

Les bases immunologiques de la vaccination

5

La tuberculose



Programme élargi
de vaccination



Organisation mondiale de la santé
Genève, 1993

Les bases immunologiques de la vaccination

Module 1 : Immunologie générale

Module 2 : Diphtérie

Module 3 : Tétanos

Module 4 : Coqueluche

Module 5 : Tuberculose

Module 6 : Poliomyélite

Module 7 : Rougeole

Module 8 : Fièvre jaune

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

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

Les bases immunologiques de la vaccination

5

La tuberculose

Julie Milstien

Docteur en sciences

Unité des produits biologiques



Programme élargi
de vaccination



Organisation mondiale de la santé
Genève, 1993

© Organisation mondiale de la santé 1993

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

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

Table des matières

Préface	v
1. L'agent infectieux et la maladie	1
2. La réponse à l'infection naturelle	1
3. Caractéristiques des vaccins BCG	2
4. La réponse à la vaccination	3
4.1 Voie d'administration du BCG	4
4.2 Cicatrices laissées par le BCG	5
4.3 La réaction d'hypersensibilité retardée	6
4.4 Les réactions secondaires	8
4.5 Efficacité protectrice du BCG et durée de l'immunité	9
5. Pratiques courantes et calendriers vaccinaux usuels	10
6. Nouvelles perspectives (et besoins)	10
7. Conséquences pour les programmes de vaccination	11
Abréviations	11
Références	11

Préface

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

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

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

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

- aux responsables des programmes de vaccination, dont les interrogations et les inquiétudes sont à l'origine de cette collection,
- aux consultants et conseillers en vaccinologie,
- aux universitaires chargés de l'enseignement des vaccinations et aux animateurs de séminaires,
- aux étudiants en médecine et aux étudiants des professions paramédicales, qui en bénéficieront pour leur formation de base,
- aux biologistes chargés du diagnostic ou impliqués dans la recherche sur les maladies évitables par la vaccination, et
- aux chercheurs impliqués dans la recherche fondamentale visant à améliorer les vaccins ou leur administration.

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

La tuberculose

1. L'agent infectieux et la maladie

La tuberculose représente l'un des plus graves problèmes de santé dans les pays en développement et, avec l'augmentation de la prévalence de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), elle est en train de devenir également un problème important dans les pays développés (Styblo 1989).

La tuberculose est due au bacille *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* est responsable de quelque huit millions de nouveaux cas de maladie et de trois millions de décès chaque année. La plupart se produisent dans les pays en développement, bien que les pays industrialisés comptent plus de 400 000 nouveaux cas chaque année. Les mycobactéries sont également responsables de plusieurs autres formes de maladie dont la plus connue, la lèpre, est causée par *Mycobacterium leprae*. Le Tableau 1 présente de façon schématique les antigènes communs aux différentes mycobactéries. *Mycobacterium bovis*, variant de *M. tuberculosis* utilisé dans la préparation du vaccin BCG, possède les mêmes antigènes de groupe I et les mêmes antigènes spécifiques d'espèce que *M. tuberculosis*, mais ne partage pas les antigènes spécifiques d'espèce de *M. leprae*, contre lequel il fournit pourtant une protection.

La propagation interhumaine de la maladie s'effectue le plus souvent à partir de sujets infectés, qui disséminent les bacilles hautement contagieux via les gouttelettes d'expectoration. La primo-infection peut se produire à n'importe quel âge, mais dans les régions à incidence élevée et à forte densité de population, elle touche surtout les enfants. Même après la guérison, la maladie peut être réactivée et se propager à nouveau. Les facteurs qui dépriment l'immunité, comme la corticothérapie ou l'infection par le VIH, facilitent la réactivation.

La primo-infection tuberculeuse peut être asymptomatique et guérit souvent spontanément. Mais elle peut progresser localement au niveau des poumons, entraînant l'apparition de pleurésie ou de bronchopneumonie. Si elle se propage par la

Tableau 1. Relations entre les antigènes de diverses espèces de mycobactéries, étudiées par double-diffusion avec des antisérums de lapin de titre élevé (adapté d'après Stanford 1991).

	Espèce	Groupe	Groupe II	Groupe III
Croissance lente	<i>M. tuberculosis</i>	xxxx	xxxx	
	<i>M. ulcerans</i>	xxxx	xxxx	
	<i>M. intracellulare</i>	xxxx	xxxx	
Croissance rapide	<i>M. fortuitum</i>	xxxx		xxxx
	<i>M. flavescens</i>	xxxx		xxxx
	<i>M. phlei</i>	xxxx		xxxx
Non cultivable	<i>M. leprae</i>	xxxx		

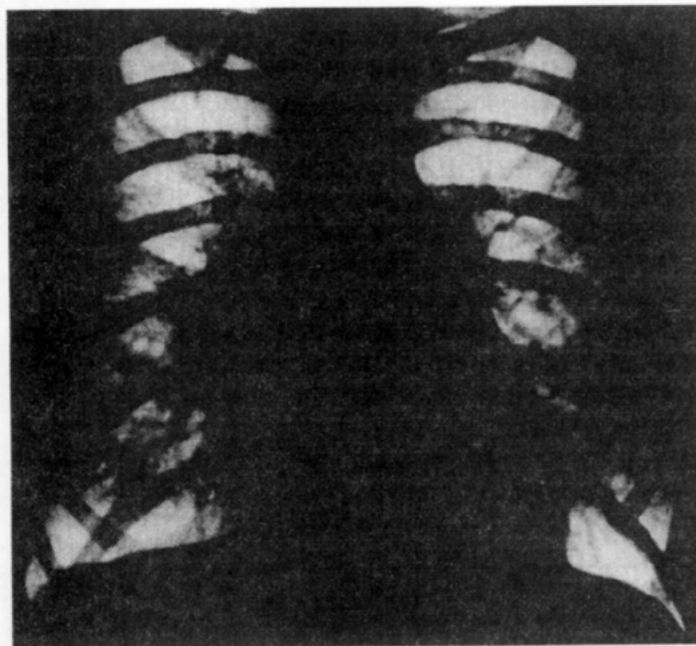
voie sanguine, elle peut affecter de nombreux organes, notamment les méninges, les os ou les viscères. La maladie peut s'accompagner d'une lymphadénopathie tuberculeuse, qui peut toutefois s'observer en l'absence de toute autre manifestation.

Le bacille comporte un certain nombre de protéines ou de polypeptides qui jouent des rôles importants dans la réponse à l'infection. Des travaux récents réalisés avec *M. tuberculosis* et *M. leprae* (Melancon-Kaplan *et al.* 1988) indiquent que la protéine de la paroi cellulaire participe de façon importante à l'induction de la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre la bactérie. En revanche, l'hypersensibilité retardée induite par le bacille de Calmette-Guérin, dérivé de *M. bovis*, est liée à un polypeptide de poids moléculaire 15 100 appelé MPB70, produit de dégradation du méthoxymycolate, protéine sécrétée par la bactérie (Harboe & Nagai 1984). Il reste encore à éclaircir le rôle des différentes protéines du bacille dans la réponse de l'hôte.

2. La réponse à l'infection naturelle

La primo-infection par le bacille tuberculeux entraîne des réactions inflammatoires de nature

Figure 1. Primo-infection tuberculeuse (poumon droit), chez une fillette de 0 ans (Grzvbowski 1983).



immunitaire et non immunitaire. Dans le cas de la tuberculose, la production d'anticorps n'a pas un rôle primordial ; les défenses immunitaires font appel à différents types de réponses et associent anticorps circulants, hypersensibilité retardée, augmentation de l'activité des macrophages et formation de granulomes inflammatoires.

La formation de granulomes est une réponse immunitaire qui limite la dissémination du microorganisme. La primo-infection tuberculeuse peut être complètement asymptomatique, avec un petit foyer inflammatoire ou «foyer de Ghon» au niveau du poumon. Un nodule de Ghon, tel qu'il est représenté Figure 1, est un granulome guéri que l'on peut trouver dans le poumon ou dans les ganglions lymphatiques qui le drainent. Il ne protège pas toujours l'hôte, et peut même parfois «dissimuler» le bacille aux autres mécanismes de défense. La réaction granulomateuse de l'hôte est renforcée par la réponse à médiation cellulaire T (voir Module 1 pour une discussion plus détaillée sur l'immunité à médiation cellulaire).

Cette réponse T au bacille tuberculeux est une réaction d'hypersensibilité retardée. En 1891, Koch avait remarqué que l'injection de bacilles tuberculeux par voie sous-cutanée à des cobayes normaux entraînait, en 10 à 15 jours, l'apparition d'un nodule au point d'injection. Le nodule s'ulcère par la suite, tandis qu'apparaît une adénite des ganglions lymphatiques régionaux. Injectée par voie sous-cutanée au même cobaye après un intervalle d'au moins trois semaines, la même dose de bacilles tuberculeux entraîne une réaction locale au point d'injection, mais l'ulcération guérit rapide-

ment et les ganglions lymphatiques régionaux ne sont pas touchés. La réaction tissulaire observée avec le test tuberculinique résulte de l'activité des médiateurs lymphocytaires et des macrophages. Une réaction inflammatoire, avec rougeur et tuméfaction, s'observe 24 à 48 heures après l'injection de l'antigène (cuti-réaction).

Selon l'état immunitaire de l'hôte, l'exposition primaire peut entraîner ou non une maladie fulminante et une exposition ultérieure peut être à l'origine d'une réactivation. Maladie fulminante et réactivation ont plus de chances de se produire quand le système immunitaire est déprimé, par exemple à la suite d'une corticothérapie, du fait de la présence d'autres maladies, de malnutrition, d'une grossesse ou d'une infection à VIH.

3. Caractéristiques des vaccins BCG

Il n'existe qu'un seul vaccin pour toutes les maladies mycobactériennes, préparé à partir de *M. bovis*. En 1908, Calmette et Guérin, à l'Institut Pasteur de Lille, ont commencé à faire subir une série de 230 passages successifs à des bactéries virulentes de *M. bovis* (Calmette et al. 1921). La souche virulente d'origine¹ a été cultivée pendant 13 ans sur un milieu de culture à base de pommes de terre dans de la bile de bœuf enrichie en glycérol. La culture de bacilles obtenue est stable, sans réversion à la virulence, mais garde une certaine infectiosité. La première vaccination d'un humain avec cette souche atténuée, appelée bacille de Calmette et Guérin (BCG) a été effectuée en 1921 à Paris (Weill-Hallé & Turpin 1925). Après son acceptation par la Ligue des Nations en 1928, le BCG a été largement utilisé.

On admet que la vaccination BCG représente l'une des mesures les plus importantes pour la prévention de la tuberculose. Elle est obligatoire dans 64 pays et elle est officiellement recommandée dans 118 autres pays et territoires (Ildirim et al. 1992). Le BCG est l'adjuvant le plus efficace que l'on connaisse chez l'homme et chez l'animal. De plus, il est bon marché, stable et sans danger.

Avec la généralisation de l'utilisation du BCG, les différents laboratoires de production ont généré un certain nombre de souches secondaires. Certaines de ces souches, dérivées de la souche d'origine par passages supplémentaires en culture, ont perdu leur contagiosité résiduelle et sont dépourvues d'efficacité. C'est pourquoi toutes les souches utilisées pour la production de vaccin doivent être accompagnées d'un dossier et approuvées par l'OMS. A

¹On ne peut parler de souches au sens strict du terme, car elles n'ont pas été clonées ; dans ce module, nous parlerons néanmoins de souches de BCG.

Tableau 2. Caractéristiques des différentes souches vaccinales de BCG (*Milstien & Gibson 1989*)

Souche de BCG	Caractéristiques de la souche				
	MPB70	Dimère	Méthoxymycolate	Mycocide B	Morphologie de la colonie
Tokyo-172	++	+	+	+	Diffusion
Moreau (Brésil)	++	+	+	ND*	ND*
Russe	++	+	+	ND*	ND*
Suédoise	++	ND*	+	ND*	ND*
Glaxo-1077	+	+/-	—	—	Pas de diffusion
Copenhague-1331	—	—	—	+	Diffusion
Pasteur-1173P ₂	—	—	—	+	Diffusion

* ND = non déterminé

présent, les quatre souches les plus utilisées proviennent des souches Pasteur-1173P₂, Tokyo-172, Copenhague-1331 et Glaxo-1077. Le Tableau 2 résume les caractéristiques de quelques-unes des souches de BCG.

L'hétérogénéité des différents isolats de *M. tuberculosis* est bien documentée (*Rado & Bates 1980*), mais l'effet de ces différences sur l'antigénicité est encore mal connu. L'échec de la vaccination BCG observée au cours de l'essai effectué dans le sud de l'Inde (*Tuberculosis Prevention Trial 1979, Tripathy 1987*) pourrait s'expliquer par le fait qu'une proportion importante de la maladie était due à des variants antigéniques. Le BCG est une souche de *M. bovis*, alors que la tuberculose est due à *M. tuberculosis*. Pourtant les études montrent que le BCG protège contre la tuberculose et contre la lèpre (due à *M. leprae*). Les données récentes confirment l'appartenance du BCG à *M. bovis* (*Collins & De Lisle 1987*), mais elles montrent également qu'il existe de grandes variations antigéniques entre les souches de BCG.

Bien que les souches de BCG utilisées actuellement soient très hétérogènes, les études effectuées n'ont pas réussi à montrer de différences significatives dans leur pouvoir protecteur (*Milstien & J Gibson 1989*).

En 1966, le Comité d'experts de l'OMS pour la standardisation des produits biologiques a établi les premières recommandations concernant le BCG (*WHO Expert Committee on Biological Standardization 1966*), lesquelles ont été modifiées par la suite (*WHO Expert Committee on Biological Standardization 1987, 1988*). Elles indiquent les procédés de production capables d'assurer le pouvoir protecteur, la sécurité et l'efficacité du BCG, et décrivent certains tests à effectuer sur les souches d'ensemencement et sur le vaccin final. Les directives de l'OMS ont été conçues pour réduire les variations entre souches de BCG obser-

vées lors des essais cliniques et des études expérimentales chez l'animal, en exigeant que chaque producteur établisse une corrélation entre les résultats des tests de laboratoire et les données cliniques d'efficacité.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de test de laboratoire qui soit réellement corrélé au pouvoir protecteur d'aucune préparation de BCG. C'est pourquoi on a évalué le pouvoir protecteur de plusieurs préparations différentes de BCG par des essais cliniques rigoureux, en utilisant des vaccins dont la sécurité et les caractéristiques *in vitro* étaient déjà connues. Une fois l'efficacité démontrée chez les humains, on effectue des mesures répétées de la sensibilité à la tuberculine et de la taille des lésions ainsi que différents tests *in vitro* sur les bactéries BCG en culture pour vérifier que les lots suivants de vaccins obtenus à partir de ces préparations sont reproduits de façon satisfaisante.

4. La réponse à la vaccination

Les essais cliniques ont confirmé que l'infection par des mycobactéries autres que

Tableau 3. Pouvoir protecteur du BCG contre diverses formes cliniques de tuberculose (*Myint et al. 1987*).

Forme clinique de tuberculose	Pouvoir protecteur (%) du BCG
Formation de complexe primaire dans le poumon	20
Complexe primaire avec extension locale	32
Lymphadénite	32
Tuberculose osseuse	39
Méningite tuberculeuse	52
Tuberculose disséminée	80

M. tuberculosis, et notamment par le BCG, peut induire une certaine protection contre la tuberculose. L'infection artificielle par le BCG se propage à partir du site d'inoculation *via* le système lymphatique jusqu'aux ganglions lymphatiques régionaux et induit une immunité équivalente à celle produite par la primo-infection naturelle avec des bacilles virulents. De même que pour l'infection tuberculeuse naturelle, la résistance est due à l'immunité à médiation cellulaire et elle est largement imputable aux macrophages activés. L'immunité induite par le BCG apparaît environ six semaines après la vaccination.

Les études expérimentales indiquent que le BCG protège le sujet vacciné en réduisant la propagation hématogène des bacilles à partir du site de la primo-infection (Smith & Harding 1979), grâce aux lymphocytes T à mémoire qu'il induit. Il ne semble pas que le BCG réduise le risque d'infection par le bacille tuberculeux, mais il prévient les formes de tuberculose liées à la diffusion hématogène du bacille (Heimbeck 1929). L'inhibition de la propagation hématogène des bacilles réduit le risque de maladie immédiate et de maladie due à la réactivation. Comme le BCG diminue le risque de maladie immédiate, mais pas le risque d'infection, son pouvoir protecteur varie selon le type d'infection tuberculeuse. Myint et al. (1987), dans des études chez les nouveau-nés, ont montré que le pouvoir protecteur (c'est à dire la protection contre la tuberculose offerte par la vaccination BCG) variait énormément selon la forme de tuberculose (Tableau 3). Dans cette étude, l'efficacité la plus élevée s'élève à 80%, et elle est significativement plus importante pour les formes graves de la maladie.

4.1 Voie d'administration du BCG

Au début, on a essayé d'administrer le BCG par voie buccale (Weill-Hallé 1925) avec la forme en suspension, et non pas la forme lyophilisée du vaccin. Mais cette voie d'administration a donné

peu de résultats, à cause des faibles doses utilisées. On a obtenu une meilleure réponse avec des doses massives (plusieurs centaines de milligrammes - pour une revue sur l'administration par voie orale, voir Rosenthal 1980, chapitre 11).

On a essayé différentes méthodes d'injection. Avec l'injecteur sous pression, la dose de BCG délivrée était inférieure à la dose complète et les lésions vaccinales variables. Quand on a essayé d'augmenter la dose, on a obtenu des ulcérations importantes et on a abandonné la méthode (Ten Dam et al. 1970). C'est pourquoi il n'est pas conseillé d'administrer le BCG par injecteur sous pression.

Introduite en 1927, l'injection intradermique représente la méthode de choix (pour une revue, voir Pontecorvo 1985). L'injection s'effectue dans la région deltoïde inférieure de façon à impliquer les ganglions lymphatiques axillaires plutôt que les ganglions lymphatiques claviculaires supérieurs. Cela permet de réduire les complications dues aux lymphadénites post-vaccinales.

La méthode dite des piqûres multiples (ou multiponcture), autre méthode d'administration du BCG, n'est pas recommandée par l'OMS. On dépose quelques gouttes de BCG au même endroit que pour l'injection intradermique et on les fait pénétrer sous la peau avec un instrument approprié à plusieurs pointes (voir le test de Heaf, section 4.3). Pour obtenir les mêmes résultats qu'avec l'injection intradermique, il faut 40 piqûres. Il faut un volume important de vaccin et la procédure est malaisée. On a essayé d'utiliser une aiguille à deux pointes (Darmanger et al. 1977) mais cette technique s'est avérée également inférieure à l'injection intradermique.

Mee et Thwaites (1977) ont étudié la réponse au test tuberculinique chez les nouveau-nés ayant reçu le BCG par injection intradermique, par piqûres multiples avec l'appareil de Heaf ou avec une aiguille à deux pointes. Ils n'ont observé qu'une différence minime dans les taux de conversion des trois groupes (Tableau 4). Cependant, d'autres

Tableau 4. Résultat du test tuberculinique 72 heures après administration du BCG selon trois méthodes différentes (Mee & Thwaites 1977).

Méthode d'administration	No. d'enfants testés	Pourcentage avec réaction tuberculinique			
		Induration < 1mm	Induration 1-4mm	Induration 5-9mm	Induration 10-14mm
Injection intradermique	39	36	15	33	15
Multiponcture avec un pistolet de Heaf à 20 pointes appliqué deux fois	42	33	12	36	19
Multiponcture avec un système à deux pointes appliqué 20 fois	45	38	11	33	18

Tableau 5. Proportion d'enfants considérés comme positifs d'après la cicatrice laissée par le BCG, selon l'âge au moment de la vaccination et l'intervalle écoulé depuis la vaccination — Malawi (Fine et al. 1989).

Age à la vaccination	Pourcentage d'enfants présentant une cicatrice due au BCG selon l'intervalle depuis la vaccination (mois)					
	0-2	3-6	1-12	13-18	19-24	25 et +
0 à 2 mois	82	88	100	96	78	43
3 à 5 mois	83	90	95	88	75	67
0 à 14 mois	83	89	95	91	70	54

auteurs (Darmanger et al. 1977) ont trouvé que la dose est plus uniforme avec l'injection intradermique, et que la sensibilité à la tuberculine est supérieure, pour un moindre coût. C'est pourquoi l'OMS recommande d'administrer le BCG par voie intradermique.

4.2 Cicatrices laissées par le BCG

L'injection intradermique du BCG vivant entraîne au bout de deux à trois semaines, chez les humains, l'apparition d'une papule et d'une induration. La papule s'ulcère au bout de six à huit semaines, puis laisse place à une cicatrice au bout de trois mois. La présence d'une telle cicatrice à l'endroit choisi (généralement le bras droit juste en-dessous de l'insertion du deltoïde) a été utilisée comme preuve de vaccination BCG antérieure. Avec l'inoculation par piqûres multiples, il se forme de nombreuses petites papules qui disparaissent plus rapidement, souvent sans laisser de traces.

Même si la taille de la cicatrice suit une courbe dose-réponse simple, de nombreux autres facteurs influencent la taille et la forme de cette cicatrice, notamment la technique d'administration du vaccin (l'administration intradermique a plus de chances de laisser une cicatrice uniforme, alors que l'administration incorrecte, c'est à dire sous-cutanée, peut ne pas laisser de cicatrice) ; les caractéristiques du receveur (la formation de chéloïde peut dépendre de la race) ; et la souche de BCG utilisée.

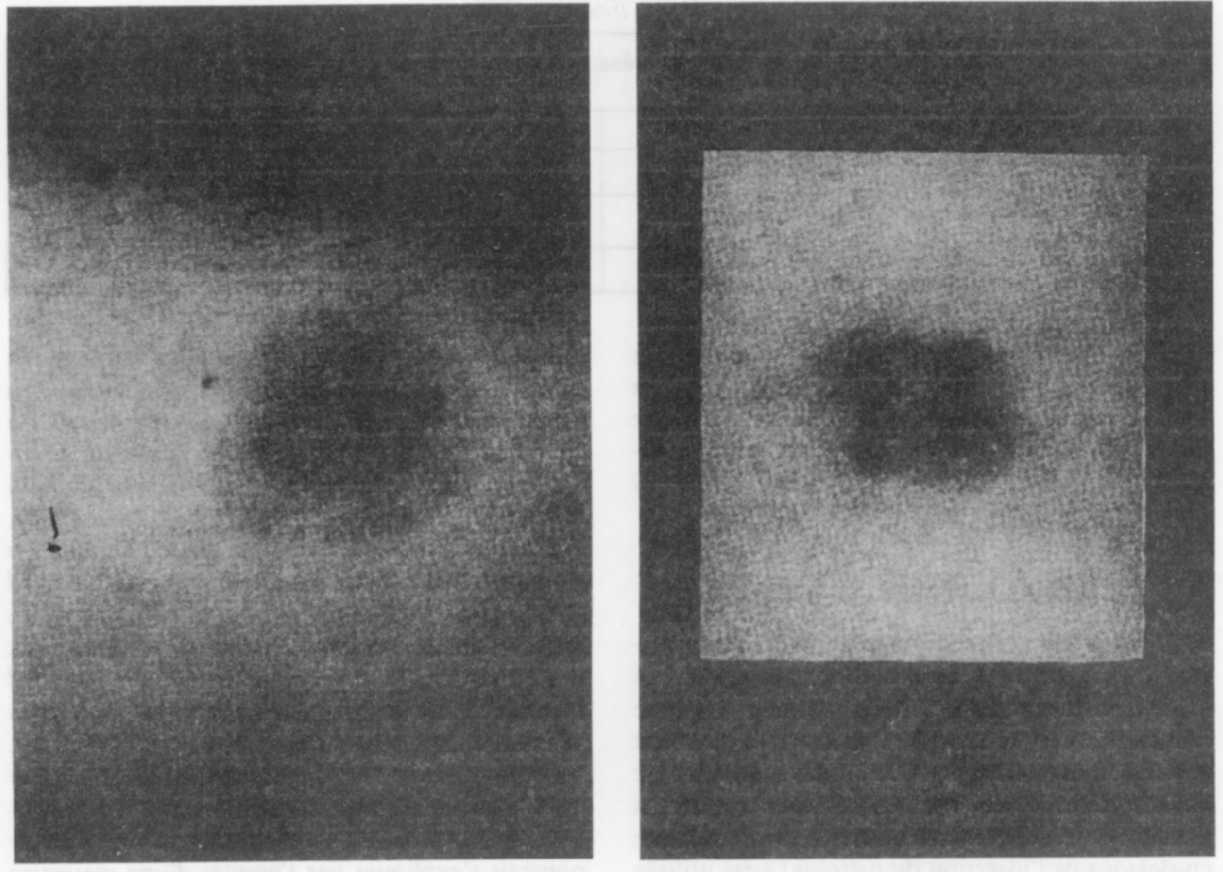
Fine et al. (1989) ont trouvé que moins de 60% des enfants vaccinés durant les premiers mois de la vie gardaient une cicatrice identifiable au bout de deux ans (Tableau 5). La recherche de la présence de cicatrices ne permet donc pas une bonne reconnaissance de la vaccination BCG effectuée très précocement. Cela peut s'expliquer par différentes raisons : utilisation de doses plus faibles chez les nourrissons, difficulté d'administrer le vaccin de façon réellement intradermique chez les tout petits, ou immaturité de la réponse immunitaire chez les tout jeunes enfants, bien que l'immunité à médiation cellulaire soit normale à la naissance.

Un certain nombre d'études ont fait état d'une bonne concordance entre les antécédents de vacci-

nation BCG bien documentés et la présence d'une cicatrice un ou deux ans après la vaccination : en Côte d'Ivoire (*Expanded Programme on Immunization 1979b*), au Lesotho (*Expanded Programme on Immunisation 1986*), au Malawi (*Expanded Programme on Immunization 1989*), au Sri Lanka (*Expanded Programme on Immunization 1982*), et au Zimbabwe (*Expanded Programme on Immunization 1983a*). D'autres études ont indiqué que la cicatrice disparaissait dans plus de 10% des cas : en Algérie (*Expanded Programme on Immunization 1979a*), au Botswana (*Expanded Programme on Immunization 1983c*), en Tunisie (*Expanded Programme on Immunization 1983b*), et en Zambie (*Expanded Programme on Immunization 1985*). La disparition de la cicatrice pourrait s'expliquer par l'emploi d'une mauvaise technique de vaccination ou par la perte d'intégrité du vaccin. On a pensé que les responsables des programmes de vaccination pourraient évaluer la compétence des équipes de vaccination d'après les variations de taille des cicatrices chez les sujets vaccinés par le BCG ; la présence de cicatrices uniformes d'une taille minimale déterminée serait le signe de la bonne administration du vaccin. Mais cela n'est peut être pas possible si l'on administre le BCG à des enfants d'âges différents ou si l'on utilise des souches différentes de BCG. On sait en effet que la taille de la cicatrice dépend de la souche vaccinale et de l'âge du sujet vacciné.

Il se peut qu'il existe une relation entre la présence d'une cicatrice et l'efficacité du vaccin. C'est peut-être parce que le vaccin n'est pas efficace s'il est administré de façon incorrecte. C'est peut-être aussi parce que, si le receveur n'est pas capable d'une réponse immunitaire adéquate, il ne se forme pas de cicatrice et la vaccination n'entraîne pas de protection. Il faut noter toutefois que les erreurs de classification de l'état vaccinal du fait de l'absence de cicatrice pourraient faire croire à une moindre efficacité du vaccin. C'est pourquoi, dans les études d'efficacité du BCG, il faudrait s'assurer de la vaccination d'après le carnet de vaccination.

Il ne faut pas oublier que le système immunitaire ne s'est pas constitué autour de l'immunisation artificielle avec des seringues et des aiguilles ;

Figure 2. Réponses aux tests tuberculiques de Mantoux (à gauche) et de Heaf (à droite) (Grist et al. 1993).

l'injection ne correspond peut-être pas au meilleur mode de présentation du BCG. Néanmoins, les données comparant la conversion tuberculique en fonction du mode de vaccination (Tableau 4) n'ont pas montré de différences significatives. Ces données ont été obtenues pour l'injection intradermique plutôt que pour l'injection sous-cutanée. Il est possible que l'injection sous-cutanée réduise le pouvoir protecteur, surtout si le bacille de Calmette et Guérin se réplique mal dans les tissus sous-cutanés profonds. Comme elle est fonction de la dose, la réponse au BCG devrait être corrélée de façon positive avec la réplique du bacille, tout au moins jusqu'à un certain stade.

On sait aussi que l'administration du vaccin par d'autres voies que la voie intradermique (c'est à dire par voie sous-cutanée ou intramusculaire) risque d'entraîner une augmentation significative des réactions locales. Quand on injecte le vaccin par voie intradermique, on peut calibrer la dose injectée d'après la taille de la papule qui se forme, ce qui pourrait jouer un rôle important. Cette évaluation grossière peut être faussée si le vaccin n'est pas injecté correctement ou s'il existe des fuites au niveau de la seringue. Il serait possible alors d'administrer sans s'en rendre compte des doses plus importantes de BCG. C'est pourquoi il vaudrait mieux utiliser des seringues contenant juste la dose indiquée.

Tableau 6. Réponse des nourrissons à la cuti-réaction et taille de la cicatrice vaccinale en fonction de la dose de BCG (Narain et al. 1978).

Dose de BCG	Nombre d'enfants	Réponse moyenne en mm	
		Cuti-réaction	Cicatrice
Placebo	73	3,7	—
0,01 mg de BCG	70	13,5	3,7
0,10 mg de BCG	74	15,1	4,8

4.3 La réaction d'hypersensibilité retardée

Généralement, l'hypersensibilité retardée se mesure non pas par l'injection de BCG chez le sujet vacciné (ou éventuellement exposé à la tuberculine), mais avec un dérivé protéique purifié (DPP) du bacille tuberculeux. La «tuberculine» désigne une préparation de *M. tuberculosis*. Le DPP, dérivé protéique purifié, peut être un extrait purifié de tuberculine ou provenir d'autres mycobactéries,

comme *M. bovis*. Ainsi, la détection d'une réaction tuberculique au DPP n'est pas forcément corrélée à l'existence d'une réponse au BCG ou à *M. tuberculosis*.

On utilise généralement le test de Mantoux pour mesurer la réaction d'hypersensibilité retardée. Les autres tests par multiponcture, comme le test de Heaf, sont utiles pour le dépistage des sujets déjà exposés au bacille tuberculeux. Ces tests diffèrent par la concentration de tuberculine utilisée, son mode d'administration au patient, et la méthode de lecture des résultats.

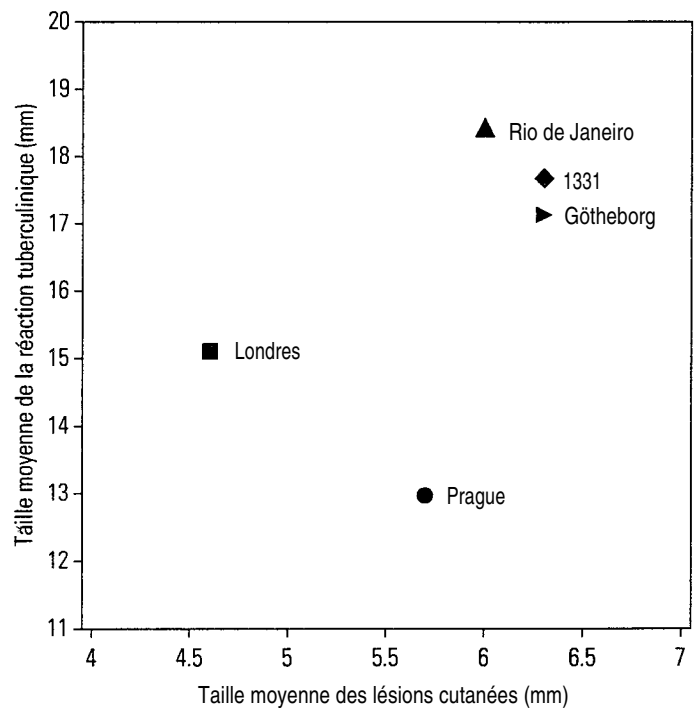
Dans le *test de Mantoux*, on injecte par voie intradermique 0,1 ml de solution de DPP contenant 5 UT (unités de tuberculine) à la face antérieure du tiers supérieur de l'avant-bras. On lit les résultats au bout de 48 à 72 heures en mesurant la zone d'induration : la réaction est considérée comme positive quand le diamètre d'induration atteint au moins 5 mm.

Dans le *test de Heaf*, on dépose une goutte de DPP non dilué (100 000 UI/ml) que l'on étale avec une baguette de verre sur l'avant-bras ; on fait ensuite pénétrer dans l'épiderme environ 50 UI, avec une bague à six pointes. On lit les résultats au bout de cinq à sept jours ; on les classe de 1 à 4 en fonction de l'apparition des papules à l'endroit des piqûres. Les degrés de 2 à 4 sont considérés comme positifs. Avec le test de Heaf, il faut une quantité relativement importante de tuberculine et les résultats ne sont pas quantitatifs.

La Figure 2 montre les réponses aux tests tuberculiques de Mantoux et de Heaf. Comme l'hypersensibilité induite par la protéine dénaturée (qui n'est pas identique au bacille tuberculeux vivant intact) ne correspond pas forcément tout à fait à celle induite par la mycobactérie vivante, les résultats des tests de Mantoux et de Heaf ne correspondent pas exactement à ce que l'on obtiendrait avec l'organisme infectieux lui-même. On détermine néanmoins traditionnellement le pouvoir protecteur du BCG en mesurant la sensibilité à la tuberculine induite par le vaccin chez les enfants négatifs à la tuberculine avant la vaccination. Ce test permet un bon contrôle de la qualité des différents lots du même vaccin et de la technique des vaccinateurs. En règle générale, il ne permet pas de comparer les vaccins venant de différents producteurs.

La réaction tuberculique est directement proportionnelle à la dose, de même que la taille de la cicatrice. C'est ce qu'illustre une étude, présentée dans le Tableau 6, réalisée en Inde chez des nouveau-nés (Narain et al. 1978). On peut voir que la relation entre la dose et la réaction tuberculique est indépendante de la relation entre la dose et la formation de la cicatrice. C'est probablement parce

Figure 3. Taille moyenne des réactions tuberculiques et des lésions cutanées, 8 à 10 semaines après la vaccination, pour 4 souches vaccinales de BCG différentes (Vallishayee et al. 1974).

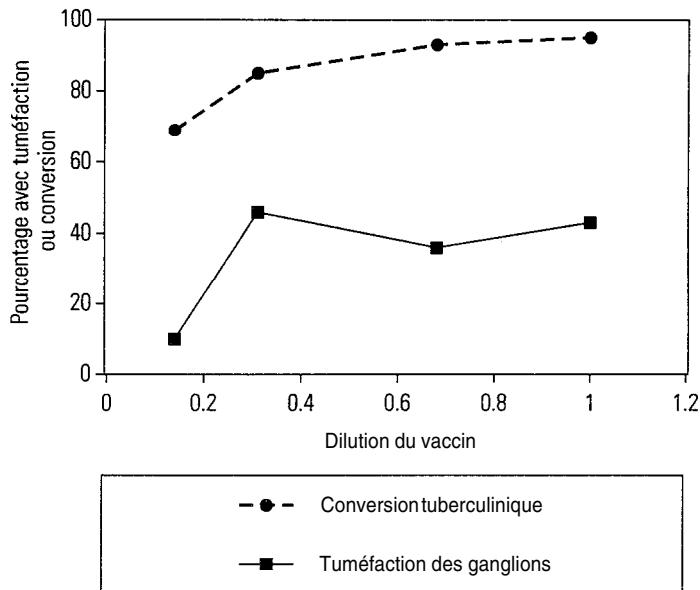


que la cicatrice (en supposant que la même technique d'administration standard a été utilisée partout) est le reflet de la masse totale de bacille (vivant ou mort) administrée, tandis que la réaction tuberculique ne dépend que des bacilles viables. Vallishayee et al. (1974) ont observé, en utilisant un certain nombre de vaccins différents, que les variations dans la taille moyenne de la réaction tuberculique ne sont pas nécessairement corrélées à la taille de la lésion cutanée (Figure 3).

Edwards et al. (1953) ont trouvé qu'en diminuant de moitié la dose de vaccin, on diminuait à la fois la réaction tuberculique et la taille de la cicatrice d'environ 1 mm ; mais si l'on utilise un vaccin BCG contenant une large proportion de bactéries mortes, on diminue moins la taille de la cicatrice que la sensibilité à la tuberculine. Ainsi ; dans la réaction d'hypersensibilité, le pouvoir immunogène des microorganismes tués et de leurs dérivés est plus faible que celui du BCG vivant (Tuberculosis Program, Public Health Service, USA, 1955).

On suppose que les mêmes mécanismes sous-tendent l'hypersensibilité retardée et l'effet protecteur ; mais ces deux propriétés ne sont pas exactement corrélées. Ladefoged et al. (1970) ont trouvé que la souche Tokyo de BCG qui entraîne une hypersensibilité retardée importante, a un pouvoir protecteur plus faible, en termes de dose protectrice minimale, dans le système modèle utilisant

Figure 4. Conversion tuberculique et tuméfaction des ganglions en fonction de la dose, avec la souche Copenhague (Oehme & Siegle-Joos 1976).



le campagnol. Cependant, d'après les données disponibles, il semble que la souche Tokyo ait une efficacité satisfaisante chez les humains (Milstien & Gibson 1989).

La relation entre l'hypersensibilité retardée et l'effet protecteur a été étudiée chez les humains. Comstock (1971) a analysé les données des essais disponibles et conclu que «l'absence de corrélation est évidente et souligne l'inanité des tentatives de prédiction (de l'effet protecteur) d'après les taux de conversion (notamment l'hypersensibilité de type retardé).» Hart et al. (1967) ont étudié cette relation sur la population de l'essai du British Medical Research Council (*Fourth Report to the Medical Research Council 1972*). Après avoir classé les sujets vaccinés d'après leur degré de sensibilité à la tuberculine après vaccination, ils n'ont trouvé aucune différence dans l'efficacité vaccinale. Ils ont conclu que «avec les vaccins tuberculeux qui possèdent une grande efficacité, le degré de protection conféré est indépendant du degré de sensibilité cutanée à la tuberculine induite par la vaccination.»

Après avoir analysé les données disponibles, Fine et Rodrigues (1990) ont conclu à l'absence de corrélation entre la conversion tuberculique post-vaccinale et la protection induite par le BCG chez les humains.

De plus, la perte de sensibilité à la tuberculine et la perte de l'immunité protectrice avec le temps ne semblent pas suivre des cinétiques parallèles (Fine et al. 1986), d'après les données de l'étude du British Medical Research Council (*Fourth Report to the Medical Research Council 1972*) et de l'essai

réalisé en Inde du Sud (*Tuberculosis Prevention Trial 1979*). Fine et al. (1986) font remarquer que même en l'absence de corrélation avec la protection, le contrôle de la conversion tuberculique attribuable au vaccin peut se justifier lors des essais, pour s'assurer qu'on a bien administré un BCG viable.

4.4 Les réactions secondaires

Comme le BCG est un vaccin vivant atténué, on peut s'attendre à ce que son utilisation entraîne occasionnellement des complications. Des effets systémiques ont été observés suite à l'administration du BCG, notamment des lymphadénites régionales, des infections systémiques à BCG (bécégites) et des tuberculoses osseuses. Certains auteurs pensent que le BCG n'induit pas de réponse immunitaire protectrice s'il n'entraîne pas une certaine lymphadénite (Gheorghiu et al. 1978).

Bien que l'efficacité vaccinale (mesurée par la réaction d'hypersensibilité retardée) et l'innocuité du vaccin (mesurée par l'incidence des réactions secondaires telles que les lymphadénites) soient toutes deux liées à la dose, les pentes des courbes dose-réponse diffèrent selon les souches de vaccins BCG. L'acceptabilité des souches vaccinales de BCG dépend des pentes relatives de ces deux courbes. Pour les souches qui entraînent le plus couramment des lymphadénites (tuméfaction des ganglions), il peut être difficile de déterminer la dose correspondant à une bonne efficacité et à une faible réactogénicité. La Figure 4 montre cette courbe pour la souche Copenhague.

Les caractéristiques de l'hôte affectent également l'incidence des effets secondaires. Les principaux facteurs de l'hôte susceptibles d'influencer les réactions secondaires au BCG au cours des programmes de vaccination sont l'âge (l'incidence des adénites est beaucoup plus élevée chez les nouveau-nés que chez les enfants plus âgés) et l'état immunitaire, le risque de réactions généralisées (et peut-être de réactions locales) étant augmenté chez les sujets souffrant d'un déficit immunitaire grave touchant les cellules T.

Dans la pratique, le principal risque de problèmes est lié au déficit des cellules T secondaire à l'infection par le VIH, lequel se manifeste rarement avant plusieurs mois chez les enfants infectés à la naissance. Une étude récente (Lallemant Le Cœur et al. 1991) au cours de laquelle des nouveau-nés infectés périnatalement ont été suivis pendant 36 mois, a confirmé l'absence d'augmentation du risque d'effets secondaires. Comme il existe en revanche un risque d'infection généralisée à BCG chez les patients souffrant de syndromes d'immuno-déficience (Gonzalez et al. 1989), notamment à la

suite d'infection par le VIH, l'OMS recommande de ne pas administrer le BCG aux nourrissons présentant un sida symptomatique (*Special Programme on AIDS and Expanded Programme on Immunization 1987*) :

Dans les pays où l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) représente un problème, il faut effectuer les vaccinations avec les antigènes du PEV selon le calendrier habituel. Cela s'applique aussi bien aux sujets ayant une infection à VIH asymptomatique. Il faut effectuer les vaccinations - à l'exception de la vaccination BCG - chez les sujets non vaccinés ayant un sida déclaré (symptomatiques) et vivant dans les pays où les maladies cibles du PEV représentent un risque important.

Les responsables du PEV doivent donc tenter d'administrer le BCG le plus tôt possible après la naissance, avant l'apparition du sida symptomatique.

4.5 Efficacité protectrice du BCG et durée e l'immunité

La meilleure méthode pour déterminer le pouvoir protecteur d'un vaccin est d'effectuer des études prospectives, randomisée en double aveugle contre placebo. Ces études sont difficiles et coûteuses, et il y en a eu peu de réalisées. Pour évaluer l'efficacité de la vaccination BCG chez les nourrissons et/ou chez les enfants, l'OMS a récemment financé deux types d'études peu coûteuses : des études cas-témoins (*Smith 1982, 1987*) et des études cas-contacts (*Ten Dam 1987*).

Ces études ont été analysées récemment par Milstien et Gibson (1989), qui en ont conclu que l'efficacité des vaccins BCG modernes est de l'ordre de 60% à 90% pour la tuberculose généralisée et pour la méningite tuberculeuse chez les jeunes enfants ; mais elle est un peu plus faible pour les

autres formes de primo-infection tuberculeuse. Dans les conditions des essais, aucune préparation de BCG n'a paru plus efficace que les autres. Il n'y a donc pas de raison de choisir une préparation ou un producteur particulier sur la base de l'efficacité protectrice. Une étude récente cas-témoins appariés, effectuée à Bangkok (*Sirinavin et al. 1991*) a montré que l'efficacité de la vaccination BCG néonatale était, après ajustement, de 83%. Cette étude a confirmé la thèse selon laquelle les variations observées dans l'efficacité de la vaccination BCG néonatale dépendent de la précision du diagnostic de tuberculose, de la forme de la maladie, du temps écoulé depuis la vaccination et de l'exposition familiale à la tuberculose. Il faudrait mettre au point un test *in vitro* capable de déterminer à l'avance l'induction, chez le sujet vacciné, d'une réponse immunitaire lui permettant de résister à l'infection ou à la dissémination de *M. tuberculosis*.

En dépit des difficultés d'interprétation des données, plusieurs études ont montré que l'efficacité du BCG est plus élevée chez les sujets très jeunes, et qu'elle diminue avec l'âge au moment de la vaccination (*Fine et al. 1986, Tuberculosis Prevention Trial 1979*). On considère généralement la tuberculose comme une maladie du sujet âgé, bien que la primo-infection concerne le jeune enfant, alors que la vaccination BCG s'adresse aux enfants de moins d'un an, et surtout aux nouveau-nés. C'est pourquoi il est difficile d'évaluer l'impact des programmes de vaccination BCG. Cependant, quand on a arrêté de vacciner les nouveau-nés en Suède, l'incidence de la maladie chez les nourrissons a été multipliée par six (*Romanus 1987*).

Plusieurs publications suggèrent que la protection contre la tuberculose fournie par le BCG est fonction de l'importance relative de la maladie due à la réactivation endogène par rapport à la réinfection exogène. Le BCG protège contre la dissémination hématogène de la maladie (*Fine 1988, Ten Dam 1984*). D'après cette hypothèse, on peut supposer que la protection sera plus importante contre la tuberculose miliaire et contre la méningite tuberculeuse que contre la tuberculose pulmonaire (*Smith 1987*) (voir Tableau 3).

Certaines études indiquent que la protection due à l'immunité à médiation cellulaire induite par le BCG est de longue durée. L'essai du Medical Research Council au Royaume-Uni (*Fourth Report to the Medical Research Council 1972*) a montré que le niveau de protection était encore de 70% à 80% du niveau initial dix ans après la vaccination BCG chez des adolescents (Tableau 7).

Dans le cadre d'une étude réalisée à Chicago (*Rosenthal et al. 1961*), des sujets ayant reçu le BCG ont été suivis pendant 23 ans. L'efficacité protectrice a été évaluée à 75% quand le vaccin

Tableau 7. Efficacité sur 15 ans du BCG administré dans le cadre de l'essai du Medical Research Council (*Fourth Report to the Medical Research Council 1972*).

Temps écoulé depuis la vaccination BCG (années)	Pouvoir protecteur	
	% observé	% du pouvoir protecteur initial
0	81	100
2,5	87	107
5	79	86
7,5	68	84
10 à 15	59	73

était administré aux enfants de moins de trois mois. Ces données suggèrent qu'il n'est peut-être pas nécessaire d'administrer une dose de rappel pour maintenir l'immunité induite par le BCG. Si le BCG ne manifeste d'efficacité reproductible que lorsqu'il est administré aux nourrissons, il n'est peut-être pas indiqué d'injecter une dose de rappel, que l'immunité disparaisse ou non. Une étude cas-témoin récente effectuée en Australie (*Patel et al. 1992*) a montré que la vaccination des enfants de 12 à 14 ans n'avait qu'une efficacité protectrice modeste. Il faudrait étudier l'intérêt des vaccinations de rappel. En effet, on ne connaît toujours pas leur efficacité.

5. Pratiques courantes et calendriers vaccinaux usuels

La plupart des pays (sauf les Etats-Unis d'Amérique et les Pays-Bas) recommandent l'utilisation du BCG. Le calendrier vaccinal varie d'un pays à l'autre. L'OMS recommande une dose à la naissance ou lors du premier contact du nourrisson avec le système de santé. Certains pays suivent d'autres calendriers, les différences provenant la plupart du temps des différences d'interprétation des données disponibles.

La protection conférée par le BCG contre l'infection par *M. tuberculosis* dépend d'un certain nombre de facteurs. Parmi ceux-ci figurent la souche vaccinale, la dose et le mode de présentation du microorganisme, et les caractéristiques du receveur, notamment son âge, les maladies et les vaccinations concomitantes et son état nutritionnel.

Le rôle de l'âge du receveur dans la réponse immunitaire au BCG a été discuté dans la section 4. Même si le système immunitaire est légèrement immature à la naissance, les études chez les nouveau-nés montrent que le BCG est efficace quand il est administré à la naissance (*Cartwright 1978, Myint et al. 1987*).

Il est probable que la réponse au BCG soit influencée par des facteurs ethniques. La fréquence et la sévérité de certaines réactions secondaires au BCG varient en effet selon les groupes ethniques (*Lotte et al. 1984*). Par exemple, les sujets d'origine suédoise et finnoise présentent un risque beaucoup plus élevé de développer une ostéite à BCG, même si l'on tient compte des variations dans l'utilisation des différentes préparations de BCG (*Böttiger et al. 1982*). Il existe des preuves convaincantes d'une forte association entre le risque de réactions cutanées locales (chéloïdes) et le groupe ethnique (*Lotte et al. 1984*). On sait par

ailleurs que les composants de la réponse T sont sous contrôle génétique.

On a rapporté (*Fourth Report to the Medical Research Council 1972*) que l'efficacité du vaccin BCG variait avec l'état nutritionnel de la population. Cependant, *Mehta et al. (1976)* ont signalé que le déficit nutritionnel n'était pas responsable du mauvais développement de l'immunité. On sait cependant que la malnutrition très sévère (degré trois) entraîne une involution du thymus, une diminution du nombre de lymphocytes et de ce fait une diminution de l'immunité à médiation cellulaire.

On possède certaines données sur l'effet négatif de la malnutrition sur la conversion tuberculique après vaccination BCG (*Chandra 1983, Epstein 1990*). Il est probable que l'état nutritionnel affecte la réponse immunitaire à médiation cellulaire, mais la réponse au BCG est complexe et implique probablement de nombreux facteurs, entre autres le statut nutritionnel, et dont le rôle relatif peut être difficile à évaluer.

6. Nouvelles perspectives (et besoins)

Les discussions ci-dessus soulignent les besoins en ce qui concerne la vaccinologie BCG. Ils sont résumés ci-dessous, par ordre décroissant de probabilité d'être satisfaits :

- La diminution du nombre de préparations de BCG. A l'heure actuelle, il existe de nombreuses préparations, mais elles ne sont pas forcément bien caractérisées en termes de réponse et de réactogénicité à la tuberculine. On tente, essentiellement par les adjudications de l'Unicef, de diminuer ce nombre, en imposant des normes de réponse et de réactogénicité tuberculique. Les responsables des programmes peuvent également y contribuer lorsqu'ils assurent la continuité de l'approvisionnement en BCG et en décourageant la prolifération des souches dans la production locale.
- Développement d'un test *in vitro* qui soit corrélé à l'immunité antituberculeuse chez les humains. Avec les progrès dans la connaissance de la structure du bacille *M. tuberculosis* et des composantes de la réponse immunitaire, cette possibilité semble de plus en plus réalisable.
- La mise au point d'un vaccin défini en termes de structure moléculaire, que l'on puisse tester de façon quantitative. Pour qu'un tel vaccin soit possible, il faut compléter les études

sur la structure moléculaire du microorganisme et sur la réponse immunitaire cellulaire.

- La mise au point d'un vaccin efficace contre les réinfections exogènes, c'est à dire capable d'empêcher l'implantation de nouveaux bacilles tuberculeux d'origine exogène. Il faudra probablement pour cela un vaccin actif au niveau des voies respiratoires. C'est la condition pour obtenir un vaccin véritablement protecteur.

7. Conséquences pour les programmes de vaccination

D'après les meilleures données disponibles, l'effet protecteur du BCG est maximum quand le vaccin est administré aux nourrissons, parce qu'on induit ainsi une réponse immunitaire avant que l'enfant ait pu être infecté.

Comme l'immunité à médiation cellulaire dure toute la vie, il n'est pas forcément intéressant d'effectuer un rappel, même si l'on augmente ainsi la sensibilité à la tuberculine. Comme la vaccination BCG précoce est efficace dans la prévention des formes les plus dangereuses de tuberculose (formes miliaires et méningites tuberculeuses), il faut s'efforcer d'obtenir une couverture BCG importante chez les nourrissons.

Le Comité consultatif du PEV a émis les recommandations suivantes (*Expanded Programme on Immunization 1991*) :

Il faut administrer le BCG aux nouveau-nés pour les protéger contre les formes les plus graves de tuberculose infantile. Il faut continuer à l'administrer le plus tôt possible après la naissance dans toutes les populations exposées au risque d'infection tuberculeuse . . . Il faut commencer ou continuer les recherches sur l'efficacité à long terme du BCG lorsqu'il est administré dans les premiers mois de la vie . . .

Dans les programmes usuels de vaccination, le BCG est souvent administré en même temps que les vaccins contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche et la poliomyélite. Ces antigènes n'interfèrent pas avec la réponse immunitaire induite par le BCG.

Lorsqu'ils ne sont pas administrés simultanément, il vaut mieux laisser un intervalle d'un mois entre l'administration du BCG et l'administration du vaccin rougeoleux et des vaccins similaires comme le vaccin ourlien (*Ajjan 1986*). On pense en effet que certains vaccins, comme les vaccins

rougeoleux ou ourlien, pourraient temporairement déprimer la réponse à médiation cellulaire. On ne connaît pas encore l'importance du rôle de la réponse T dans l'induction de l'immunité contre la rougeole et contre les oreillons avec ces deux vaccins à virus vivants. C'est pour éviter tout risque d'interférence qu'a été faite la recommandation précédente.

Dans la pratique médicale courante, on réalise le test tuberculinique au moment de l'administration des vaccins diphtérie-tétanos-coqueluche, polio oral et rougeoleux. Cependant, le test de Mantoux peut être négatif durant la période d'incubation de la tuberculose, de la rougeole, de la grippe, de la varicelle, des oreillons et quand le sujet est sous corticothérapie. On en ignore l'effet sur la réponse au BCG. Comme ce sont des effecteurs de la réponse cellulaire T, il se peut que la réponse au BCG soit diminuée.

La question a été posée de savoir quand on pourrait arrêter la vaccination BCG sans conséquences néfastes. L'OMS est en train de considérer ce problème. On pense que des recommandations seront adoptées en ce qui concerne l'utilisation du BCG dans les pays où les formes graves de tuberculose ne représentent pas un problème majeur de santé publique.

Abréviations

BCG	Bacille de Calmette et Guérin, vaccin contre la tuberculose
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
UI	Unités internationales
DPP	Dérivé protéique purifié
UT	Unités tuberculiques

Références

- Abiprojo N. Calibration study on BCG vaccine in Indonesia, Dissertation. London: London School of Hygiene and Tropical Medicine; 1981.
- Ajjan N. Vaccination. Lyon: Institut Mérieux; 1986:72.
- Böttiger M, Romanus V, Deverdiere C, et al. Osteitis and other complications caused by generalized BCGitis. *Acta Paediatr Scand* 1982;71:471-478.
- Calmette A, Boquet A, Nègre L. Contribution à l'étude du bacille tuberculeux bilité. *Ann Inst Pasteur* 1921;35:561-570.
- Cartwright JD. BCG vaccination in the newborn. *SA mediese tydskrif* 8 July 1978;65-67.
- Chandra RK. Nutrition, immunity and infection: present knowledge and future directions. *Lancet* 1983;1:688-691.

- Collins DM, De Lisle GW. BCG identification by DNA restriction fragment patterns. *J Gen Microbiol* 1987;133:1431-1434.
- Comstock GW. Vaccination against tuberculosis: controlled trials of BCG vaccination by the US Public Health Service. In: *Proceedings Int Conf Application of Vaccines against Viral, Rickettsial and Bacterial Diseases of Man*. PAHO Sci Publ 1971;226:378-381.
- Darmanger AM, Nekzad SM, Kuis M, et al. BCG vaccination by bifurcated needle in a pilot vaccination programme. *Bull WHO* 1977;55:49-59.
- Edwards LB, Palmer CE, Magnus K. BCG vaccination. *WHO Monogr Ser* 1953;12:125-141.
- Epstein PR. BCG vaccination and nutrition. *Lancet* 1990;2:1536-1537.
- Expanded Programme on Immunization. Results of evaluation of the vaccination coverage of Young children in two health sectors, Algeria. *Wkly Epidemiol Rec* 1979a;54:193-194.
- Expanded Programme on Immunization. Results of evaluation of vaccine coverage in an urban district of Ivory Coast, April 1979. *Wkly Epidemiol Rec* 1979b;54:221-223.
- Expanded Programme on Immunization. Evaluation of immunization coverage, Sri Lanka. *Wkly Epidemiol Rec* 1982;57:241-242.
- Expanded Programme on Immunization. Coverage evaluation, Zimbabwe. *Wkly Epidemiol Rec* 1983a;58:45-47.
- Expanded Programme on Immunization and Diarrhoeal Diseases Control Programme. Evaluation of immunization coverage and morbidity and mortality from diarrheal diseases, Tunisia. *Wkly Epidemiol Rec* 1983b;58:125-127.
- Expanded Programme on Immunization. Programme review, Botswana. *Wkly Epidemiol Rec* 1983c;58:361-363.
- Expanded Programme on Immunization. Programme review, Zambia. *Wkly Epidemiol Rec* 1985;60:56-58.
- Expanded Programme on Immunization. Programme review, Lesotho. *Wkly Epidemiol Rec* 1986;61: 233-234.
- Expanded Programme on Immunization. Programme review, Malawi. *Wkly Epidemiol Rec* 1989;64:339-343.
- Expanded Programme on Immunization. Global Advisory Group (1990) — Part II. *Wkly Epidemiol Rec* 1991;66:9-12.
- Fine PEM. BCG vaccination against tuberculosis and leprosy. *Br Med Bull* 1988;44:691-703.
- Fine PEM, Ponnighaus JM, Maine NP. The relationship between delayed type hypersensitivity and protective immunity induced by mycobacterial vaccines in man. *Symposium on the Immunology of Leprosy, Oslo, Norway*. *Lepr Rev* 1986;57(Suppl2):275-283.
- Fine PEM, Ponnighaus JM, Maine NP. The distribution and implications of BCG scars in Northern Malawi. *Bull WHO* 1989;67:35-42.
- Fine PEM, Rodrigues LC. Modern vaccines. *Mycobacterial diseases*. *Lancet* 1990;1:1016-1020.
- Fourth Report to the Medical Research Council by its Tuberculosis Vaccines Clinical Trials Committee. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Bull WHO* 1972;46:371-385.
- Gheorghiu M, Carnus H, Lagrange P, et al. Potency and suppurative adenitis in BCG vaccination. *Dev Biol Stand* 1978;41:79-84.
- Gonzalez B, Moreno S, Burdach R, et al. Clinical presentation of *Bacillus Calmette-Guérin* infections in patients with immunodeficiency syndromes. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:210-206.
- Grist NR, Ho-Yen DO, Walker E, et al. Tuberculosis. In: *Diseases of Infection*. Oxford: Oxford University Press; 1993:229-241.
- Grzybowski S. Tuberculosis and its prevention. St Louis: Warren H. Green;1983.
- Harboe M, Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Respir Dis* 1984;126:444-452.
- Hart A, Sutherland I, Thomas J. The immunity conferred by effective BCG and vole bacillus vaccines in relation to individual variations in tuberculin sensitivity and to technical variations in the vaccines. *Tubercle* 1967;48:201-210.
- Heimbeck J. Sur la vaccination préventive de la tuberculose par injection sous-cutanée de BCG chez les élèves infirmières de l'hôpital Ullevål à Oslo (Norvège). *Ann Inst Pasteur* 1929;43:1229-1232.
- Ildirim I, Sapan N, Cavucoglu B. Comparison of BCG vaccination at birth and a third month of life. *Arch Dis Child* 1992;67:80-82.
- Ladefoged A, Bunch-Christensen K, Guld J. The protective effect in bank voles of some strains of BCG. *Bull WHO* 1970;43:71-90.
- Lallemant Le Coeur S, Lallemant M, Cheyner D, et al. *Bacillus Calmette-Guérin* immunization in infants born to HIV-1-seropositive mothers. *AIDS* 1991;5:195-199.
- Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, et al. BCG complications: estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. *Adv Tub Res* 1984;21:107-193.
- Mee J, Thwaites M. BCG for neonates: a comparison of three methods. *J Trop Med Hyg* 1977;80:43-44.
- Mehta KP, Merchant SM, Korde U. Environmental influence on immunity due to BCG vaccination. *Indian J Pediatr* 1976;13:525-532.
- Melancon-Kaplan J, Hunter SW, McNeil M, et al. Immunological significance of *Mycobacterium Leprae* cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1917-1921.
- Milstien JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccines by the World Health Organization: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bull WHO* 1989;68:93-108.
- Myint TT, Win H, Aye HH, et al. Case-control study on evaluation of BCG vaccination of newborn in Rangoon Burma *Ann Trop Paediatr* 1987;7:159-166.

- Narain R, Krishnaswamy KV, Vallishayee RS, et al. Assessment of BCG vaccination in newborn babies. *Indian J Med Res* 1978;68:403-412.
- Oehme J, Siegle-Joos H. Dosis-Wirkungs-Beziehung des BCG-Impfstoffes für Neugeborene. *Dtsch med Wochenschr* 1976;101:1447-1450.
- Patel A, Schofield F, Siskind V, et al. Case-control evaluation of a school-age BCG vaccination programme in subtropical Australia. *Bull WHO* 1991;69:425-433.
- Pontecorvo M. Vaccines and Procedures. In: *Vaccines Sera Immunoglobulins*. Torino: Minerva Medica;1985:18-19.
- Rado TA, Bates JH. Mycobacteriophage structure and function: a review. *Adv Tub Res (Karger: Basel)* 1980;20:64-91.
- Romanus V. Tuberculosis in bacillus Calmette-Guerin immunized and nonimmunized children in Sweden: a ten-year evaluation following cessation of general bacillus Calmette-Guerin immunization of the newborn in 1975. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:272-280.
- Rosenthal SR. *BCG Vaccine: Tuberculosis-Cancer*. Littleton, Mass: PSG Publishing Company;1980.
- Rosenthal SR, Loewinsohn E, Graham ML, et al., BCG vaccination against tuberculosis in Chicago: a twenty-year study statistically analyzed. *Pediatrics* 1961;28:622-641.
- Sirinavin S, Chotpitayasunondh T, Suwanjutha S, et al. Protective efficacy of neonatal Bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:359-365.
- Smith DW, Harding GE. Are current strains of BCG protective in animals? Document TRI/SCG/79.6.1. Geneva: World Health Organization, 1979.
- Smith PG. Retrospective assessment of the effectiveness of BCG vaccination against tuberculosis using the case-control method. *Tubercle* 1982;62:23-35.
- Smith PG. Case-control studies of the efficacy of BCG against tuberculosis. In: *Proc XXXV Work Conf Tub Resp Dis, Singapore, 1986*. Tokyo: Prof Postgrad Service;1987:73-79.
- Special Programme on AIDS and Expanded Programme on Immunization. Joint Statement. Consultation on human immunodeficiency virus (HIV) and routine childhood immunization. *Wkly Epidemiol Rec* 1987;62: 297-299.
- Stanford JL. Improving on BCG. *APMIS (Copenhagen)* 1991;9:103-113.
- Styblo K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. *Rev Infect Dis* 1989;11:S339-S346.
- Ten Dam HG. Research on BCG vaccination. *Adv Tub Res* 1984;21:79-106.
- Ten Dam HG. Contact studies on the effectiveness of BCG vaccination in children. In: *Proc XXXV Work Conf Tub Resp Dis, Singapore, 1986*. Tokyo: Prof Postgrad Service;1987:80-86.
- Ten Dam HG, Fillastre C, Conge G, et al. The use of jet injectors in BCG vaccination. *Bull WHO* 1970;43:707-720.
- Tripathy SP. Fifteen-year follow-up of the Indian BCG prevention trial. In: *Proc XXXV Work Conf Tub Resp Dis, Singapore, 1986*. Tokyo: Prof Postgrad Service;1987:69-72.
- Tuberculosis Prevention Trial. Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report. *Bull WHO* 1979;57:819-827.
- Tuberculosis Program, Public Health Service, USA. *Bull WHO* 1955;12:47-62.
- Vallishayee RS, Shashidhara AN, Bunch-Christensen K, et al. Tuberculin sensitivity and skin lesions in children after vaccination with 11 different BCG strains. *Bull WHO* 1974;51:489-494.
- Weill-Hallé B, Turpin R. Premiers essais de vaccination antituberculeuse de l'enfant par le bacille Calmette-Guérin (BCG). *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1925;49:1589.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for Dried BCG Vaccine. *WHO Tech Rep Ser* 1966;329.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for Dried BCG Vaccine (Revised 1985). *WHO Tech Rep Ser* 1987;745.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for Dried BCG Vaccine (Amendment 1987). *WHO Tech Rep Ser* 1988;771.

