d'activité recommandée par l'OMS (109) est techniquement difficile et exige du personnel très qualifié et un grand nombre d'une souche sélectionnée de souris. Les résultats ont tendance à présenter de fortes variations biologiques et il est difficile d'obtenir des données précises sur la détérioration de l'activité du vaccin soumis à des températures élevées, sauf en cas de modifications sensibles de l'activité du vaccin.

Néanmoins, plusieurs études fournissent des informations précieuses sur les divers facteurs qui influencent la stabilité du vaccin anticoquelucheux. Les paramètres les plus souvent étudiés sont les suivants :

1. température (7, 25, 34, 57, 58, 59, 92, 93);
2. type de vaccin : vaccin monovalent c. composante coqueluche du vaccin DTC (7, 25, 48, 54) ;
3. méthode d'inactivation (45, 51, 54);
4. souche de B. pertussis (20) et
5. nature de l'adjuvant ou de l'agent conservateur (83, 92).

#### 3.1. Influence de la température sur l'activité et la toxicité du vaccin

L'activité de la composante coqueluche du vaccin DTC dépend de la température de stockage; tant des températures élevées que la congélation peuvent provoquer une diminution de l'activité

Conservée au réfrigérateur entre +4°C et +6°C, la composante coqueluche des vaccins DTC ou DTC-polio semble conserver une activité satisfaisante pendant une période supérieure à deux ans (56, 58, 92). Toutefois, même si les conditions de stockage sont optimales, on observe une diminution constante de l'activité de la composante coqueluche durant de longues périodes de stockage. L'activité initiale moyenne de vaccins DTC, estimée à 8,5 UI par dose humaine unitaire, est tombée à moins de 4 UI par dose au bout de 46 mois (56). De même, l'activité de la composante coqueluche des vaccins DTC-polio a chuté de 5,2 - 8,6 UI/ml à 1,2 - 1,6 UI/ml après 3 ans de stockage à 4°C (58).

Tableau 3. Stabilité de la composante coqueluche des vaccins DTC  
à diverses températures

Température de stockage (°C)	Auteurs (année)	Baisse de l'activité estimée par jour en %	Durée du stockage et durée utilisée pour le calcul des taux de dégradation
4 - 8	Csizer et al. (1978) Kumar et al. (1982) Andrescu et al. (1985) Gupta et al. (1985) Kreeftenberg (1989)	0,06 0 0 0,01 0,05 - 0,08	6 ans 45 jours 12 - 18 mois 90 jours, 15 - 90 jours 3 ans
22 - 25	Kumar et al. (1982) PEV, Yougoslavie (1985) Andrescu et al. (1985) Gupta et al. (1987)	0,31 0,41 0 0,26	45 jours, 0 - 45 jours 140 jours, 40 - 140 jours 30 j. puis 18 mois à 4°C 90 jours, 15 - 90 jours
30	PEV, Yougoslavie (1985)	1,80 0,80	90 j., dimi. rapide 0-15 j. Dimi. lente, 30 - 90 jours
35 - 37	Ramshorst & Wesel (1976) Rao et al. (1985) PEV, Yougoslavie (1985) Gupta et al. (1987) Kreeftenberg (1989)	3 - 6* 1,2 5,2 2,4 5,5	56 jours, 0 - 7 jours 90 jours, 0 - 15 jours 60 jours, 0 - 20 jours 90 jours, 0 - 15 jours 56 jours, 0 - 7 jours
46	Kreeftenberg (1979, 1989) PEV, Yougoslavie (1985)	6,7 10,8	56 jours, 0 - 7 jours 20 jours, 0 - 4 jours

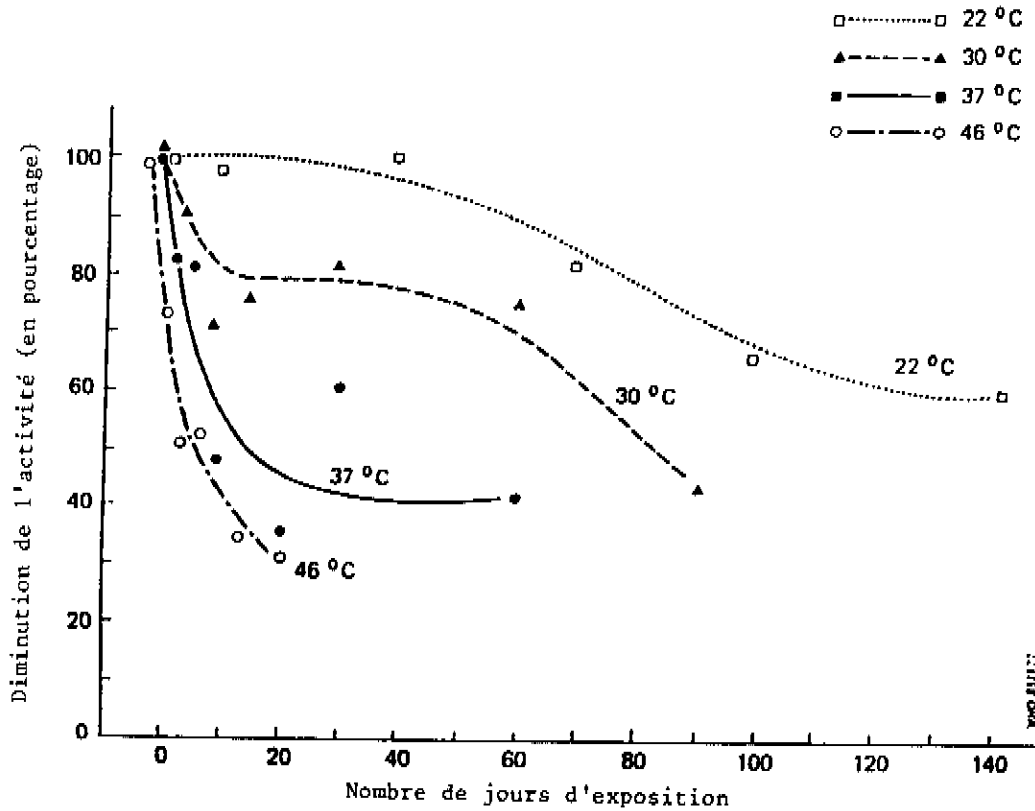
\* Deux vaccins DTC-Polio contenant un conservateur différent

Dans une autre étude, la baisse d'activité annuelle moyenne de la composante coqueluche des vaccins DTC a été évaluée à 0,35 UI par dose humaine; l'activité des vaccins a atteint un minimum de 4 UI par dose après un stockage de 6 ans à une température de +4°C (25, 26, 51).

Comme une certaine baisse d'activité se produit au cours du stockage, on ne mettra en circulation que les vaccins dont l'activité initiale présente un excédent suffisant, mesure qui aura pour effet de garantir une activité minimale de 4 UI par dose unitaire pendant la durée complète de validité.

La Figure 2 et le tableau 3 montrent l'effet des températures ambiantes sur la composante coqueluche du vaccin DTC. A 22°C - 25°C, l'activité du vaccin anticoquelucheux demeure supérieure à 80%, par rapport à la valeur initiale, pendant 2 à 8 semaines, et diminue ensuite progressivement à un taux de dégradation estimé à 0,3% - 0,4% par jour.

**Figure 2.**  
Activité (en pourcentage de la valeur initiale) de la composante coqueluche d'un vaccin DTC conservé pendant des durées et à des températures différentes Selon EPI (34)



A 37°C, le processus de dégradation du vaccin est plus spectaculaire et semble se dérouler en deux phases : au début, le déclin de l'activité est plus rapide, le taux de dégradation étant estimé à 1% - 6%, tandis que ce taux ralentit ensuite (34, 45, 58, 92).

Conservé à 45°C - 46°C, le vaccin voit son activité baisser fortement les premiers jours d'exposition, la baisse atteignant quelque 10% par jour. Une baisse de cinquante pour cent peut se produire au bout d'une exposition de 4 à 7 jours seulement (34, 57), et un stockage à 50°C - 56°C réalise la destruction rapide et complète de l'activité de la composante coqueluche (14, 48).

Certains auteurs prétendent que la composante coqueluche de vaccins DTC a un seuil de résistance à des températures élevées supérieur à celui qui a été examiné plus haut (14, 59, 93, 101). On ignore la ou les raisons expliquant la meilleure résistance de ces vaccins à la chaleur.

La congélation peut altérer l'activité des vaccins anticoquelucheux. L'activité de la composante coqueluche des vaccins DTC, subissant une congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 15 jours, perd plus de 50% de sa valeur initiale. L'activité de la composante coqueluche est davantage altérée par la congélation que par le stockage à des températures élevées (Figure 3). Les résultats d'une étude collective OMS, au cours de laquelle des vaccins DTC adsorbés provenant de 5 fabricants différents ont été conservés pendant 12 heures entre  $-5^{\circ}\text{C}$  et  $-10^{\circ}\text{C}$  et entre  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $-30^{\circ}\text{C}$ , montrent que trois vaccins ont vu l'activité de leur composante coqueluche subir une baisse sensible après exposition aux deux plages de température (32).

Rien n'indique que la toxicité du vaccin anticoquelucheux augmente avec le stockage, comme l'établissent les épreuves de prise de poids de la souris et de sensibilisation de l'histamine (7, 20, 46). En fait, on observe une diminution de la toxicité dans des vaccins conservés à  $25^{\circ}\text{C}$  et  $35^{\circ}\text{C}$  pendant une durée de 4 semaines à 3 mois (20, 46).

### 3.2. Vaccins anticoquelucheux monovalents contre composante coqueluche de vaccins associés

Les résultats des études sur la stabilité des vaccins anticoquelucheux monovalents présentent des différences considérables. Dans une étude ancienne, Kendrick et al. (54) ont observé que les vaccins anticoquelucheux non adsorbés monovalents, stockés entre  $5^{\circ}\text{C}$  et  $10^{\circ}\text{C}$ , conservaient la propriété de protéger la souris pendant pas moins de huit à dix ans. Toutefois, les vaccins anticoquelucheux monovalents étudiés par Ikic et al. (49) semblaient plutôt instables à  $4^{\circ}\text{C}$ ; après un stockage de 18 mois, certains échantillons avaient perdu de 58% à 87% de leur activité initiale.

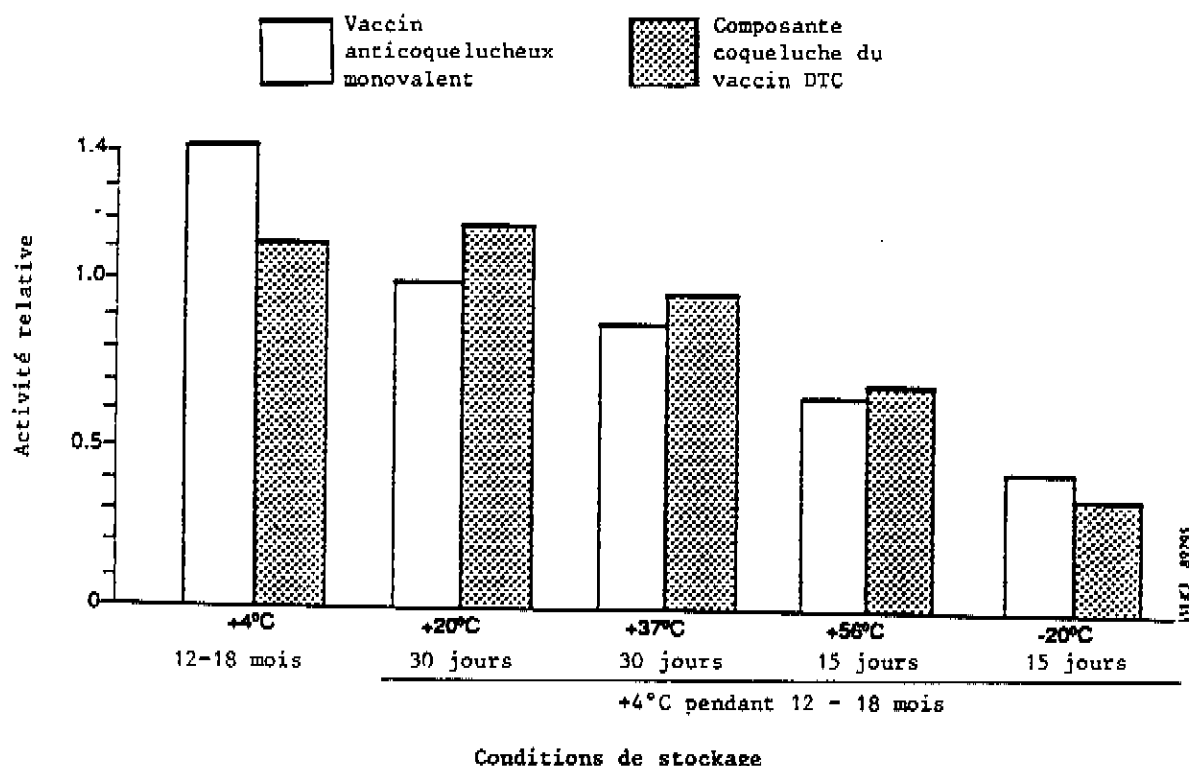
Les suspensions en vrac de B. pertussis semblent se détériorer plus rapidement à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant la première année de stockage que la composante coqueluche des vaccins des vaccins DTC adsorbés sur le phosphate d'aluminium (Figure 4).

La meilleure stabilité du vaccin anticoquelucheux comme composante du vaccin DTC résulte probablement de l'effet protecteur exercé par les protéines des anatoxines et les ions aluminium présents dans le vaccin trivalent. L'influence des ions aluminium sera examinée au chapitre 3.5.

Figure 3.

Immunogénicité du vaccin anticoquelucheux monovalent et de la composante coqueluche du vaccin DTC stocké dans des conditions variées  
Selon Andrescu et al. (7)

Immunogénicité exprimée sous forme d'activité relative par rapport à une préparation de référence nationale. L'activité relative de 0,5 est égale à 4 UI par dose unitaire



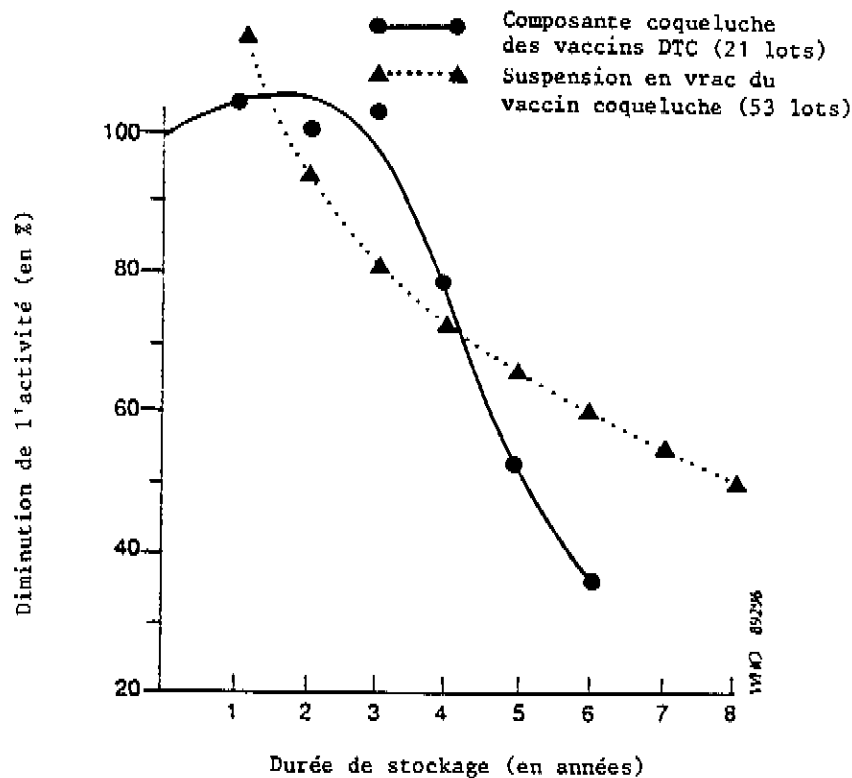
### 3.3. Méthodes d'inactivation de *B. pertussis*

Des études anciennes portant sur la stabilité des vaccins anticoquelucheux préparés à partir de cultures poussées et tuées par diverses méthodes montrent qu'aucun agent inactivant (merthiolate, phénol, formol ou la chaleur) ne prend le pas sur les autres dans ce domaine. Mais si le stockage se prolonge, les vaccins tués par le phénol ou le formol prennent une teinte sombre et sont difficiles à remettre en suspension tandis que les vaccins inactivés par le merthiolate ou la chaleur changent peu d'aspect.

Des observations anciennes faites par Kendrick et al. (54) ont été confirmées par Gupta et al. (45) qui ont étudié la stabilité de la composante coqueluche des vaccins DTC préparée au moyen de diverses méthodes d'inactivation (chaleur, formaldéhyde, glutaraldéhyde, thiomersal ou traitement par l'acétone). Les épreuves de stabilité pratiquées après le stockage de vaccins entre 4°C et 8°C, à 25°C et 35°C (Figure 5) pendant 90 jours n'ont fait apparaître aucune différence dans la stabilité des vaccins anticoquelucheux attribuée aux agents d'inactivation utilisés dans la production des préparations anticoquelucheuses.

L'étude de Gupta montre les problèmes rencontrés dans les études portant sur les vaccins anticoquelucheux, à savoir la faible reproductibilité des évaluations de l'activité de ces vaccins et les différences de vitesse de sédimentation des vaccins préparés selon le même procédé. L'activité initiale des vaccins préparés au moyen de diverses méthodes d'inactivation variait considérablement; les vaccins inactivés par le thiomersal (TIP) ayant l'activité la plus élevée et les vaccins traités par l'acétone (non représentés à la Figure 5) ayant une activité inférieure à la concentration normalisée. On notera que les différences observées quant aux diverses vitesses de sédimentation indiquées à la Figure 5 sont négligeables en raison de la variabilité des épreuves.

Figure 4.  
Activité (en % de la valeur initiale) de la suspension en vrac de vaccin anticoquelucheux et de la composante coqueluche du vaccin DTC, stockées de un à huit ans à 4°C. Selon Csizer et al. (25, 26)



### 3.4. Souches de B. pertussis

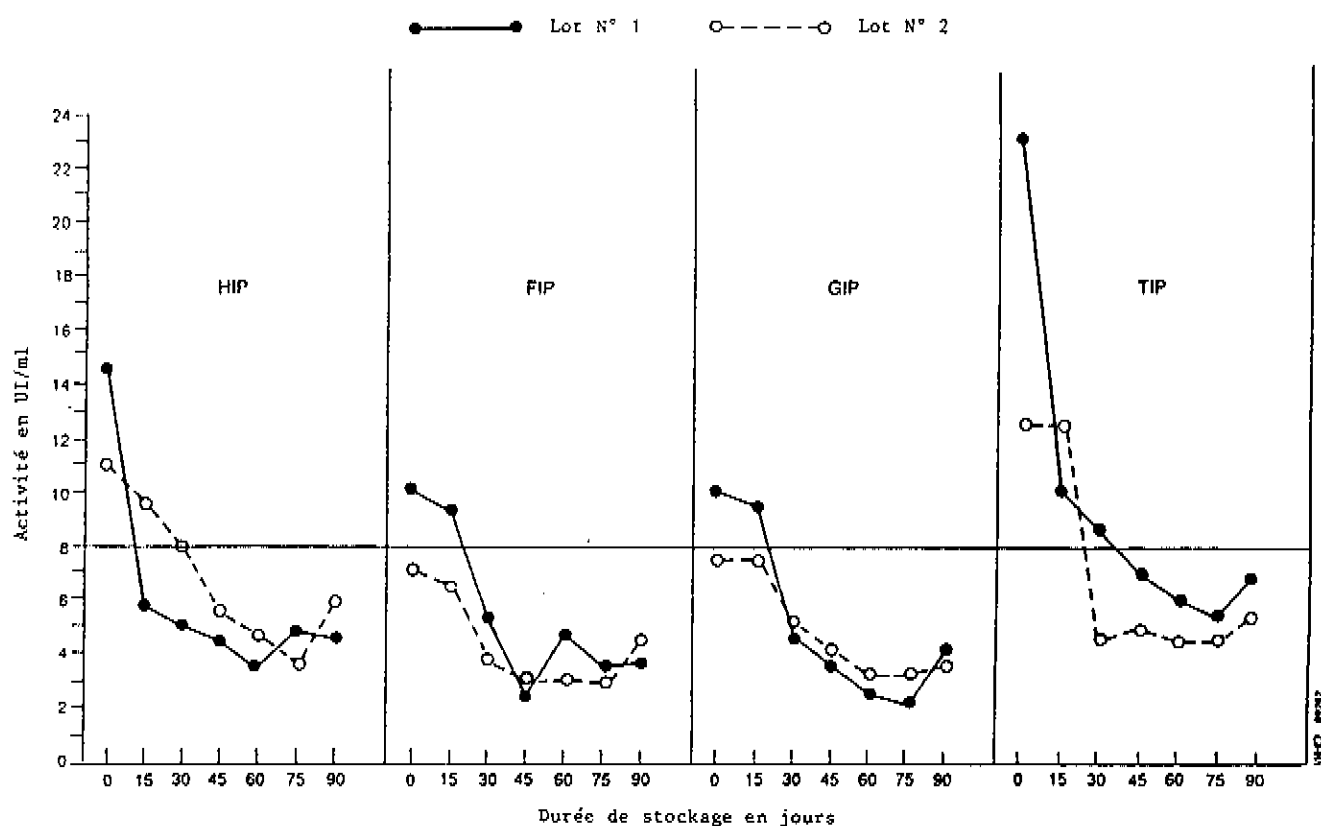
Les données relatives à l'influence des diverses souches de B. pertussis sur la stabilité du vaccin anticoquelucheux sont rares. Des vaccins préparés à partir de six souches différentes de B. pertussis ont révélé une stabilité variable, mais les chiffres n'étaient pas assez significatifs pour que l'on puisse faire une nette distinction entre souches stables et souches instables. Toutefois, dans une souche qui a donné un vaccin doté d'une plus grande stabilité, l'action du facteur favorisant la leucocytose (LPF) et du facteur sensibilisant l'histamine (HSF) s'est exercée plus longtemps que dans des vaccins préparés avec d'autres souches (20).

### 3.5. Influence du conservateur et de l'adjuvant

On savait depuis les études anciennes effectuées par Edsall et al. (29) et Pittman (91) qu'une baisse sensible de l'activité de la composante coqueluche du vaccin DTC-polio tétravalent (Tétracoq) risque de se produire si l'on utilise le chlorure de benzéthonium comme conservateur.

Figure 5.

Activité de la composante coqueluche de vaccins DTC stockés à 35°C.  
La composante coqueluche a été inactivée au moyen de la chaleur (HIP), du formaldéhyde (FIP), du glutaraldéhyde (GIP) et du thiomersal (TIP)  
Selon Gupta et al. (45)



Le chlorure de benzéthonium (CB) a été introduit comme conservateur pour remplacer le merthiolate quand il est apparu que ce dernier inactivait la composante poliovirus du vaccin tétravalent. Le CB est un composé ammoniacal quaternaire qui agit probablement en se fixant sur les sites à charge négative de la surface cellulaire des micro-organismes de B. pertussis.

Olson et al. (83) ont confirmé que le vaccin anticoquelucheux conservé par le CB était inactivé pendant le stockage. Le vaccin conservé par le CB et stocké pendant 18 semaines à 37°C n'a montré aucune activité protectrice mesurable chez la souris (Tableau 4). Cependant, on pourrait réduire l'effet nuisible dû au traitement par le CB en traitant le vaccin anticoquelucheux avec des sels d'aluminium, de calcium ou de magnésium ou par la choline ou la D-lysine avant d'ajouter le CB. On a suggéré que ces substances étaient capables d'empêcher l'absorption du CB sur les cellules de la coqueluche, ce qui stabilise par conséquent les antigènes protecteurs ainsi que le détermine l'épreuve de protection de la souris.

Tableau 4. Activité de vaccins anticoquelucheux contenant divers conservateurs et stockés à 37°C  
Selon Olson et al. (83)

Conservateur	Activité en UI/ml				
	Nombre de semaines de stockage à 37°C				
	0	5	10	16	42
Merthiolate	4,6	2,1	2,1	-	PA
Chlorure de Benzéthonium (CB)	4,7	2,8	0,8	PA	PA
CB + chlorure de calcium	3,6	3,6	3,0	3,6	3,3
CB + phosph. d'aluminium	4,3	8,5	3,8	-	3,4
CB + sulfate de magnésium	7,1	2,8	2,8	1,9	0,9
Choline	-	4,4	2,3	-	2,2

PA - Protection absente

Van Ramshorst et van Wesel (92) ont étudié la stabilité de toutes les composantes des vaccins DTC-polio tétravalents, conservés par le CB et le phénoxy-2 éthanol et le formaldéhyde. Les taux de perte d'activité de la composante coqueluche des vaccins conservés par le CB et le phénoxy-2 éthanol n'étaient pas fondamentalement différents des taux observés pour les vaccins conservés par le merthiolate. Il est possible que le phosphate d'aluminium présent dans le vaccin quadruple hollandais atténue l'effet délétère du chlorure de benzéthonium.

#### 4. VACCIN BCG

Plusieurs facteurs compliquent la normalisation et les études relatives au vaccin BCG, notamment :

1. le nombre des différentes souches dérivées (souches filles) utilisées pour la production des vaccins;
2. les différences dans les méthodes de fabrication et de contrôle appliquées par les fabricants de vaccins;
3. la teneur bactérienne et le nombre de particules cultivables, qui ne sont pas identiques pour les divers produits; et
4. l'absence d'une technique de laboratoire éprouvée pour mesurer le pouvoir protecteur des vaccins contre l'infection tuberculeuse chez l'homme.

Pour le contrôle de la qualité lot par lot, l'examen de la viabilité du vaccin, qui se fait en déterminant le nombre de particules cultivables (PC) par dénombrement des colonies sur milieu solide, constitue l'épreuve la plus importante. Cette épreuve de viabilité revêt également une importance capitale pour l'évaluation de la stabilité du BCG stocké dans des conditions variables.

Le BCG est le premier vaccin du PEV pour lequel des normes OMS de thermostabilité ont été fixées (110). On doit contrôler la stabilité à la chaleur de chaque lot de vaccin BCG en lui faisant subir une épreuve de dégradation accélérée. Le nombre de PC dans le vaccin incubé à 37°C pendant 28 jours ne devra pas être inférieur de plus de 20% par rapport au nombre de PC du vaccin conservé à 4°C (113).

##### 4.1. Effet de la température sur la viabilité du vaccin BCG

Le BCG, conservé au réfrigérateur à des températures inférieures à 8°C, est relativement stable. On peut estimer à environ 10% la perte annuelle de viabilité à cette température (38, 120), opinion s'appuyant sur le fait que la viabilité a diminué d'environ 20% (38) au cours de deux années de stockage à 4°C. Cependant, il a été signalé que certains vaccins peuvent perdre jusqu'à 20% - 25% de leur viabilité d'origine après 6 mois de stockage seulement (102). La plupart des fabricants donne une période de validité d'un an pour une conservation au réfrigérateur à des températures inférieures à 8°C.

Conservés à 13°C - 15°C pendant deux mois, les vaccins BCG n'ont subi qu'une légère perte de viabilité, mais cette perte atteignait environ 20% à la fin de 9 mois de stockage (18). La viabilité diminuait d'environ 10% par mois si les vaccins étaient exposés à une température de 18°C (120).

A température ambiante (22°C - 25°C), certains vaccins BCG peuvent perdre d'un tiers à un cinquième de leur viabilité d'origine au bout de 3 mois de stockage (18). Avec des températures plus élevées (30°C ou 37°C), la dégradation se déclenche très rapidement et le taux de diminution des PC est plus grand à la phase initiale qu'au cours des dernières phases de l'exposition (Tableau 5) et Sekhuis et al. (96). On ignore si ce taux de dégradation précoce serait aussi fort si l'on répétait l'exposition à des températures élevées.

Tableau 5. Baisse de la viabilité de quatre vaccins BCG stockés à 30°C et 37°C pendant 36 semaines  
D'après des données tirées de Bunch Christensen (18)

Vaccins	Taux de perte d'activité par jour en % de la valeur d'origine à			
	30°C		37°C	
	Durée du stockage en semaines			
	0 - 9	10 - 36	0 - 4	6 - 36
Japanese	0,5	0,1	0,8	0,2
Glaxo	0,9	0,2	2,1	0,1
Dakar	1,0	0,2	2,3	0,1
Danish	0,8	0,2	1,9	0,2

La perte quotidienne de viabilité des vaccins conservés pendant quelques semaines à 37°C allait de 1% à 2% (11, 16, 18, 120).

La dégradation du vaccin BCG est très rapide à des températures dépassant 37°C. La viabilité peut être diminuée de moitié après une exposition à 70°C pendant 30 minutes ou de 80% après 5 minutes d'ébullition (42).

L'exposition du vaccin BCG à des températures élevées aboutit manifestement à une baisse du nombre des PC, proportionnelle au niveau de température et à la durée de l'exposition. Il est cependant difficile de déterminer une limite de dégradation thermique acceptable pour le vaccin faute de connaître la dose optimale de ce dernier. Les résultats d'un certain nombre d'études donnent à penser que les vaccins dont la viabilité a diminué de 40% à 60% à la suite d'une exposition de 2 à 4 semaines à des températures élevées demeureraient capables, administrés à des enfants d'âge scolaire, de susciter une réaction à la tuberculine et des lésions vaccinales qui ne se distinguaient pas de celles produites par des vaccins témoins conservés au réfrigérateur (16, 120). Un stockage prolongé à des températures élevées affectent le vaccin BCG en diminuant l'allergie postvaccinale et la taille de la lésion vaccinale (16). L'interprétation de ces résultats n'est pas chose aisée, car l'hypersensibilité retardée à la tuberculine et les nodules au point d'inoculation, qui sont les marques caractéristiques des réponses cellulaires spécifiques, ne sont pas en rapport avec la protection.

On pose souvent la question de savoir si le vaccin BCG peut être conservé en dessous de 0°C. On pourrait supposer que des cycles répétés de congélation et de décongélation seraient susceptibles de nuire au vaccin en raison de la recristallisation de l'humidité résiduelle. Les données expérimentales ne corroborent pas une telle hypothèse. Le stockage à -20°C ou -30°C ou des cycles répétés de congélation et de décongélation (jusqu'à 10 cycles) ne semblent pas affecter la viabilité des vaccins BCG (18, 42).

Tableau 6. Viabilité et thermostabilité de 10 vaccins BCG  
Selon Lugosi (63)

Vaccins	Nbre initial de PC 10 <sup>6</sup> /ml	Viabilité au bout de 28 j. de stockage à 37°C		Perte quotidienne de viabilité en % (durée du stockage analysée)
		PCx10 <sup>6</sup> /ml	% par rapport à l'origine	
Japanese	27,0	16,6	61	1,5 (0 - 28)
Glaxo	20,1	10,9	54	1,9 (0 - 21)
USSR	7,1	3,6	51	1,8 (0 - 28)
Connaught	6,9	0,2	3	6,7 (0 - 14)
Dakar	6,5	1,8	28	3,2 (0 - 21)
Bilthoven	4,2	1,3	31	4,9 (0 - 14)
Copenhagen	2,9	1,9	66	2,5 (0 - 28)
Mérieux	2,8	0,3	11	3,3 (0 - 28)
Ins. Pasteur	2,7	1,3	48	1,9 (0 - 28)
Prague	1,1	0,2	18	5,2 (0 - 21)

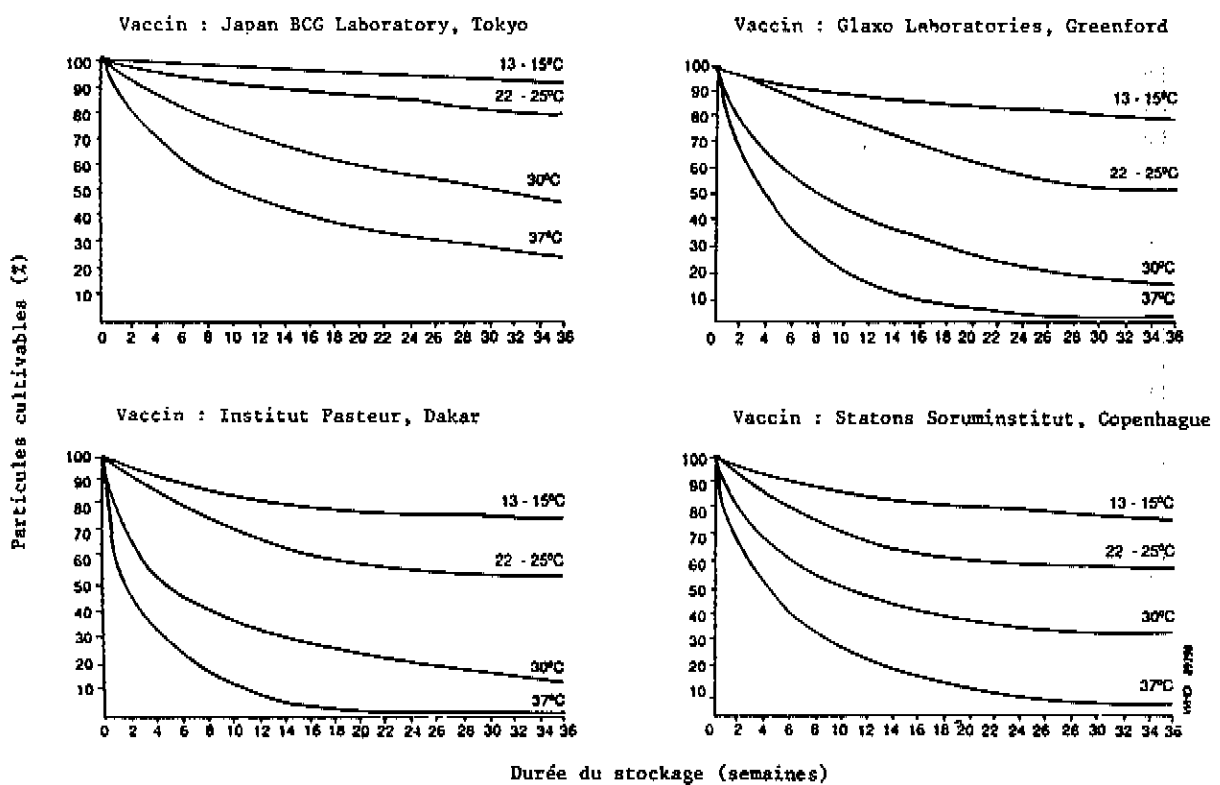
#### 4.2. Stabilité des vaccins produits à partir de différentes souches dérivées de BCG

Toutes les souches de BCG disponibles, distribuées dans le monde entier, sont issues de la même souche produite par Calmette il y a plus de 65 ans. La longue période de survie de la souche d'origine par transferts sur milieux de culture a abouti à des différences essentielles chez les souches filles.

Les souches sont généralement classées en souches "fortes", telles que la souche française 1173-P2 (Pasteur) ou la souche danoise 1331 (Copenhagen), ou en souches "faibles" comme la souche japonaise 172, la souche brésilienne Moreau ou la souche britannique 1077 (Glaxo). Cette distinction repose essentiellement sur les caractéristiques de croissance, la virulence résiduelle chez l'animal et la réactogénicité chez l'enfant. Des études récentes fournissent quelques indices suggérant que ces différences peuvent être liées à la teneur en antigènes lipidiques de surface et aux protéines sécrétées par ces souches (1).

Il existe des différences dans la thermostabilité du vaccin BCG préparé à partir de diverses souches secondaires (Figure 6). A toutes les températures d'essai, les taux de dégradation étaient le plus faibles pour le vaccin japonais et le plus forts pour les vaccins Dakar et Glaxo, le vaccin danois occupant une place intermédiaire. Si le stockage se prolonge, les différences entre les vaccins s'atténuent (Tableau 5). D'autres études montrent également des différences dans la stabilité des divers vaccins BCG (Tableau 6, et Gheorghiu et Lagrange (41), Sekhuis et al. (96).

Figure 6. Viabilité de quatre vaccins BCG stockés pendant 36 semaines à différentes températures  
Selon Bunch Christensen (18)



#### 4.3. Présentation des vaccins BCG

Les vaccins BCG nécessitent des précautions spéciales afin d'assurer une stabilité suffisante. A cet égard, la lyophilisation, un stabilisant efficace et la fermeture adéquate du récipient contenant le vaccin sont les mesures les plus importantes.

On a observé une meilleure stabilité à 4°C et 37°C et une viabilité initiale plus forte (c.-à-d., de meilleurs taux de survie après lyophilisation) après changement de la composition du stabilisant et amélioration de la méthode de dessiccation (38).

Actuellement, l'utilisation d'ampoules scellées sous vide est la pratique la plus courante. Mais si le scellement sous vide accroît la stabilité du vaccin, il implique une technique de fabrication délicate; le scellement en présence de gaz inerte est plus simple. Il n'y a pas eu de différences entre les vaccins BCG scellés sous vide ou en présence d'azote ou d'acide carbonique, à 4°C comme à 37°C (38, 60). Dans une autre étude, toutefois, le nombre de germes vivants contenus dans le vaccin scellé sous atmosphère gazeuse (azote) a diminué plus rapidement que pour le vaccin scellé sous vide (16). Un vaccin BCG scellé en présence d'argon semblait avoir une moins bonne stabilité à 37°C que le vaccin scellé sous vide (42).

On a constaté que les vaccins BCG contenus dans des flacons fermés par un bouchon en caoutchouc ont une stabilité moindre que ceux conservés dans des ampoules (63, 96). Un autre inconvénient de ces flacons, c'est que les utilisateurs sont tentés de conserver le vaccin reconstitué (104).

#### 4.4. Effet de la lumière sur la stabilité du vaccin BCG

Les vaccins BCG lyophilisés, indépendamment de la souche secondaire utilisée pour leur fabrication, sont sensibles aux rayons ultraviolets et à la lumière fluorescente, et devraient être conditionnés en ampoules à faible transmission (verre jaune) et protégés de la lumière au moment de leur utilisation (61).

#### 4.5. Stabilité du vaccin reconstitué

Le vaccin BCG reconstitué est fort instable et devrait être utilisé rapidement au cours d'une séance de vaccination (5 à 6 heures). Le vaccin restant sera jeté à la fin de la séance. Ces précautions s'appuient sur les deux préoccupations suivantes :

1. le risque de contamination, car le vaccin BCG, contrairement à tous les autres vaccins, ne contient aucun agent bactériostatique et

2. la perte d'activité (31).

## 5. VACCINS ANTIROUGEOLEUX, ANTIORLIEN ET ANTIRUBEOLEUX

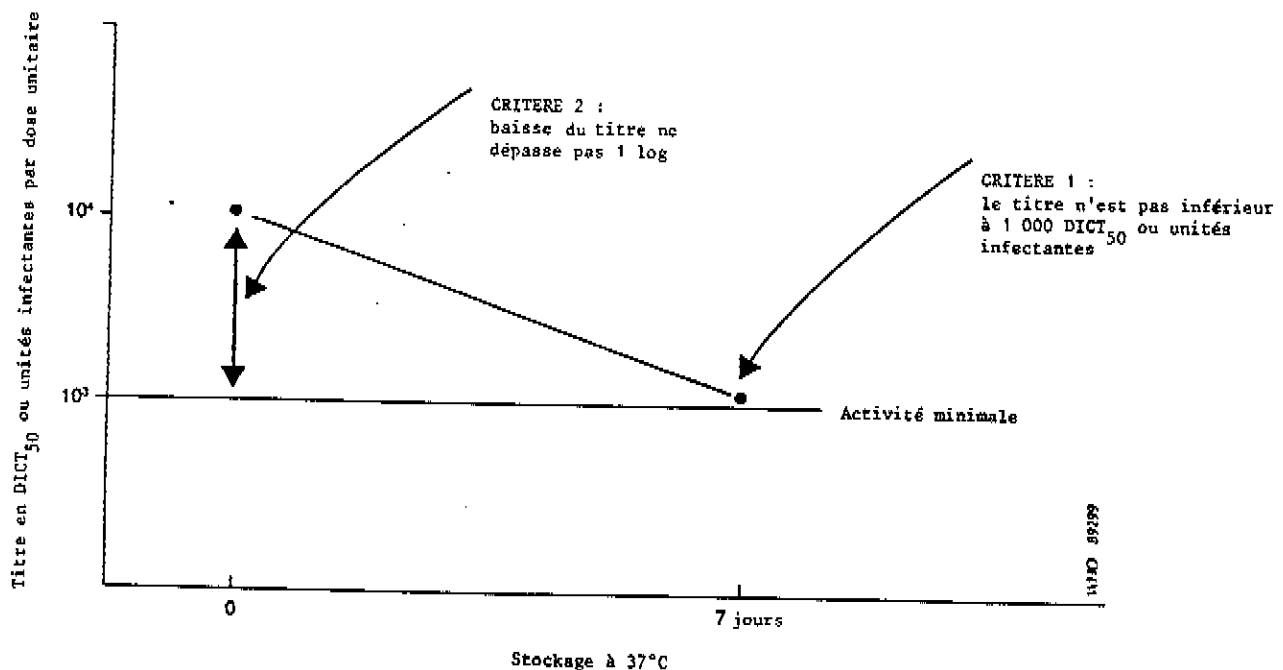
5.1. Vaccin antirougeoleux5.1.1. Vaccin lyophilisé

Ces dernières années, on a fait des progrès sensibles pour améliorer la thermostabilité du vaccin antirougeoleux. La mise au point d'un stabilisant efficace (43, 72, 87) et la formulation de normes OMS relatives à la thermostabilité du vaccin antirougeoleux lyophilisé (112 et Figure 7) ont eu un retentissement considérable sur la qualité des vaccins antirougeoleux désormais disponibles sur le marché.

Les vaccins de "première génération" exposés pendant une semaine à 37°C perdaient de 0,7 log<sub>10</sub> à 2 log<sub>10</sub> unités (5, 21, 23, 43, 75, 87). En 1979, les résultats d'une étude comparative de la thermostabilité des vaccins antirougeoleux provenant de différents fabricants ont montré que sur 6 fabricants, deux seulement produisaient des vaccins dotés d'une résistance accrue à la chaleur (30). L'activité de la plupart des vaccins est tombée au-dessous de la valeur minimale (1 000 DICT<sub>50</sub> ou UFP\* par dose humaine) au bout de quelques jours seulement à 37°C (33).

Figure 7

Normes de l'OMS relatives à la stabilité du vaccin antirougeoleux lyophilisé  
Selon Comité OMS d'experts de la standardisation biologique (112)



La dégradation thermique des vaccins antirougeoleux de "seconde génération" est bien plus lente (Figures 8, et 4, 70). A une température comprise entre 2°C et 8°C, ces vaccins améliorés conservent une activité minimale pendant plus de deux années (6, 72).

\*UFP = Unité formatrice de plage (unité infectante)

On peut distinguer deux éléments dans le processus de dégradation du vaccin antirougeoleux à des températures élevées :

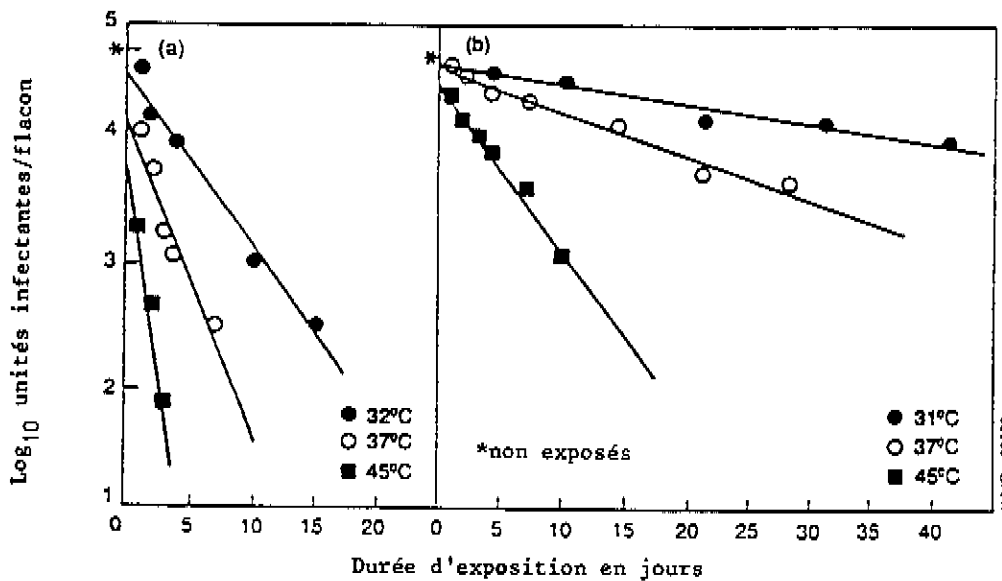
- un premier élément, la baisse rapide du titre qui semble accentuée à des températures élevées, mais apparaît inopérante au-dessous de 20°C, et
- un second élément caractérisé par un taux de dégradation plus lent (4).

On peut espérer que les vaccins de seconde génération perdront moins de 0,3 log<sub>10</sub> de titre infectant pendant une semaine d'exposition à 37°C, si l'on prend en compte ces deux éléments (Tableau 7). Le taux de dégradation dû au second élément est faible et ne dépasse pas 0,1 log<sub>10</sub> par semaine (23).

A 41°C, le processus de dégradation est rapide et se traduit par une baisse du titre de 50% en l'espace de deux jours et de 0,4 - 0,7 log<sub>10</sub> en une semaine (36, 87). La demi-vie des vaccins antirougeoleux de seconde génération (c.-à-d., la période durant laquelle le vaccin perd la moitié de son titre initial) est estimée à 31 jours, 16,6 jours et 3,3 jours à 20 - 25°C, à 37°C et 41°C, respectivement (6).

Figure 8

Résultats des épreuves de stabilité accélérées à trois températures pour un vaccin de première génération (a) et un vaccin de seconde génération (b). La valeur pour les vaccins non exposés est indiquée par un astérisque Selon Allison et al. (4) et Mann et al. (70)



A 45°C, l'activité du vaccin à souche AIK-C diminue au taux de 0,22 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> par jour, si bien qu'au bout d'une semaine de stockage à cette température, le titre du vaccin avait chuté de 1,6 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> (66).

Entre 54°C et 56°C, le vaccin antirougeoleux est inactivé rapidement, perdant plus de 0,65 log<sub>10</sub> et 1 log<sub>10</sub> pour un et trois jours d'exposition (72).

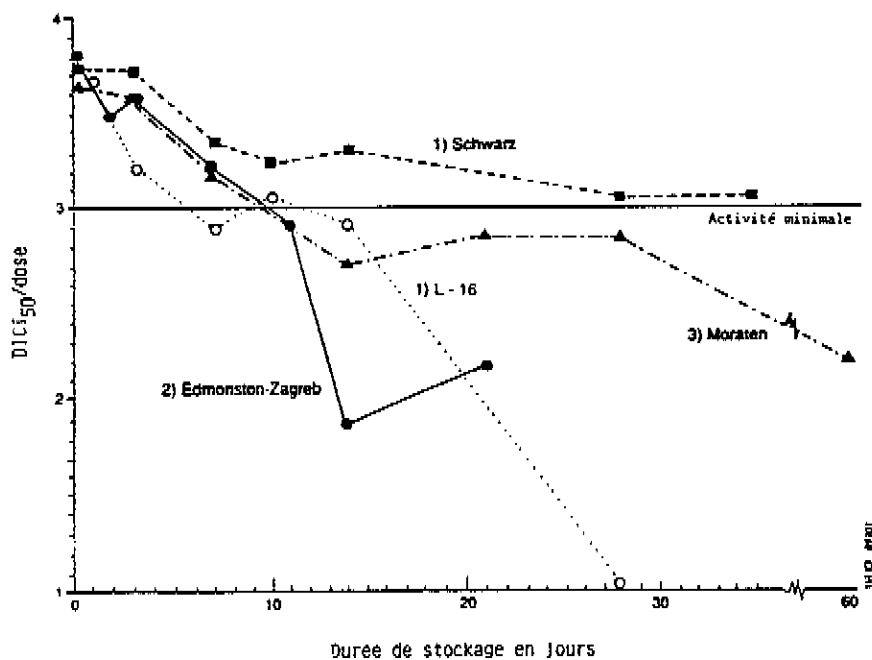
Tableau 7. Baisse du titre infectant en log<sub>10</sub> par semaine pour des vaccins antirougeoleux lyophilisés stockés à 37°C  
Selon Colinet & Peetermans (23)

Vaccin	Baisse du pouvoir infectant en log <sub>10</sub> par semaine	
	deux éléments	deuxième élément
A	0,25	0,09
B	0,23	0,11
C	0,13	0,10

La résistance accrue des vaccins antirougeoleux de seconde génération a été confirmée sur le terrain. Deux vaccins lyophilisés conservés pendant 7 jours à 37°C ont gardé tous deux le titre minimal d'infectiosité et la capacité d'induire une séroconversion chez tous les enfants âgés de 9-24 mois inclus dans l'essai (47).

Pourtant, il subsiste des différences dans la stabilité des vaccins antirougeoleux disponibles sur le marché. La Figure 9 permet de voir que, si quatre vaccins fabriqués à partir de souches virales différentes satisfont aux normes de l'OMS relatives à la stabilité, un seul vaccin résiste durablement à des températures élevées et peut être désigné de vaccin de troisième génération. Le titre des trois autres vaccins est descendu au-dessous du niveau d'activité minimal au bout de 10 à 12 jours de stockage à 37°C.

Figure 9  
Titres de virus morbillieux pour quatre vaccins antirougeoleux préparés à partir de souches différentes et stockés à 37°C  
1) - selon PEV (36); 2) - selon Manhalter et al. (67)  
et 3) - selon McAleer et al. (72)



La stabilité des vaccins antirougeoleux préparés à partir des souches AIK-C et CAM s'est révélée sensiblement différente. On a stabilisé le vaccin AIK-C au moyen de 2% de gélatine hydrolysée, 5% de lactose, 5% de saccharose, 1,8% de d-sorbitol et 0,1 % de glutamate de sodium sur milieu 199. L'activité de ce vaccin a baissé de 0,5 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> au bout de deux semaines et de 1,1 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> après un stockage de 4 semaines à 37°C (66). Le taux de dégradation moyen a été d'environ 0,04 log<sub>10</sub> par jour à 37°C.

Le vaccin CAM-70 a montré une dégradation plus rapide à 37°C. Il a perdu 0,76 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> après une semaine de stockage (103) et le taux de dégradation moyen a été de 0,11 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> par jour.

Les différences observées entre ces deux vaccins ne s'expliquent pas simplement par les différentes souches de virus morbilleux utilisées pour leur fabrication. Un autre vaccin, l'AIK-C, préparé par un fabricant différent semblait avoir une thermostabilité semblable à celle du vaccin CAM-70 et a perdu 0,1 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> par jour à 37°C.

Ces résultats suggèrent que les différences de thermostabilité pour les vaccins antirougeoleux ne sont pas liées à l'emploi de diverses souches de virus morbilleux, mais plutôt aux divers stabilisants ajoutés avant lyophilisation.

#### 5.1.2. Vaccin reconstitué

L'amélioration de la stabilité des vaccins antirougeoleux concerne des vaccins à l'état lyophilisé. Les vaccins antirougeoleux, même ceux de "seconde génération", perdent rapidement de leur activité une fois reconstitués et conservés à des températures élevées.

Les vaccins antirougeoleux reconstitués, conservés à 4°C, gardent une activité supérieure à 1000 DICT<sub>50</sub> pendant au moins 24 heures, bien qu'ils montrent une lente dégradation de l'ordre de 0,015 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> par heure (36). Le stockage de ces vaccins pendant une heure à température ambiante ou à 37°C s'est traduit par une baisse du titre d'environ 50% (Tableau 8). Une exposition de six heures à 37°C a entraîné une baisse multipliée par dix du titre de virus. Le vaccin reconstitué avec un diluant préchauffé à 41°C et incubé à cette température perdra 0,3 et 1 log<sub>10</sub> de son titre au bout d'une demi-heure et de 3 heures respectivement (Tableau 8). La souche de virus ayant servi à la préparation du vaccin et la nature du diluant utilisé pour sa reconstitution semblent avoir une influence négligeable sur la stabilité.

L'expérience sur le terrain montre le danger de conserver, à température ambiante, du vaccin reconstitué; il y a eu 92% de séroconversions parmi des enfants séronégatifs vaccinés au moyen d'un vaccin reconstitué qui avait été conservé à 37°C pendant 4 heures, mais seulement 78% de séroconversions parmi ceux qui ont été vaccinés avec un vaccin reconstitué, conservé pendant six heures à la même température (47).

#### 5.2. Vaccin antiourlien

Les deux composantes du vaccin antiourlien lyophilisé bivalent ont une stabilité identique à 4°C, 23°C, 37°C et 45°C. A 37°C, le taux de dégradation est d'environ 0,01 log<sub>10</sub> par jour pour chacune d'elles. Les demi-vies sont également semblables : 4,7 et 5,4 jours pour les composantes rougeole et oreillons à 45°C, 12 et 13 jours à 37°C, 71 et 65 jours à 23°C (24).

Tableau 8. Thermostabilité des vaccins antirougeoleux reconstitués avec différents diluants et exposés à des températures élevées

Selon (1) - PEV (36) & Peetermans et al. (87);  
(2) - Cohen & Bos (21); (3) - PEV (36); (4) - Ikic et al. (49).

		Souche vaccinale virale								
Température (°C)	Durée (h)	Schwarz 1)			Moraten 2)			Schwarz 1)	L-16 <sup>3)</sup>	E-Z <sup>4)</sup>
		Reconstitution :								
		Eau dist.	5% ASH*	1 mol MgSo <sub>4</sub>	Eau distil.	Saccharose/gélatine	5% ASH*	Eau dist.	Eau dist.	Eau dist.
Baisse du titre en log <sub>10</sub>										
41	1/2	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	0,50	-	-	-	-	-	0,55	0,69	-
	2	0,72	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	1,03	-	-	-	-	-	0,91	0,94	-
	5	-	-	-	-	-	-	1,20	1,55	-
	7	-	-	-	-	-	-	1,59	1,50	-
37	1	0,23	0,2	0,33	0,1	0	0,1	0,35	0,33	-
	2	-	-	-	0,4	0,50	0,3	-	-	-
	3	0,41	0,45	0,36	-	-	-	0,55	0,53	-
	5	-	-	-	-	-	-	0,73	1,45	-
	6	0,81	1,0	0,87	2,0	1,1	1,3	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	0,85	1,16	-
25	1	-	-	-	-	-	-	0,29	0,23	-
	3	-	-	-	-	-	-	0,59	0,5	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11
	5	-	-	-	-	-	-	0,65	0,5	-
	7	-	-	-	-	-	-	0,59	0,59	-
	12	-	-	-	-	-	-	0,73	0,55	-
	24	-	-	-	-	-	-	0,85	0,9	0,71

\* ASH - Albumine sérique humaine.

La composante ourlienne dans les vaccins oreillons-rubéole et rougeole-oreillons-rubéole (ROR) montre des taux de dégradation comparables à ceux du vaccin antiourlien monovalent lors d'expositions à 20°C - 56°C (72).

### 5.3. Vaccin antirubéoleux

Le vaccin antirubéoleux monovalent lyophilisé, tout comme la composante rubéole des vaccins bivalents (rougeole-rubéole ou oreillons-rubéole) ou du vaccin ROR trivalent, présentent de faibles taux de dégradation. A 37°C, la baisse moyenne du titre allait de 0,046 à 0,109  $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub> par semaine d'exposition. Comparée à d'autres composantes de vaccins viraux associés, il semble que la composante rubéole soit la plus stable (72).

## 6. VACCIN ANTIPOLIOMYELITIQUE

### 6.1. Vaccin polio oral

Le vaccin polio oral (VPO) est le moins thermostable des vaccins du PEV. Des technologies mises au point récemment se sont traduites par un élargissement considérable des connaissances relatives aux aspects génétiques et structuraux du poliovirus (55). Les progrès des connaissances fondamentales n'ont pas encore permis d'améliorer la stabilité du VPO. Les stabilisants actuellement disponibles, tels certains sucres et le chlorure de magnésium, ne sont pas encore satisfaisants et des recherches complémentaires sont nécessaires pour améliorer la résistance à la chaleur du VPO.

On a besoin de plus d'informations sur le point de congélation du VPO. La présence d'1 mole de chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) comme stabilisant des préparations vaccinales fait tomber le point de congélation des suspensions virales vaccinales à  $-11^{\circ}C$ . Les compartiments congélateurs des réfrigérateurs, utilisés parfois pour la conservation du VPO, fonctionnent à des températures d'environ  $-5^{\circ}C$ . Cette température est supérieure au point de fusion du vaccin et ne garantit pas que le vaccin reste à l'état solide.

Dans un congélateur où les températures sont normalement inférieures à  $-11^{\circ}C$ , les dégivrages répétés (en particulier dans les modèles à dégivrage automatique), soumettent le virus du vaccin à des cycles de congélation/décongélation. Certaines études ont montré qu'il n'y a pas de baisse significative du titre viral du VPO après avoir subi jusqu'à 10 cycles de congélation/décongélation (36, 37, 64, 98). Mais ces rapports ne précisent pas la rapidité des congélations et des décongélation, la température à laquelle les échantillons ont été soumis pendant chaque décongélation ou la longueur des intervalles pendant lesquels le vaccin a été maintenu à l'état décongelé. Dans ces études, on a mesuré le titre total pour le vaccin trivalent et l'on ne dispose d'aucune données concernant la sensibilité spécifique pour chaque type de poliovirus à des cycles de congélation/décongélation. Tous ces facteurs sont de nature à influencer la survie des particules virales au cours des cycles de congélation/décongélation (10).

#### 6.1.1. Facteurs affectant la stabilité du VPO

La stabilité du VPO dépend de plusieurs facteurs, notamment des différences possibles de sensibilité des types viraux, de la présence et de la nature du stabilisant, du pH du vaccin et du récipient dans lequel le vaccin est conservé.

#### Différences de thermosensibilité des types viraux

On se sert du VPO trivalent dans la plupart des programmes de vaccination. Les divers types de poliovirus employés pour le triple vaccin diffèrent quant à leur taux de croissance. Le type II a la croissance la plus prolifique au cours de la répllication intestinale, suivi par les types III et I. Le vaccin trivalent devrait contenir les types I, II et III dans la proportion de 10:1:3 pour compenser ces différences de taux de croissance (114). Des études se poursuivent sur d'autres formulations du VPO (84).

Si les trois types de virus ont une sensibilité différente à la chaleur, une inactivation partielle par la chaleur se produisant lors d'une rupture de la chaîne du froid pourrait modifier l'équilibre du vaccin en faveur du ou des types résistants et interférer avec la réplication du ou des types restants.

Mauler et Gruschkau (71) ont attiré l'attention sur la possibilité d'une thermostabilité différente parmi les types de poliovirus. Les résultats d'un essai portant sur 50 lots de VPO du commerce, conservés à 2°C - 6°C, ont montré que le type II est particulièrement stable, alors que le type I est le moins stable. On a observé les mêmes différences de stabilité avec des vaccins stockés à 25°C (Figure 10).

Ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres auteurs qui ont testé des vaccins VPO différents. D'après Peetermans et al. (86), le type I s'est révélé plus stable que les types II et III. Le type I a accusé une baisse de 0,06 log<sub>10</sub> seulement, au bout de 12 mois de stockage du VPO à 4°C, chiffre à rapprocher des baisses de 0,20 et 0,27 log<sub>10</sub> respectivement, pour les types II et III. Les différences entre les divers types ne sont pas constantes et rien ne milite nettement en faveur d'une plus grande résistance d'un type de virus particulier quand les vaccins sont stockés à une température comprise entre 20°C et 25°C et à 37°C (Tableau 9). Mirchamsy et al. n'ont pu trouver aucune différence entre les types de poliovirus conservés pendant 9 mois à +4°C et à -28°C (79).

Figure 10  
Stabilité du vaccin polio oral trivalent stabilisé avec un tampon peptoné et stocké à 2°C - 6°C et à 25°C  
Selon Mauler & Gruschkau (71)

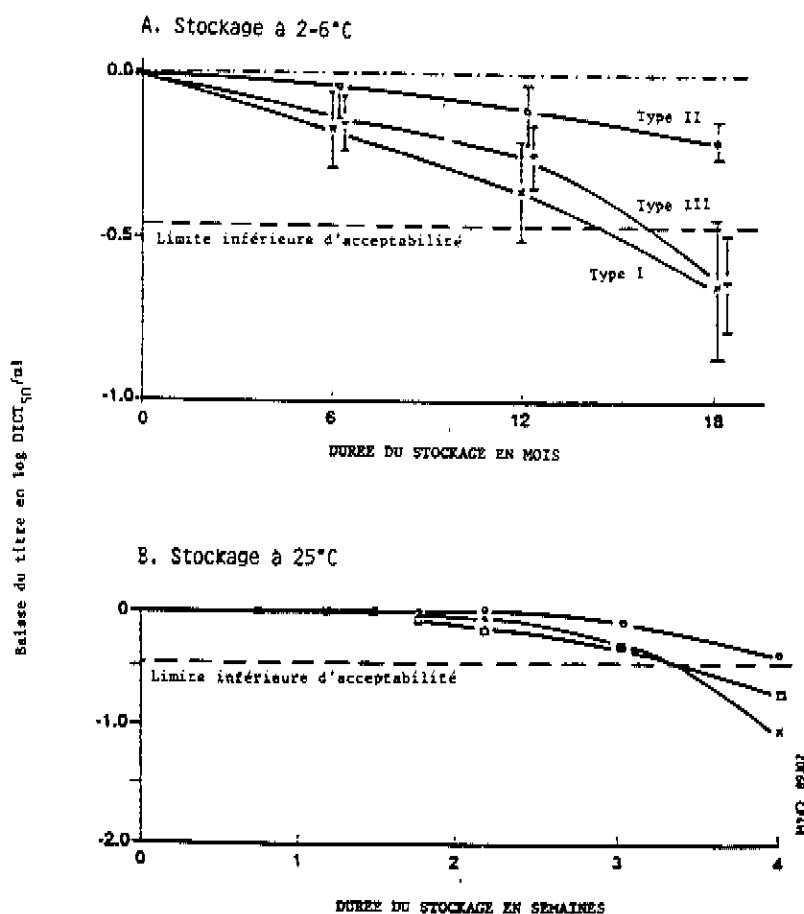


Tableau 9. Comparaison de la stabilité de différents types de poliovirus exposés aux températures de 20°C - 25°C et 37°C

Vaccin	Baisse du titre en log DICT <sub>50</sub> /jour à la température de :						Références bibliographiques
	20°C - 25°C			37°C			
	Type I	II	III	I	II	III	
Stabilisé par MgCl <sub>2</sub>	0,026	0,024	0,021	0,182	0,193	0,160	69
Stabilisé par la saccharose	0,043	0,064	0,040	0,220	0,302	0,214	
B	-	-	-	0,149	0,159	0,144	65a
C	-	-	-	0,151	0,129	0,136	
D	-	-	-	0,207	0,171	0,150	
E	-	-	-	0,224	0,161	0,211	

#### Nature du stabilisant

Des substances variées sont utilisées pour stabiliser les poliovirus atténués : chlorure de magnésium, saccharose, tampons, lait et gélatine. Les deux premiers stabilisants sont les plus souvent utilisés.

Wallis et Melnick (107) ont signalé que les poliovirus étaient stabilisés par l'addition de cations au milieu de suspension. En particulier, l'addition d'une mole de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) à des souches de poliovirus atténués permettait de stocker les vaccins à 4°C pendant 3 mois ou à 25°C pendant 25 jours sans qu'il y ait baisse significative du titre. Dans une autre étude, Melnick et al. (73) ont constaté que les vaccins, stabilisés par le MgCl<sub>2</sub>, puis soumis à une exposition de 30°C pendant 21 jours, donnaient une réponse immunitaire égale à celle de vaccins ordinaires maintenus à l'état congelé et décongelés juste avant administration.

D'autres études ont montré que la saccharose à 35% - 50% était également efficace pour stabiliser les poliovirus atténués. Perkins et Magrath (90) et Magrath (65) ont conclu qu'aussi bien 1 mole de MgCl<sub>2</sub> que la saccharose à 50% sont d'efficaces stabilisants, mais que pour réaliser une stabilité virale maximale, il était nécessaire de prévenir l'augmentation de pH qui se produit avec la perte de CO<sub>2</sub> dans le récipient.

Les deux stabilisants sont utilisés par de nombreux fabricants. A un symposium sur la stabilité des vaccins qui s'est tenu à Zagreb en 1976, on est parvenu à la conclusion que la saccharose apparaissait aussi efficace que le MgCl<sub>2</sub> pour certains vaccins. On a souligné également la meilleure acceptabilité de la saccharose par les enfants, due à son goût sucré, par opposition au goût amer du MgCl<sub>2</sub>.

Actuellement, la plupart des vaccins polio oraux disponibles sur le marché sont stabilisés avec le chlorure de magnésium, bien qu'un certain nombre de fabricants produisent des vaccins polio stabilisés par la saccharose. Des études plus récentes semblent montrer une efficacité du chlorure de magnésium supérieure à celle de la saccharose pour augmenter la thermostabilité du VPO. Le taux de perte d'activité pour les trois types de vaccin monovalent est plus grand pour les vaccins stabilisés avec la saccharose ou une solution tampon que pour les vaccins stabilisés avec le chlorure de magnésium lorsque ces vaccins sont maintenus 8 jours à 37°C ou 29 jours à 25°C (Figure 11).

Les données sur la stabilité de deux vaccins provenant d'un fabricant montrent que le vaccin stabilisé par le chlorure de magnésium est plus stable que le vaccin stabilisé avec la saccharose à des températures inférieures à 37°C (tableau 10). Cette meilleure stabilisation par le chlorure de magnésium a également été observée par un autre fabricant (79).

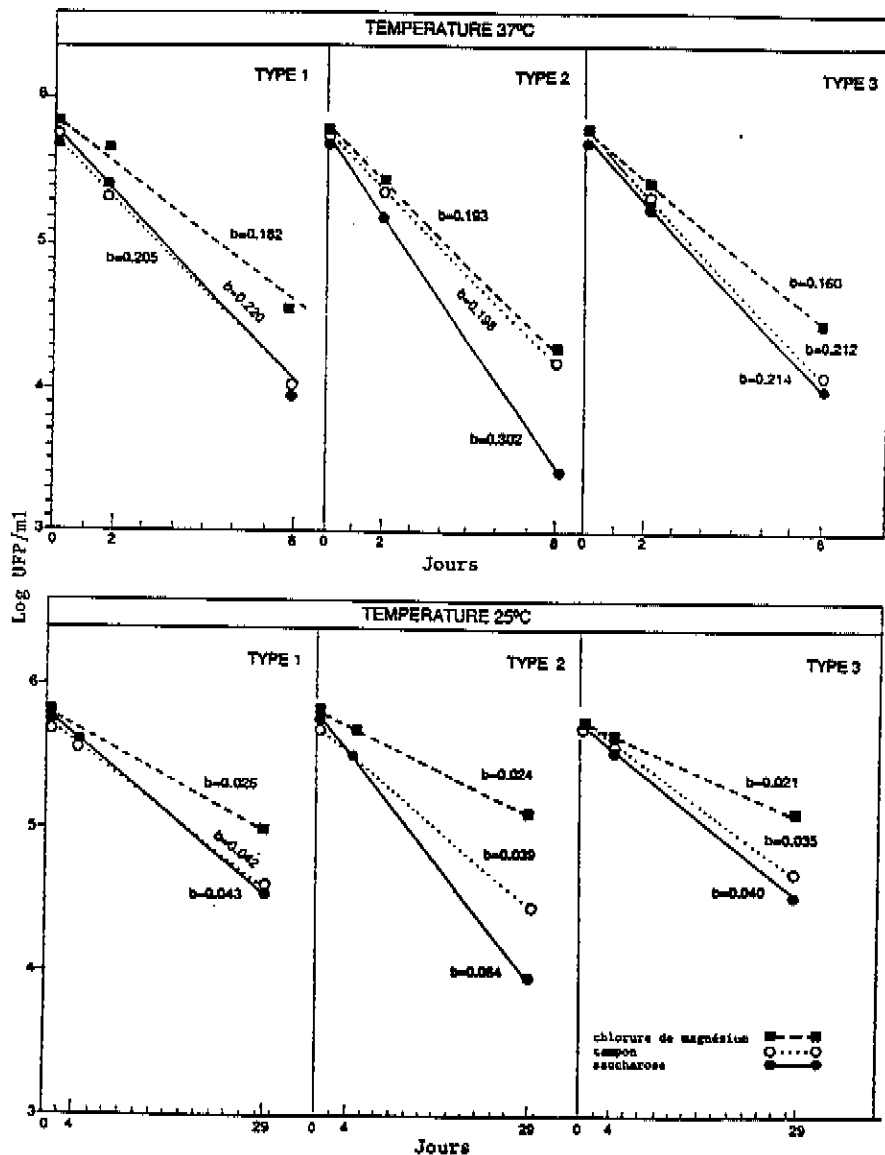
L'atelier sur la thermostabilité des vaccins qui s'est tenu à Washington en Avril 1987 est arrivé à la conclusion que l'utilisation systématique de chlorure de magnésium permettrait d'accroître la stabilité du VPO et de réduire à un minimum la dépendance à l'égard de la chaîne du froid (50). Toutefois, la saccharose tamponnée à un pH ajusté avec soin peut se révéler également un stabilisant efficace, puisque le pH joue un rôle important dans la stabilisation du vaccin antipoliomyélitique (voir ci-dessous).

On peut aussi stabiliser le poliovirus pour éviter son inactivation par la chaleur en ajoutant des acides gras et des composés voisins. L'incubation du poliovirus Sabin type I en présence d'acide myristique pendant 30 minutes à 45°C a abouti à une diminution de 19% du pouvoir infectant, tandis que l'incubation du poliovirus en l'absence du même acide s'est traduit par une baisse de 99% du pouvoir infectant (28). On a également observé cette thermostabilisation quand le poliovirus est étuvé en présence d'autres acides gras : acides hexanoïque, octanoïque ou palmitique. La présence de ces stabilisants pendant le chauffage peut prévenir des modifications de la structure de la capsidie qui rendent le virus non infectieux.

#### Valeurs du pH des suspensions virales

Melnick et Wallis ont montré en 1963 l'importance des valeurs du pH pour maintenir la stabilité du VPO (74). Ils ont démontré que les valeurs de pH augmentaient pour tous les vaccins éprouvés, cette augmentation étant bien plus marquée pour les flacons à fermeture non hermétique que pour ceux scellés hermétiquement. Les vaccins ayant un pH initial de 6,0 - 6,4 contenus dans des flacons à fermeture hermétique n'ont manifesté aucune baisse sensible de leur pouvoir infectant au bout de 20 jours à des températures de 25°C à 28°C; à la fin de l'observation, la baisse du titre n'était que de 0,1 - 0,2 log<sub>10</sub> (Tableau 11). Les échantillons contenus dans les flacons ne fermant pas hermétiquement ont perdu rapidement de leur pouvoir infectant, baisse manifestement due à l'augmentation du pH.

Figure 11  
Perte d'activité du VPO monovalent stabilisé par le chlorure de magnésium, une solution tampon et la saccharose, et stocké à 37°C et 25°C.  
Les valeurs b désignent la baisse du titre par jour (coefficients de régression pour les lignes de régression)  
Selon Mann et al. (68)



Mauler et Grushkau (71), qui ont étudié les vaccins antipoliomyélitiques monovalents ayant un pH compris entre 5,5 et 8,0, ont fait des observations identiques. Au bout de 3 jours à 37°C, les plus fortes diminutions ont été constatées avec les chiffres extrêmes de pH, 5,5 et 8,0 (Figure 12). Les vaccins antipoliomyélitiques étaient remarquablement stables avec un pH allant de 6,5 à 7,2.

Les vaccins peuvent être maintenus dans les limites de ce pH en prévenant la perte d'acide carbonique dans le vaccin contenant du bicarbonate, en réduisant à un minimum la colonne d'air se trouvant au-dessus du vaccin et en répartissant le vaccin dans des récipients fermant hermétiquement (8).

Tableau 10. Baisse moyennes du titre viral total et demi-vie de vaccins polio oraux stabilisés par la saccharose et le chlorure de magnésium et stockés à diverses températures.  
Selon Peetermans et al. (88)

Température de stockage en °C	Unité de temps	Saccharose		Chlorure de magnésium	
		Baisse titre*	Demi - vie*	Baisse titre*	Demi - vie
4	mois	0,11	6	0,02	20
20 - 25	jour	0,03	12	0,01	23,1
37	jour	0,15	1,9	0,16	1,8
45	jour	-	-	0,61	0,6

\* par unité de temps indiquée

Tableau 11. Valeurs du pH et diminution du titre du VPO type I stabilisé par le MgCl<sub>2</sub> et stocké pendant 20 jours à 25°C - 28°C  
Selon Melnick & Wallis (74)

Vaccin réparti en récipients	valeurs pH/baisse titre infectant en log <sub>10</sub> (UFP/ml)**			
	pH initial*	stockage pendant		
		1 jour	10 jours	20 jours
fermant hermétiquement	5,0	5,8	5,8/0,3	5,8/0,8
	6,0	6,5	6,7/0,0	6,5/0,1
	6,4	6,8	6,8/0,0	6,9/0,2
	7,0	7,4	7,5/1,0	7,5/1,4
A fermeture non hermétique	6,4	7,8	7,9/0,8	7,8/1,5

\* Le vaccin polio oral type I a été mélangé à un volume égal de 2 moles de MgCl<sub>2</sub> et les niveaux de pH ont été ajustés comme indiqué ci-dessus. Les niveaux de pH ont été recontrôlés après 1, 10 et 20 jours.

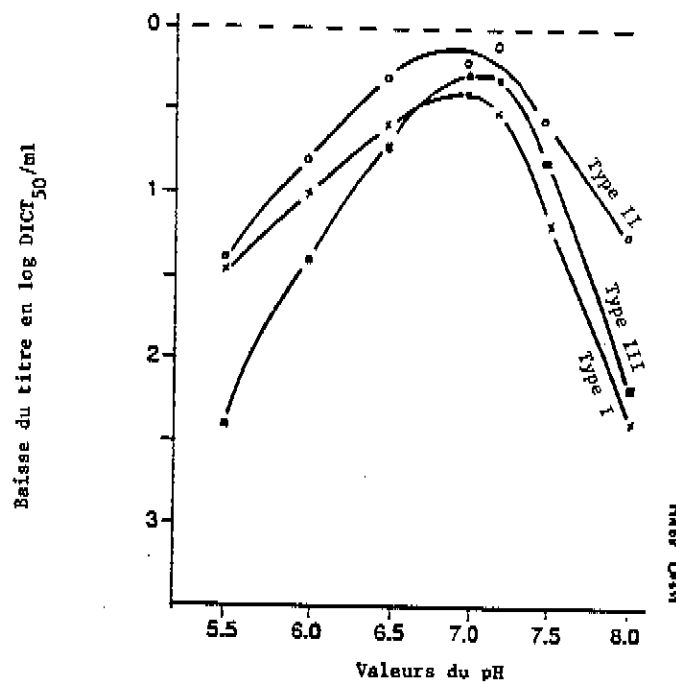
\*\* Vaccins dilués de façon à contenir initialement 10<sup>7</sup> UFP/ml

### Répartition du vaccin dans divers récipients

On estime que le verre est le meilleur matériau pour fabriquer des récipients pour vaccins (8). Sur deux vaccins stabilisés par le  $MgCl_2$ , celui réparti en flacons et fermés au moyen d'un bouchon en caoutchouc est apparu plus stable que l'autre vaccin réparti en petites bouteilles de polyéthylène. Le troisième vaccin distribué dans des récipients en nylon et fermés par un bouchon vissable possédait une stabilité intermédiaire (Tableau 12).

Figure 12

Effet de différentes valeurs de pH sur la stabilité de poliovirus atténués à 37°C pendant trois jours Selon Mauler & Gruschkau (71)



Récemment, un fabricant a préparé des vaccins polio répartis en tubes de polyéthylène basse densité, un flacon-doseur d'utilisation facile étant prévu pour les vaccinations de masse. Les épreuves de stabilité ont été pratiquées sur des vaccins monovalents répartis en récipients en verre et en polyéthylène et stockés 14 jours à 26°C et 8 mois à 5°C. Il n'y a pas eu de différence évidente en ce qui concerne la stabilité du vaccin polio oral réparti en flacons et en tubes plastiques (Tableau 13).

#### 6.1.2. Stabilité générale des vaccins polio

On a généralement contrôlé la stabilité du vaccin polio trivalent en établissant la teneur totale en virus vivants pour les trois sérotypes (17, 36, 79, 86, 98). Cette pratique privilégie la teneur en virus du type I et risque de négliger les modifications survenant dans la teneur pour les types II et III à la suite d'une exposition à des températures élevées (10).

Puisqu'il existe une relation étroite entre la température de stockage et la survie du poliovirus, les fabricants recommandent des dates limites d'utilisation différentes pour le VPO stocké à diverses températures. La plupart des fabricants indiquent deux températures de stockage : (1) une période de 2 ans maximum pour les vaccins stockés dans un congélateur à basses températures ( $-20^{\circ}\text{C}$  ou moins), et (2) une période de 6 à 12 mois pour les vaccins conservés au réfrigérateur à des températures de  $0^{\circ}\text{C}$  à  $8^{\circ}\text{C}$ . Les agents de santé éprouvent quelques difficultés à respecter les diverses dates de péremption. Il arrive parfois qu'un vaccin, stocké pendant des mois au congélateur, puis au réfrigérateur, soit encore valide sur la foi de la date limite d'utilisation qui figure sur le paquet destiné à un stockage au congélateur.

Tableau 12. Influence du récipient sur la stabilité du vaccin polio oral  
Selon Magrath (65)

Récipient	Fermeture	Volume vaccin (ml)	Dose par flacon	Stabilisant	Baisse ( $\log_{10}$ ) titre à la température de	
					$4-10^{\circ}\text{C}$	$21^{\circ}\text{C}$
flacons verre 10 ml	bouchon caoutchouc	1,5	10	$\text{MgCl}_2$	0,02/ semaine	0,4/mois
bouteilles polyéthylène 5 ml	bouchon plastique vissable	1,5	10	$\text{MgCl}_2$	0,10/ semaine	0,74 par mois
récipients nylon 1,5 ml	bouchon vissable	1,0	10	saccharose à 50%	0,04/ semaine	0,48 par mois

Quand la distribution et l'administration du VPO ne sont pas imminentes, le PEV recommande son stockage à une température inférieure à  $-15^{\circ}\text{C}$  pendant 8 mois au maximum à l'échelon central et 3 mois à l'échelon régional. Des congélateurs fiables sont généralement disponibles à ces niveaux. Sur le terrain, où le risque d'une rupture grave de la chaîne du froid est élevé et où l'on dispose de moins de congélateurs, le VPO sera conservé le moins longtemps possible au niveau des centres de santé (jusqu'à un mois) à la température du réfrigérateur ( $0^{\circ}\text{C}$  à  $8^{\circ}\text{C}$ ). On peut aussi transporter le vaccin à la température du réfrigérateur, mais pendant une période ne dépassant pas une semaine (35, 62).

Tableau 13. Baisse du titre de vaccins polio monovalents répartis en flacons verre et tubes plastique et stockés à 5°C pendant 8 mois et à 26°C pendant 14 jours.

Selon des informations provenant directement du fabricant (95)

Durée et température du récipient	type de récipient	type de virus	baisse du titre par unité de temps	
			en %	en DICT <sub>50</sub>
8 mois à 5°C	flacons verre	1	par mois	
		2	2,1	0,010
		3	5,9	0,035
	tubes plastique	1	8,9	0,066
		2	6,5	0,040
		3	7,4	0,049
14 jours à 26°C	flacons verre	1	par jour	
		2	3,0	0,017
		3	5,5	0,045
	tubes plastique	1	5,4	0,044
		2	4,2	0,027
		3	4,2	0,028
			3,9	0,024

Le mieux serait d'avoir une seule date limite d'utilisation pour éviter les problèmes liés au stockage du VPO. L'Unité des produits biologiques au siège de l'OMS s'attache actuellement à résoudre ce problème, en collaboration avec les fabricants.

Les résultats de l'épreuve de dégradation accélérée suggèrent que le vaccin polio oral garde son titre initial pendant 7 à 14 jours à 26°C et pendant 2 jours à 31°C (36).

Il existe environ une différence multipliée par 10 dans la baisse moyenne du titre par jour quand on expose le vaccin à des températures de 22°C à 26°C, par rapport à ce que l'on observe à une température de 37°C. On estime la baisse du titre à 0,01 - 0,04 log<sub>10</sub> et 0,10 - 0,20 log<sub>10</sub>, respectivement (36, 72, 88, 98).

Partant de ces taux de dégradation, un vaccin contenant au total  $6,15 \log_{10}$  virus perdra la moitié de son activité pendant deux jours d'exposition à  $37^{\circ}\text{C}$  ou 20 jours à  $22^{\circ}\text{C} - 26^{\circ}\text{C}$ . Ceci correspond bien aux observations antérieures faites par Melnick et Wallis (74) et Perkins et Magrath (90), qui avaient estimé que le vaccin polio garde une activité minimale pendant 3 jours à  $37^{\circ}\text{C}$  et pendant 14 à 21 jours à  $25^{\circ}\text{C} - 28^{\circ}\text{C}$ .

Toutefois, Mann et al., (68), qui ont étudié récemment 10 vaccins polio trivalents du commerce, ont observé des demi-vies plus courtes, de l'ordre de 1 à 2 jours à  $37^{\circ}\text{C}$  et de 5 à 11 jours à  $25^{\circ}\text{C}$ .

A des températures dépassant  $37^{\circ}\text{C}$ , la dégradation du vaccin polio survient rapidement. A  $41^{\circ}\text{C}$ , les vaccins perdent environ la moitié de leur activité chaque jour (36), alors qu'à  $50^{\circ}\text{C}$  un vaccin perd  $0,1 \log_{10}$  en une heure (17). La demi-vie de ce vaccin serait alors de 3 heures.

L'Unité des produits biologiques au siège de l'OMS travaille à l'établissement d'une norme OMS relative à la thermostabilité du vaccin polio (116). Une telle norme pourrait avoir un effet positif sur la stabilité du vaccin polio, semblable à celui résultant de la création, en 1981, de la norme relative au vaccin antirougeoleux.

#### 6.2. Vaccin polio inactivé (VPI)

Certains traitements sont connus pour détruire la capacité du poliovirus à produire des anticorps neutralisants, notamment les trois qui suivent : la chaleur, la lyophilisation et l'addition de merthiolate (thiomersal). Comme nous l'avons dit plus haut (paragraphe 3.6), la composante polio du quadruple vaccin DTC-polio n'est pas stable quand on utilise le merthiolate comme conservateur. Beale & Ungar (15) ont mis en évidence une chute rapide de l'activité de l'antigène polio dans un vaccin tétravalent conservé par le merthiolate - et l'acide édétique sodique - et stocké à  $4^{\circ}\text{C}$ . Un autre lot de vaccins tétravalents sans thiomersal, mais contenant la moitié de la quantité d'acide édétique sodique, s'est montré stable pendant une durée supérieure à un an.

Il semble qu'il existe des différences dans la thermostabilité des divers types de poliovirus inactivés, le type I étant le plus vulnérable. En l'absence de tout conservateur, la composante type I du vaccin polio trivalent se dégrade lentement après deux ans de stockage à  $4^{\circ}\text{C}$ , tandis que les deux autres types demeurent efficaces pendant 20 ans. La teneur en antigène-D pour le type I a baissé sensiblement au bout de 20 jours à  $24^{\circ}\text{C}$  et est devenue indécélable après exposition à  $32^{\circ}\text{C}$  durant la même période. On n'a observé aucun changement significatif de la valeur en antigène-D pour le type II avec l'une ou l'autre de ces températures, alors que le type III est resté stable pendant 20 jours à  $24^{\circ}\text{C}$ , mais a décliné sensiblement à  $32^{\circ}\text{C}$  (80).

Les trois types de VPI ont montré qu'ils gardaient une activité satisfaisante si on les incorporait à des vaccins associés et les stockait à 4°C pendant une durée de un à plus de 4 ans. C'est le cas du vaccin DT-polio adsorbé sur de l'hydrate d'alumine, conservé par du chlorure de benzéthonium (80), et du vaccin DTC-polio adsorbé sur du phosphate d'aluminium sans ajouter aucun conservateur, sinon le phénoxyéthanol et le formaldéhyde (92). Un stockage prolongé s'est traduit par une baisse du pouvoir antigénique, en particulier pour la composante du type I (80).

A 37°C, la teneur en antigène-D de la composante poliomyélite du quadruple vaccin diminue au cours du stockage, mais l'activité est conservée en grande partie après 8 semaines. Le type III semble être la composante la plus stable (92).

## 7. STABILITE D'AUTRES VACCINS

### 7.1. Vaccins viraux

7.1.1. Vaccin contre l'hépatite B : Deux types de vaccin sont disponibles sur le marché : un vaccin dérivé du plasma et un vaccin produit par recombinaison génétique. Tous deux sont adsorbés sur des sels d'aluminium et, comme pour d'autres vaccins qui contiennent un adjuvant, il faut éviter de les congeler. Leur point de congélation se situe à environ - 0,5°C.

A des températures comprises entre 2°C et 8°C, il semble que le vaccin contre l'hépatite B soit stable pendant de nombreuses années. On n'a pas établi la limite supérieure de sa durée de conservation.

Un vaccin antihépatite B dérivé de la levure (Engerix-B, Smith Kline Biologicals) semble être un produit relativement stable aux températures élevées. Le fabricant estime que le vaccin est stable pendant 30 jours à 20°C - 25°C, pendant une semaine à 37°C et pendant 3 jours à 45°C. La période biologique calculée pour ces trois températures est de 9 mois, 31 jours et 13 jours (informations fournies directement par le fabricant).

Il n'y a pas eu de différence dans les réponses immunes chez des personnes en bonne santé ayant reçu un vaccin recombinant chauffé à 37°C pendant une semaine et un vaccin témoin conservé à 4°C; la répartition des anticorps et la moyenne géométrique de leur titre étaient identiques pour les deux groupes. Dans l'ensemble, l'incidence, la gravité et les types de symptômes étaient semblables chez les personnes ayant reçu l'un ou l'autre des vaccins; il n'a été signalé aucune réaction indésirable grave (53).

Un vaccin d'un autre fabricant peut résister à des températures dépassant 30°C pendant 5 heures au maximum (77).

On a besoin d'informations complémentaires sur la stabilité comparative de différents vaccins antihépatite B.

### 7.1.2. Vaccin contre la fièvre jaune

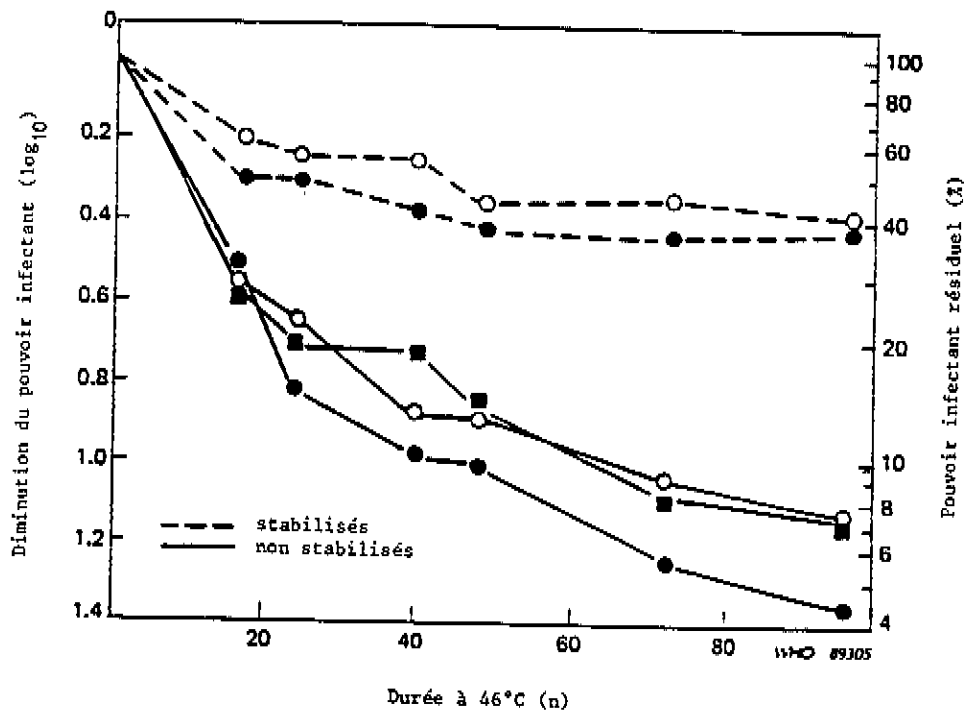
La stabilité médiocre des premiers vaccins anti-amarils a été préoccupante. La plupart de ces vaccins perdaient de leur activité durant une période de stockage de 6 mois à -20°C ou 5°C, et, soumis à des températures élevées, ils se dégradaient très rapidement (93a). Les recherches entreprises dans un certain nombre de laboratoires ont révélé que des milieux stabilisants, tels que le lactose, le sorbitol, l'histidine et l'alanine, amélioraient considérablement la thermostabilité du vaccin 17D lyophilisé (12, 13) et que l'on pouvait utiliser avec succès, dans les différentes conditions de terrain, des vaccins stabilisés (39, 94). La mise au point d'une formulation plus stable du vaccin anti-amaril a permis la fabrication d'un produit dont la durée de conservation à une température de -20°C ou de 4°C peut être prolongée jusqu'à 2 ans. La demi-vie du pouvoir infectant du vaccin est estimée à environ 10 mois à température ambiante, de 10 à 20 jours à 37°C et environ 2 jours à 46°C (19, 37). La différence de stabilité du vaccin - ancienne ou nouvelle formulation - est résumée à la Figure 13. Le vaccin stabilisé montre une baisse identique du titre quand il est maintenu en permanence à 37°C et quand il est soumis à des cycles répétés de 37°C et 4°C (37).

Cependant, les vaccins actuellement disponibles sur le marché, présentent une stabilité fort variable. Une étude collective entreprise avec la collaboration de 12 fabricants de vaccins anti-amarils 17D (108) a montré une stabilité accusant une forte amplitude parmi les vaccins stockés à 37°C pendant 32 jours (Figure 14). Les résultats de l'étude indiquent que certains vaccins contenaient encore au moins 1 000 unités infectantes après 14 jours d'exposition, alors que d'autres vaccins avaient perdu la majeure partie de leur activité après une exposition de 1 à 5 jours.

L'OMS a établi une norme de thermostabilité applicable au vaccin contre la fièvre jaune : le vaccin doit conserver 1000 DL<sub>50</sub> pour la souris, ou son équivalent en unités formatrices de plages, par dose humaine, et la baisse moyenne du titre doit être inférieure à 1 log après une exposition à 37°C pendant 2 semaines (115). On espère que la norme applicable à la stabilité aura pour effet, comme ce fut le cas pour le vaccin anti-rougeoleux, de produire des vaccins anti-amarils plus stables.

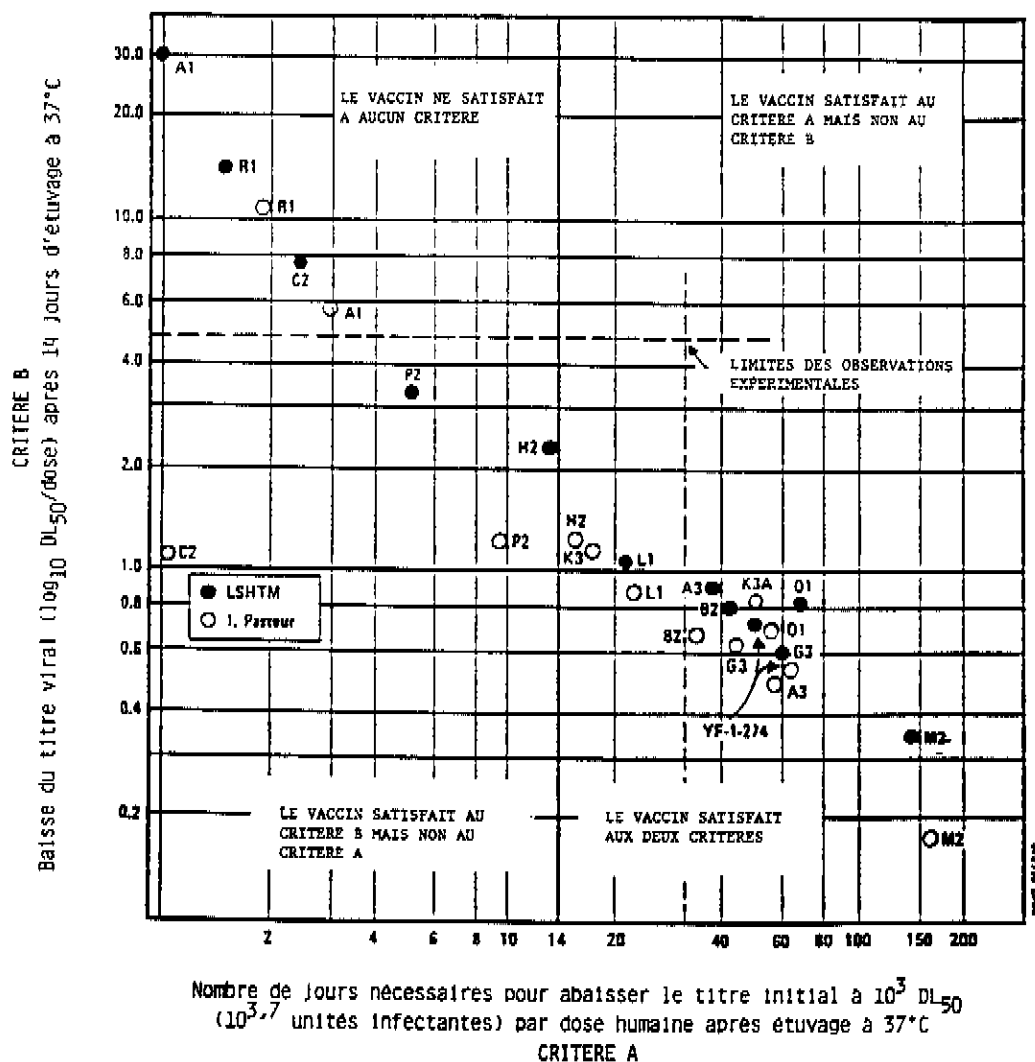
Figure 13

Diminution du pouvoir infectant de vaccins viraux anti-amarils lyophilisés, stabilisés et non stabilisés, conservés à 46°C pendant 4 jours  
Selon Burfoot et al. (19)



Après reconstitution, le vaccin stabilisé perd sa résistance à la chaleur. Conservé dans un bain de glace à une température ambiante de 37°C, le vaccin peut rester assez stable pendant 3 heures (baisse du titre d'environ 5% par heure), mais sa dilution à 37°C aboutit à une inactivation rapide du titre viral, avec disparition complète de l'activité en moins d'une heure (99). Un autre vaccin anti-amaril stabilisé a perdu près de la moitié de son pouvoir infectant au bout de 90 minutes environ à 36°C et 45 minutes à 46°C (19).

Figure 14  
Classement des vaccins anti-mariels 17D en fonction  
de la norme de thermostabilité envisagée  
Selon OMS (108)



- London School of Hygiene and Tropical Medicine
- Institut Pasteur

Parmi plusieurs diluants, dont l'eau distillée, un soluté salin, une solution tampon, la gélatine et la peptone, l'eau distillée s'est révélée la plus efficace pour maintenir le titre viral d'un vaccin pendant 3 heures après reconstitution à 37°C (99).

### 7.1.3. Vaccin contre la rage

Chaque année, de nombreuses doses de vaccin Semple et d'autres vaccins antirabiques produits en tissu nerveux sont distribués dans les pays en développement à titre de prophylaxie antirabique après exposition. Le vaccin Semple est susceptible de provoquer des accidents paralytiques ou autres effets secondaires fâcheux et sa durée de conservation, à l'état liquide, est courte (quelques mois) à 4°C (2).

Le vaccin produit en cerveau de souriceau à la mamelle (SEM), largement utilisé en Amérique latine, est plus stable que le vaccin Semple. Conservé à 4°C pendant une année, le vaccin garde une activité minimale acceptable, bien que la perte d'activité moyenne soit estimée à environ 42%. Le stockage à 25°C pendant un mois n'a provoqué aucune détérioration entraînant une baisse d'activité qui soit inférieure au niveau minimal, mais le vaccin a perdu de son activité à la suite d'un stockage à 37°C pendant moins d'un mois (27). Les vaccins SEM sont plus stables à l'état lyophilisé que liquide, mais l'humidité résiduelle est un facteur critique pour leur stabilité (27).

Le vaccin antirabique lyophilisé, actuellement recommandé, produit en cultures de cellules diploïdes humaines (HDCSV), conservé à 4°C, bénéficie d'une durée de conservation bien plus grande que les vaccins obtenus à partir de tissu nerveux et est capable de résister à un stockage d'un mois à 37°C sans perte d'activité observable chez la souris (82). Le vaccin HDCSV, expédié, transporté et stocké à des températures allant de 26°C à 36°C, pendant une période de 11 semaines, a suscité la même réponse immunitaire chez des volontaires pakistanais appartenant au corps médical que les vaccins transportés et conservés à 2°C - 13°C (81).

## 7.2. Vaccins bactériens

### 7.2.1. Vaccin antiméningococcique polyosidique

L'immunogénicité du vaccin antiméningococcique est liée à la taille des molécules des antigènes protecteurs - les polyosides des groupes A et C. Plus le poids moléculaire est élevé, plus forte est la réponse immunitaire. Les antigènes polyosidiques se dépolymérisent facilement et leur masse moléculaire relative diminue quand ils sont exposés à des températures ambiantes. L'étude du degré de polymérisation est par conséquent utile pour évaluer tant l'immunogénicité que la thermostabilité du vaccin.

Le lactose, utilisé comme solvant pour la lyophilisation, a montré qu'il protégeait les antigènes antiméningococciques polyosidiques contre la dépolymérisation thermique (105, 111). Les vaccins antiméningococciques stabilisés peuvent, à l'état sec, être conservés aux températures du réfrigérateur pendant deux ans (9, 9a).

Le vaccin polysidique du groupe A n'a pas été affecté par sa conservation à température ambiante (20 - 25°C) pendant 12 jours ou à 35°C pendant 3 jours (9a). Le vaccin des groupes A + C d'un fabricant, conservé à 22°C pendant 18 mois, a présenté une très faible dépolymérisation : à 45°C, la composante du groupe A a atteint un seuil critique de dépolymérisation après 4 semaines, tandis que la composante du groupe C est restée stable pendant 8 à 10 semaines à cette température (9).

On a signalé qu'un vaccin reconstitué avec un diluant contenant du phénol à la concentration de 0,25% restait stable si on le maintenait à -20°C pendant 2 mois ou à 4°C pendant 4 semaines, à 25°C pendant 2 semaines ou 37°C pendant 4 jours (9).

En dépit de sa relative stabilité, le vaccin reconstitué sera conservé aux températures du réfrigérateur et jeté si on ne l'utilise pas le jour même où il a été reconstitué (111).

Certaines caractéristiques propres à la stabilité des vaccins ci-dessus, conservés à 37°C, sont résumés au tableau 14.

#### 7.2.2. Vaccin anticholérique à cellules entières

Les vaccins anticholériques non adsorbés, inactivés par la chaleur et conservés par le thiomersal, demeurent actifs lors de l'épreuve de protection de la souris à une température de 37°C pendant 1 semaine (composante du sérogroupe Inaba) à 3 semaines (composante Ogawa). Ni la composante Ogawa ni la composante Inaba du vaccin anticholérique adsorbé sur de l'hydroxyde d'alumine n'ont montré une baisse sensible d'activité après 4 semaines de stockage à 37°C (52).

Un stockage prolongé, à des températures élevées, de vaccins anticholériques - inactivés et conservés par le phénol - s'est traduit par une réduction nette de l'activité chez la souris; après une année de stockage à 20°C - 25°C et 37°C, la détérioration moyenne de l'activité était voisine de 60% et 92% respectivement (44).

Des données sur la stabilité des vaccins anticholériques à sous-unités font défaut dans la littérature.

#### 7.2.3. Vaccin contre la typhoïde

Les vaccins antityphoïdiques à cellules entières, inactivés par l'acétone ou selon une méthode associant chaleur et phénol, semblent être plus thermosensibles que les vaccins anticholériques fluides (52). A 37°C, la perte d'activité, contrôlée au moyen de l'épreuve de protection de la souris, a été considérable au cours de la première semaine d'exposition, mais plus faible ensuite.

Tableau 14. Stabilité de vaccins non pris en compte par le PEV

Vaccins	Forme	Stabilité à 37°C			Références bibliographiques
		Perte d'activité estim. par		Vaccin stable pendant (demi-vie)	
		heure	jour		
Antiméningo. polyosidique A + C	L*	...	...	4 semaines	9
	R**			4 jours	
Antirabique produit à partir de souches de cellules diploïdes humaines	L	...	...	4 semaines	81
Antihépatite B obtenu à partir de levure	R	...	environ 2%	1 semaine (31 jours)	Information communiquée directement par le fabricant
Fièvre jaune	L	...	3 - 5%	certains sont stables durant 14 jours, pour d'autres, l'activité descend en dessous du minimum après 1 - 5 jours (10-20 jours)	19, 37, 108
	R	50 - 100%	...	très instable	

\* L - vaccin lyophilisé

\*\*R - vaccin reconstitué ou liquide

## 8. CONCLUSIONS

On s'est efforcé, dans ce document, d'évaluer la perte d'activité de divers vaccins conservés à des températures élevées. Un résumé des informations disponibles sur les vaccins du PEV se trouve au tableau 15, qui présente des données relatives aux diverses températures de stockage, et au tableau 16 où figurent les taux estimatifs de dégradation des vaccins du PEV exposés à 37°C.

La stabilité des vaccins du PEV est fort variable. En fonction de leur résistance à un stockage à 37°C, on peut les classer en vaccins stables (anatoxines) et instables (vaccin antirougeoleux reconstitué ou vaccin polio oral) (Tableau 16). Les données présentées montrent que certains vaccins peuvent résister à de longues périodes d'exposition sans perte d'activité importante. La résistance élevée de l'anatoxine tétanique à la chaleur peut, par exemple, justifier des études sur l'utilisation de ce vaccin en l'absence de tout moyen de réfrigération. L'anatoxine tétanique, exposée à la chaleur pendant de brèves périodes, pourrait conserver un titre satisfaisant lors de son utilisation dans le cadre du système avancé qui délivre la vaccination antitétanique aux femmes en âge de procréer, dans les régions où la chaîne du froid ne peut être maintenue.

Cependant, toute exposition à des températures élevées entraîne une dégradation du vaccin, même si l'activité restante est encore supérieure au niveau considéré comme exerçant une action immunisante minimale. En outre, chaque exposition à une température ambiante exerce un effet réducteur cumulatif sur l'activité du vaccin : au niveau des postes de santé périphériques, les vaccins ne pourront résister aux températures mentionnées dans la présente étude si leur activité a déjà été compromise par des défaillances antérieures de la chaîne du froid. Les données présentées dans cette étude peuvent offrir, aux responsables de programme et aux magasiniers exerçant à l'échelon central et de province, un certain nombre d'indications qui leur permettront de prendre les décisions correctes à propos des vaccins exposés à des températures élevées.

Tous les vaccins devraient être systématiquement stockés aux températures recommandées par les fabricants et les programmes nationaux. La chaîne du froid imaginée pour la conservation des vaccins demeure un élément extrêmement vulnérable des programmes de vaccination dans les pays en développement à climat tropical. Les pays développés à climat tempéré ne sont pas à l'abri de problèmes de ce genre. Dans tous les pays, seules l'existence de systèmes de réfrigération, la surveillance des températures et la tenue de fiches de contrôle permettront d'assurer que chaque flacon de vaccin est conservé dans des conditions appropriées jusqu'au moment de son utilisation et qu'il est utilisé avant la date limite d'utilisation figurant sur l'étiquette.

La thermostabilité du vaccin polio oral est un domaine où la recherche doit se poursuivre en priorité. Ce vaccin est le plus sensible de la famille des vaccins du PEV et c'est lui qui, par conséquent, fixe les normes applicables à la chaîne du froid. Toute amélioration de ce vaccin influera sur le coût et l'efficacité des programmes de vaccination dans les pays à climat tropical.

Tableau 15. Stabilité des vaccins du PEV à diverses températures

Vaccin	Température de stockage en °C			
	0 - 8	22 - 25	35 - 37	Plus de 37
Anatoxines diphtérique et tétanique (vaccins monovalents ou éléments de vaccins associés)	Stable pendant 3 - 7 ans	Stable pendant des mois	Stable pendant au moins 6 semaines	Stable pendant 2 semaines à 45°C, perte d'activité après quelques jours à 53°C et après quelques h à 60 - 65°C
Vaccin coqueluche	Stockage sans danger pendant 18 à 24 mois, mais diminution lente et constante de l'activité	Stabilité variable. Certains vaccins sont stables pendant deux semaines	Stabilité variable. Certains vaccins perdent 50% de leur activité après une semaine de stockage	A 45°C, perte d'activité de 10% environ par jour, perte d'activité rapide à 50°C
BCG lyophilisé	Stable pendant une année	Stabilité variable. 20-30% de perte de germes viables au bout de 3 mois de stockage	Stabilité variable. 20% de perte de germes viables au bout de 3-14 jours de stockage	Instable. 50% de perte après 30 minutes d'exposition à 70°C
BCG reconstitué	Le BCG reconstitué ne doit pas être utilisé pendant plus d'une séance de vaccination (5-6 heures). Cette recommandation se fonde sur deux raisons : 1) le risque de contamination, car le BCG ne contient pas d'agent bactériostatique, et 2) le risque de perte d'activité.			
Vaccin antirougeoleux lyophilisé	Stable pendant deux ans	Conserve une activité satisfaisante (demi-vie) pendant un mois	Conserve une activité satisfaisante durant au moins une semaine	Perte d'activité de 50% après 2 -3 jours d'exposition à 41°C. A 54°C, perte d'activité de 80% après un jour d'exposition

Tableau 15. Stabilité des vaccins du PEV à diverses températures (suite)

Vaccin	Température de stockage en °C			
	0 - 8	22 - 25	35 - 37	Plus de 37
Vaccin antirougeoleux lyophilisé	Stable pendant deux ans	Conserve une activité satisfaisante (demi-vie) pendant un mois	Conserve une activité satisfaisante durant au moins une semaine	Perte d'activité de 50% après 2 - 3 jours d'exposition à 41°C. A 54°C, perte d'activité de 80% après un jour d'exposition
Vaccin antirougeoleux reconstitué	Instable. Devrait être utilisé pendant une même séance de vaccination	Instable. Perte de 50% au bout d'une heure. Perte de 70% après 3 heures	Très instable. Le titre peut être au-dessous du niveau acceptable après 2 - 7 heures	Inactivation en l'espace d'une heure
Vaccin polio oral	Stable pendant 6 - 12 mois	Instable. Perte de 50% au bout de 20 jours. Certains vaccins peuvent conserver un titre satisfaisant pendant 1 à 2 semaines	Très instable. Le titre peut devenir insatisfaisant au bout de 1 à 3 jours	Très instable. A 41°C, perte de 50% au bout d'une journée. A 50°C, le titre peut devenir insatisfaisant au bout de 1 à 3 heures
Vaccin polio inactivé	Stable pendant 1 - 4 ans	Baisse de la teneur en antigène-D pour le type I au bout de 20 jours	Perte de l'antigène-D après 20 jours pour certains vaccins de type I, mais pas de perte importante pour d'autres après 4 semaines	Manque de données précises

Tableau 16. Stabilité des vaccins du PEV à 37°C

Vaccin	Stabilité à 37°C			Références bibliographiques
	Perte d'activité (%) estimée par		Durée de stabilité du vaccin	
	heure	jour		
Anatoxines tétanique et diphtérique	...	0-1	au moins 6 semaines	58, 59, 92, 101
Vaccin polio inactivé	...	0,1-3 pour les types II et III, 0,5-5 pour le type I	Teneur en antigène-D inchangée pendant plusieurs jours	80, 92
Vaccin BCG lyophilisé	...	1-6	Perte de germes viables égale à 20% au bout de 3-14 jours d'exposition	18, 63
Vaccin anti-coquelucheux	...	1-6	Perte de 50% après une semaine d'exposition	34, 45, 58, 92, 93
Vaccin anti-rougeoleux lyophilisé	...	2-5	Conserve une activité minimale pendant une semaine au moins, mais perd 20% et 50% d'activité au bout de 1 à 4 et de 2 à 6 jours d'exposition respectivement	23, 36, 87
Reconstitué	10-50%	...	Très instable, perte de 50% au bout de 1 à 3 heures d'exposition	
Vaccin polio oral vivant	...	20-50	Instable, perte de 20% et 50% après 1 et 2 jours d'exposition respectivement	36, 88, 98

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abou-Zeid C., Rock G.A.W., Minnikin D.E., Parlett J.H., Osborn T.W & Grange J.M.E.: Effect of the method of preparation of Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine on the properties of four daughters strains.  
J. Appl. Bacteriol., 1987, 63 : 449-453
2. Albrycht H. & Wysokinska T: Stability of virus fixe in the rabies vaccines.  
Med.Dosw. Mikrobiol., 1976, 28 : 297-301 (en polonais).
3. Aleksandrowicz J., Drozd M., Fiejka M, & Kurzatowski W.: Evaluation of the physico-chemical status of the aluminium hydroxide in biopreparations stored at different conditions.  
Accepted for publication in Med.Dosw. Mikrobiol., 1989 (en polonais).
4. Allison L.M.C., Mann G.F., Perkins F.T. & Zuckerman A.J.: An accelerated stability test procedure for lyophilized measles vaccines.  
J. Biol. Stand., 1981, 9 : 185 - 194
5. Andzhaparidze O.G., Gordienko N.M. & Dorofeev V.M.: The effectiveness and stability of live measles vaccine from the L-16 strain.  
Proc. Symp. Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976 : 81 - 86
6. Andre F.E.: Thermodegradation of lyophilized measles vaccine.  
Rev. Infect. Dis., 1983, 5 : 532 - 534
7. Andrescu V., Marion M., Ivan I., Mihai G., Caffe I., Alecu V. & Neagu A.: Influence of temperature on the stability of pertussis vaccine.  
Arch. Roum. Path. Exper. Microbiol., 1985, 44 : 283 - 292
8. Anonymous - Recommendations on oral poliomyelitis vaccine.  
Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976 : 257
9. Arickx M., Crooy P., De Neys R., Gilles D., Liveyns R.: Analysis of a bivalent meningococcal vaccine (A+C). II. Stability.  
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 1979, 59 : 267 - 277
- 9a. Artenstein M.S.: Meningococcal infections. 4. Stability of group A and group C polysaccharide vaccines. Bull. wrld Hlth Org., 1971, 45 : 287 - 290
10. Arya S.C.: Stability of oral polio vaccine at different temperatures.  
Vaccine 1988, 6 : 298
11. Balazs D., Pitur I., Draghici D. & Tasca G.: Stability of the Romanian dried BCG vaccine in different conditions of storage.  
Develop. Biol. Standard., 1986, 58 : 173 - 177
12. Barme M. & Bronnert C.: Thermostabilisation du vaccin anti-amaril 17D lyophilisé. I. Essai de substances protectrices.  
J. Biol. Stand., 1984, 12 : 435 - 442

13. Barne M., Vacher B., Ryhiner M.L. & Chabannier G.: Thermostabilisation du vaccin anti-mariol 17D lyophilisé. II. Lots pilotes préparés dans les conditions d'une production industrielle. *J. Biol. Stand.*, 1987, 15 : 67 - 72
14. Beale J.: In: Report on Informal Working Group on the Production and testing of Pertussis Vaccines, Geneva 13 - 14 October 1977.  
Document OMS BLG/UNDP/PERT 78.1
15. Beale A.J. & Ungar J.: Potency and stability of combined pertussis, diphtheria, tetanus and poliomyelitis (quadruple) vaccine.  
*Lancet* 1962, 2 : 805 - 808
16. Bhushan K., Baily G.V.J., Nair S.S., Ganapathy K.T. & Singh V.:  
Freeze dried BCG vaccine sealed in presence of nitrogen.  
*Indian J. Med. Res.*, 1975, 63 : 1335 - 1343
17. Boll G.K. Barron I. & de la Sierra L.: Estabilidad a temperatura de la vacuna antipoliomielítica de virus atenuados elaborados en el Instituto Nacional de Virología. *Sal. Publ. Mex.*, 1979, 21 : 263
18. Bunch Christensen K.: The thermostability of different BCG products.  
Document OMS, WHO/Tb/81.118
19. Burfoot C., Yound P.A. & Finter N.B.: The thermal stability of a stabilized 17D yellow fever virus vaccine. *J. Biol. Stand.*, 1977, 5 : 173 - 179
20. Canadjija I.: Stability testing of pertussis vaccines prepared from different B.pertussis strains.  
Seconde réunion OMS consacrée à la recherche sur la coqueluche, Genève 5-6 Novembre 1979, document OMS BLG/PRT/79.16
21. Cohen H. & Bos J.M.: The influence of storage at 37°C on the potency of freeze dried and reconstituted live measles vaccine.  
*Proc. Symp. on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines*, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976 : 95-101
22. Cohen H., van Ramshorst J.D. & Tasman A.: Consistency in potency assay of tetanus toxoid in mice. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la santé*, 1959, 20 : 1133 - 1150
23. Colinet G. & Peetermans J.: Behaviour of five commercial measles vaccines in an accelerated stability test. *J. Biol. Stand.*, 1982, 10 : 241 - 247
24. Colinet G., Rossignol J. & Peetermans J.: A study of the stability of a bivalent measles-mumps vaccine. *J. Biol. Stand.*, 1982, 10 : 341 - 346
25. Csizer A., Zsidai J. & Joo I.: Stability of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccines  
*Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1978, 25 : 1 - 9
26. Csizer Z., Zsidai J. & Joo I.: Factors influencing the stability of acid-precipitated polyvalent *Bordetella pertussis* bulk suspensions.  
*Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1975, 22 : 83 - 93
27. Diaz A.M.O., Perdomo G.N. & Becco O.: Stability of rabies suckling mouse brain vaccine stored at different temperatures. *Bulletin de l'OPS*, 1988, 22 : 281 - 291

28. Dorval B.L., Chow M. & Klibanov A.M.: Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1989, 159 : 1177 - 1183
29. Edsall G., McComb J.A., Wetterlow L.H. & Ipsen J.: Significance of the loss of potency in the pertussis component of certain lots of "quadruple antigen". *New Engl. J. Med.*, 1962, 267 : 687 - 689
30. Programme élargi de vaccination : Amélioration de la stabilité du vaccin antirougeoleux lyophilisé. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1979, 54 : 354
31. Programme élargi de vaccination : Thermostabilité des vaccins. *Rel. épidé. heb.*, 1980, 55 : 252 - 254
32. Programme élargi de vaccination : Effets de la congélation sur l'aspect, l'activité et la toxicité des vaccins DTCoq adsorbés et non adsorbés. *Rel. épidé. heb.*, 1980a, 55 : 385 - 389 et 396-398
33. Programme élargi de vaccination : Stabilité du vaccin antirougeoleux lyophilisé. *Rel. épidé. heb.*, 1981, 56 : 177-179

34. Programme élargi de vaccination : Thermostabilité du vaccin antipoliomyélique. Yougoslavie. Rel. épidé. heb., 1985, 60 : 300 - 301
35. Programme élargi de vaccination : Assurer le fonctionnement de la chaîne du froid. Module de formation destiné aux cadres moyens, Révision 1985a.
36. Programme élargi de vaccination : Thermostabilité des vaccins antipoliomyélique et antirougeoleux. Rel. épidé. heb., 1988, 63 : 349 - 352.
37. Finter N.B., Ferris R., Kelly A. & Prydie J.: Effects of adverse storage on live virus vaccines. Develop. biol. Stand., 1978, 41 : 271 - 276
38. Freudenstein H.: Successful stabilization of BCG vaccines in ampoules sealed under protective gas. J. Biol. Standard., 1978, 6 : 243 - 253
39. Georges A.J., Tible F., Meunier D.M.Y., Gonzalez J.P., Beraud A.M., Sissoko-Dybdahl N.R., Abdul-Wahid S., Fritzell B., Girard M. & Georges-Corbout M.C.: Thermostability and efficacy in the field of a new, stabilized yellow fever virus vaccine. Vaccine 1985, 3 : 313 - 315
40. Gheorghiu M., Lagrange P.H. & Fillastre C.: The stability and immunogenicity of a dispersed grown freeze-dried Pasteur BCG vaccine. J. Biol. Standard., 1988, 16 : 15 - 26
41. Gheorghiu M. & Lagrange P.H.: Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 1983, 134 C : 125 - 147
42. Gheorghiu M., Kosloff F. & De Rudder J.: Etude de la thermostabilité du vaccin BCG intradermique lyophilisé (Souche de L'Institut Pasteur). Progr. Immunobiol. Standard., 1972, 5 : 437 - 441
43. Gray A.: Stability of measles vaccine. Develop. biol. Stand., 1978, 41 : 265 - 266

44. Gupta R.K., Maheshwari S.C., Ehandari S.K., Sharma S.B., Ahuja S. & Saxena S.N.: The stability of cholera vaccine at elevated temperatures with regard to relative antigenicity. J. Biol. Stand., 1985, 13 : 93 - 95
45. Gupta R.K., Sharma S.B., Ahuja S. & Saxena S.N.: The effect of different inactivating agents on the potency, toxicity and stability of pertussis vaccine. J. Biol. Stand., 1987, 15 : 87 - 98
46. Gupta R.K., Sharma S.B., Ahuja S. & Saxena S.N.: Effects of elevated temperatures on the opacity and toxicity of pertussis vaccine manufactured with different inactivating agents. Vaccine 1986, 4 : 185 - 190

47. Heyman D.L., Smith E.L., Nakano J.H., Jato J.G., Martin G.R., Maben G.K.: Further field testing of the more heat-stable measles vaccines in Cameroon. *Brit. Med. J.*, 1982, 285 : 531 - 533
48. Ikić D., Higy-Mandić L., Desardić-Canadjija I. & Vidaković-Bival V.: Testing of stability of freeze dried and fluid pertussis vaccines. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 205 - 212
49. Ikić D., Juzbasić M., Cimbur-Schreiber T., Rajninger-Miholić M. & Delimar N.: Thermostability of live freeze-dried measles vaccine after reconstitution. *Proc. Symp. on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 103 - 112
50. Institut of Medicine: A Workshop on Temperature Stable Vaccines for Developing Countries: Significance and Development Strategies. Washington D.C., 13 - 14 Avril 1987
51. Joo I., Csizer Z. & Zsidai J.: Stability of pertussis vaccines and the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis vaccines. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 181 - 188
52. Joo I. & Zsidai J.: Stability of cholera and typhoid vaccines. *J. Biol. Stand.*, 1979, 7 : 341 - 348
53. Just M. & Berger R.: Immunogenicity of a heat treated recombinant DNA hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1988, 6 : 399 - 400
54. Kendrick P., Eldering G., Hornbeck C., Baher J.: A study of the stability of pertussis vaccine under different conditions of storage. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 1955, 45 : 1131 - 1137
55. Kew O.M.: Molecular approaches for improvement of the thermostability of the oral poliovaccines. *Workshop on Temperature Stable Vaccines for Developing Countries: Significance and Development Strategies, Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Washington D.C., 13 - 14 Avril 1987*

56. Kindt H., Milcke L., Engelhardt H., Reber G., Pranter W. & Blackkolb F.: Stability of DTP vaccine. *J. Biol Standard.*, 1974, 2 : 183 - 187
57. Kreeftenberg J.G.: Results of investigations regarding the stability of pertussis vaccine lot 86 of the Rijksinstituut voor de Volksgenozondheid. *Seconde Réunion OMS consacrée à la recherche sur la coqueluche, Genève, 5-6 Novembre 1979, Document OMS, BLG/PRT/79.16*
58. Kreeftenberg J.G.: communication personnelle, 1989
59. Kumar V., Sahai., Gupta P. & Kumar A.: Studies on the stability of tetanus and pertussis components of DPT vaccines on exposure to different temperatures. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 1982, 25 : 50 - 54
60. Ladefoged A.: communication personnelle, 1989
61. Landi S., Barbara C., Przykuta K. & Held H.R.: Effect of light on freeze-dried BCG vaccines. *J. Biol. Standard.*, 1977, 5 : 321 - 326
62. Lloyd J.S.: Storage of vaccines. *Postgraduate Doctor - Middle East 1984, February* : 110 - 120
63. Lugosi L.: Multiple comparison of dried BCG vaccines: stability at 37<sup>0</sup>C and persistence of strains in the mouse spleen. *Vaccine 1984, 2* : 149 - 156
64. Lundbeck H.: Effet de la congélation et de la décongélation sur la conservation de l'activité des vaccins. *Rel. épidé. heb. 1977, 52* : 119
65. Magrath D.I.: Factors affecting the storage life of oral poliovaccine. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 35 - 44
- 65a. Magrath D.I.: direct information
66. Makino S.: communication personnelle, 1989
67. Manhalter T., Juzbasic M., Rajninger-Miholic M., Delimar N., Cimbur T., Asaj R., Beck M., Prisljin-Muskic M., Dedic I. & Kosicek M.: Stability of Edmonston-Zagreb measles vaccine. *Padiatr. Grenzgeb.*, 1987, 26 : 72 - 73
68. Mann G.F., Allison L.M. & Zuckerman A.J.: Stability of poliovirus vaccines. *Manuscrit 1985*
69. Mann G.F. & Zuckerman A.J.: Design of a routine test for the thermal stability of poliomyelitis vaccine (oral). *Manuscrit 1985*
70. Mann G.F., Allison L.M.C. Lloyd J.S., Tam P., Zuckerman A.J. & Perkins F.T.: Stability of further-attenuated measles vaccine. *Rev. Infect. Dis.*, 1983, 5 : 482 - 486
71. Mauler R. & Gruschkau H.: On stability of oral poliovirus vaccines. *Develop. biol. Stand.*, 1978, 41 : 267 - 270

72. McAleer W.J., Markus H.Z. McLean A.M. Buynak E.B. & Hilleman M.R.: Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer. *J. Biol. Stand.*, 1980, 8 : 281 - 287
73. Melnick J.L., Ashkenazi A., Midulla V.C., Wallis C. & Bernstein A.: Immunogenic potency of  $MgCl_2$  stabilized oral poliovaccine. *JAMA* 1963, 185 : 406 - 408
74. Melnick J.L. & Wallis C.: Effect of pH on thermal stabilization of oral poliovirus vaccine by magnesium chloride. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1963, 112 : 894 - 897
75. Menetrat J.L. & Netter R.: Study on the stability of a measles vaccine. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1977, 128 B : 421 - 424
76. Menon P.S., Sahai G., Joshi V.B.; Murthy R.G.S., Boparai M.S. & Thomas A.K.: Field trial on frozen and thawed tetanus toxoid. *Indian J. Med. Res.*, 1976., 64 : 5 - 32
77. Merck Sharp Dohme: Packing Digest, November 1986, Delta Communications Inc.
78. Mirchamsy H.: communication personnelle, 1989
79. Mirchamsy H., Shafiyi A., Mahinpour M. & Nazari P.: Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine. *Develop. Biol. Stand.*, 1978, 41 : 255 - 257
80. Moynihan M. & Petersen I.: The durability of inactivated poliovirus vaccine: studies on the stability of potency in vivo and in vitro. *J. Biol. Standard.*, 1982, 10 : 261 - 268
81. Nicholson K.G., Burney M.I., Ali S. & Perkins F.T.: Stability of human diploid-cell-strain rabies vaccine at high ambient temperatures. *Lancet* 1983, 1 : 916 - 918
82. Nicolas A.J., Patet J., Vincent Falquet J.G., Branche R., Delaiti P., Montagnon B., Peyron L. & Soulebot J.P.: Production of inactivated rabies vaccine for human use on WI38 diploid cells. Results of potency tests. Stability of the vaccine in liquid and freeze-dried forms. *Develop. Biol. Stand.*, 1978, 40 : 17 - 24
83. Olson B.H., Eldering G. & Graham B.: Stabilization of pertussis vaccine in the presence of benzethonium chloride. *J. Bacteriol.*, 1964, 87 : 543 - 546
84. Patriarca P.A., Laender F., Palmeira G., Couto Oliveira M.J., Lima Filho J., de Souza Dantes M.C., Tenorio Cordeiro M., Risi J.B. & Orenstein W.A.: Randomised trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil. *Lancet* 1988, 1 : 429 - 432
85. Peetermans J. 1987, information communiquée directement
86. Peetermans J., Colinet G. & Stephenne J.: Activity of attenuated poliomyelitis and measles vaccines exposed at different temperatures. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 61 - 65

87. Peetermans J., Colinet G., Stephenne J. & Bouillet A.: Stability of freeze dried and reconstituted measles vaccines. *Develop. Biol. Stand.*, 1978, 41 : 259 - 264
88. Peetermans J.H. & Colinet G.: Production, control and stability of live poliovirus vaccine. *Proc. Smith Kline-RIT Symp. on Potency and Efficacy of Vaccines, Manila, Philippines, 21 - 22 Février 1980*
89. Perkins F.T.: The need for stable vaccines in the developing countries. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 23 - 31
90. Perkins F.T. & Magrath D.I.: The potency of stabilized oral poliovaccines. *European Association Poliomyelitis, 9th Symposium, Stockholm, 1962* : 371 - 375
91. Pittman M.: Instability of pertussis vaccine component in quadruple antigen vaccine. *JAMA* 1962, 181 : 25 - 30
92. van Ramshorst J.D. & Wezel A.L.: The stability of the components of quadruple (DTP Polio) vaccines. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 189 - 195
93. Rao Y.U., William J. & Kalyanaraman V.R.: A study of the stability of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccines. *J. Biol. Standard.*, 1985, 13 : 267 - 270
- 93a. Robin Y., Saenz A.C., Outschoorns A.S. & Grab B.: Etude de la thermostabilité du vaccin anti-amaril sur des échantillons de huit lots provenant de divers pays. *Bull. Org. mond. santé*, 1971, 44 : 729 - 737
94. Roche J.C., Jouan A., Brison B., Rodhain R., Fritzell B. & Hannoun C.: Comparative clinical study of a new 17D thermostable yellow fever vaccine. *Vaccine* 1986, 4 : 163 - 165
95. Sclavo: information communiquée directement à l'OMS, 1988.
96. Sekhyis V.M., Freudenstein H. & Sirks J.L.: Report on results of a collaborative assay of BCG vaccines organized by the International Association of Biological Standardization. *J. Biol. Stand.*, 1977, 5 : 85 - 109
97. Shmelyova E.I.: Study of stability of physical properties and biological activity of liquid and freeze dried adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccines. *Proc. Symposium on Stability and Effectiveness of Measles, Poliomyelitis and Pertussis Vaccines, The Yugoslav Academy of Sciences and Arts, Zagreb 1976* : 159 - 179
98. Sokhey J., Gupta C.K., Sharma B. & Singh H.: Stability of polio vaccine at different temperatures. *Vaccine* 1988, 6 : 12 - 13

99. de Souza Lopez O., Suely S.D., de Almeida Guimaraes, de Carvalho R.: Studies on yellow fever vaccine. II. Stability of the reconstituted product. J. Biol. Stand., 1988, 16 : 71 - 76
100. Sporzynska Z.: Studies on the stability of toxoids. I. The effect of temperature on the immunogenic properties of diphtheria toxoid. Exper. Med. Microbiol., 1965, 17 : 130 - 139
101. Steiner D.W, Hart F.E.: The stability of bacterial vaccines at elevated temperatures. Develop. Biol. Standard., 1978, 41 : 249 - 253
102. Steiner D.W. & Lansi S.: Stability of BCG vaccines. Develop. Biol. Standard., 1986, 58 : 119 - 125
103. Takaku K.: communication personnelle, 1989
104. Ten Dam H.G. Toman K., Hitze K.L. & Guld J.: Present knowledge of immunization against tuberculosis. Bull. Org. mond. santé, 1976, 54 : 255 - 269
105. Tiesjema R.H., Beuvery E.C & Pas B.J.: Enhanced stability of meningococcal polysaccharide vaccines by using lactose as a menstrum for lyophilization. Bull. Org. mon. santé, 1977, 55 : 43 - 48
106. Tydeman M.S., & Kirkwood T.B.L.: Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards. I. Properties of maximum likelihood estimators. J. Biol. Stand., 1984, 12 : 195 - 206
107. Wallis C. & Melnick J.L.: Stabilization of poliovirus by cations. Texas Rep. Biol. Med., 1961, 19 : 683
108. OMS : vaccins anti-amarils. Thermostabilité des vaccins lyophilisés. Rel. épidé. heb., 1987, 62 : 181 - 183
109. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Trentième rapport. Normes relatives à l'anatoxine diphtérique, au vaccin anticoquelucheux, à l'anatoxine tétanique et aux vaccins associés. OMS, Série de Rapports techniques, 1979, no. 638 : 64 - 87
110. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Trentième rapport. Normes révisées relatives au vaccin BCG lyophilisé. OMS, Série de rapports tech., no. 638 : 126 - 159
111. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Trente et unième rapport. Normes relatives au vaccin antiméningococcique polysidique. OMS, Série de rapports tech., 1981, no. 658 : 188 - 198
112. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Normes relatives au vaccin antirougeoleux (vivant). Additif 1981. OMS, Série de rapports tech., 1982, no. 673 : 193
113. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Normes relatives au vaccin BCG desséché. OMS, Série de rapports tech., 1987, no. 745 : 64 - 98
114. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Trente-huitième Rapport. Normes relatives au vaccin antipoliomyélique (oral). OMS, Série de rapports tech., 1988, no. 771 : 98 - 99

115. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Trente-huitième Rapport. Normes relatives au vaccin anti-amaril.  
OMS, Série de rapports tech., 1988a, no. 771 : 223 - 224
116. Comité OMS d'experts de la standardisation biologique : Investigation of the thermal stability of current oral poliovirus vaccines. Preliminary summary of results, Genève, 24 - 31 Octobre 1989, Document OMS BS/89. 1614
117. OMS, Programme élargi de vaccination : la poliomyélite en 1986, 1987 et 1988. Rel. épidé. heb., 1989, 64 : 273 -279
118. Wojcik W. & Wolska E. : Some physico-chemical changes of the adsorbent used in the diphtheria toxoid-vaccine appearing on its prolonged storage (en polonais).  
Med. Dosw. Mikrobiol., 1962, 14 : 331 - 337
119. Wojcik W. & Wolska E. : Effect of storage on the adsorbent of the combined diphtheria-tetanus prophylactic (en polonais).  
Med. Dosw. Mikrobiol., 1963, 15 : 133 -139
120. Wright D. & Muggleton P.W. : Evaluation of the stability of dried BCG vaccine. Tubercle 1972, 53 : 92 - 99

\* \* \*