

Thermostabilité des vaccins

A. Galazka, J. Milstien, M. Zaffran



**PROGRAMME MONDIAL DES
VACCINS ET VACCINATIONS**



Organisation mondiale de la Santé
Genève
1998

**Le Programme mondial des Vaccins et Vaccinations
tient à remercier les donateurs dont l'appui financier à objet
non désigné a permis la production du présent document.**

*Numéro de référence pour les commandes : WHO/GPV/98.07
Imprimé en janvier 1999*

Ce document est disponible sur Internet à :
<http://www.who.ch/gpv-documents/>

Pour commander des exemplaires, s'adresser à :
Organisation mondiale de la Santé
Programme mondial des Vaccins et Vaccinations
Ch-1211 Genève 27, Suisse

• *Télécopie* : +22 791 4193/4192 • *Courrier électronique* : gpv@who.ch •

© Organisation mondiale de la Santé 1998

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation. S'il peut être commenté, résumé ou cité sans aucune restriction, il ne saurait cependant être reproduit ni traduit, partiellement ou en totalité, pour la vente ou à des fins commerciales.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

Table des matières

Introduction	1
Ire Partie : Questions concernant la conservation des vaccins	2
1. Importance de la chaîne du froid	2
2. Pastilles de contrôle des vaccins ; avenir de la chaîne du froid	3
3. Méthodes pour déterminer l'effet de la chaleur ou du froid sur l'activité d'un vaccin	4
Iie Partie : Analyse de la stabilité des vaccins — vaccins couramment utilisés dans les programmes de vaccination	6
4. Anatoxines diphtérique et tétanique	6
5. Vaccin contre l'hépatite B	10
6. Vaccin antirougeoleux	13
7. Vaccin antamaryl	16
8. Vaccin anticoquelucheux	18
9. Vaccin BCG	25
10. Vaccin antipoliomyélitique	31
IIIe Partie : Analyse de la stabilité des vaccins — autres vaccins viraux	41
11. Vaccin antipoliomyélitique inactivé	41
12. Vaccin antiourlien	42
13. Vaccin antirubéoleux	42
14. Vaccin contre l'hépatite A	42
15. Vaccin contre l'encéphalite japonaise	43
16. Vaccin antirabique	43
IVe Partie : Analyse de la stabilité des vaccins — autres vaccins bactériens	44
17. Vaccin antiméningococcique polysidique	44
18. Vaccin anti- <i>Haemophilus influenzae</i> type B	45
19. Vaccins antityphoïdiques	45
20. Vaccin anticholérique	45
Ve Partie : Conclusions	47
VIe Partie : Références	49
Annexe : Tableaux résumant la stabilité des vaccins	61

Introduction

Les services de vaccination des pays en développement permettent d'éviter que, chaque année, environ 490 000 enfants ne soient atteints de paralysie poliomyélitique et que plus de trois millions ne décèdent par la rougeole, le tétanos néonatal ou la coqueluche (51). Ces résultats sont imputables en partie à la formation du personnel aux techniques adéquates de stockage et de transport des vaccins et en partie aux améliorations de la 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, bien que les pastilles de contrôle des vaccins (PCV), désormais fournies avec les vaccins antipoliomyélitiques oraux (VPO), puissent indiquer le niveau d'exposition à la chaleur de chaque flacon. Cette activité ne peut être précisée qu'au moyen d'épreuves de laboratoire coûteuses dont les résultats ne sont souvent obtenus qu'après plusieurs mois. Seul un nombre de doses important (de 2 000 pour les vaccins antipoliomyélitiques et antirougeoleux à 200 000 pour le vaccin DTC [diphtérie-tétanos-coqueluche]) justifie l'envoi des vaccins pour un nouveau contrôle (45).

La connaissance de la stabilité du vaccin, notamment le taux de perte d'activité à une température donnée, peut aider à déterminer les conditions de stockage. Le présent document actualise les informations données dans le passé sur ce sujet (54), en s'intéressant tout particulièrement à la stabilité des vaccins conservés ou transportés à températures ambiantes ou exposés au gel.

La deuxième partie du document comporte une analyse de la stabilité de chaque vaccin avec, dans une première section, ceux qui sont le plus couramment utilisés par les programmes nationaux de vaccination, en allant des plus stables, comme les anatoxines, vers les moins stables, comme le vaccin antipoliomyélitique oral. Les sections suivantes passent en revue les autres vaccins viraux et bactériens qui ne sont pas encore largement employés ou qui préviennent des maladies dont l'importance en santé publique est plutôt régionale que mondiale.

I^{re} Partie :

Questions concernant la conservation des vaccins

1. Importance de la chaîne du froid

Une attention scrupuleuse à la conservation et à la manipulation est nécessaire pour garantir l'activité optimale des vaccins. Une alimentation électrique suffisante et la réfrigération manquent souvent dans les pays en développement où, par conséquent, le stockage, la manipulation et la stabilité à la chaleur des vaccins sont des sujets de grande préoccupation (28). De nouveaux produits ont été mis au point pour la sécurité du transport et de la conservation tandis que l'on a augmenté la fiabilité de l'approvisionnement par l'introduction de techniques de gestion améliorée. Une formation poussée permet de veiller à ce que toute personne impliquée dans la chaîne du froid en connaisse tous les aspects. Toutefois, les évaluations réalisées en Inde (47, 139), en Malaisie (62), au Népal (46), en République-Unie de Tanzanie (131) et en Tunisie (43) ont montré qu'il y avait toujours des points faibles dans l'exécution de la chaîne du froid et qu'il fallait y consacrer plus d'attention, notamment dans les établissements périphériques.

Dans les pays tempérés, on accorde peu d'attention à l'importance de maintenir la chaîne du froid. Bien que la réfrigération soit souvent considérée comme acquise, des erreurs dans la manipulation des vaccins peuvent se produire beaucoup plus fréquemment qu'on ne le croit en général (21) et l'on a signalé des baisses importantes de l'activité vaccinale suite à des conditions de délivrance et de stockage qui n'étaient pas satisfaisantes (84, 89).

Les défaillances les plus courantes au niveau de la chaîne du froid signalées dans les pays développés sont les suivantes : températures élevées au cours du stockage ou du transport (21, 27, 90, 107, 138) ; exposition des vaccins adsorbés à des températures de congélation (64, 76, 107) ; réfrigérateurs sans thermomètre ; irrégularité de la prise et de l'enregistrement des températures (17, 21, 39, 63, 68, 90, 138, 142) ; stockage de médicaments, de boissons, d'aliments et d'échantillons pathologiques avec les vaccins (21, 90) et conservation des vaccins inutilisés après des séances de vaccination à température ambiante (39).

On a découvert une forte prévalence d'erreurs évitables dans la zone métropolitaine de Los Angeles (Etats-Unis d'Amérique), où l'on accordait peu d'attention à la surveillance des pratiques de conservation des vaccins (21). Des études en Hongrie (93), en Pologne (94) et au Royaume-Uni de Grande Bretagne et d'Irlande du Nord (23) ont montré des faiblesses importantes de la chaîne du froid au cours du transport des vaccins entre les fabricants ou les points de distribution centrale et les

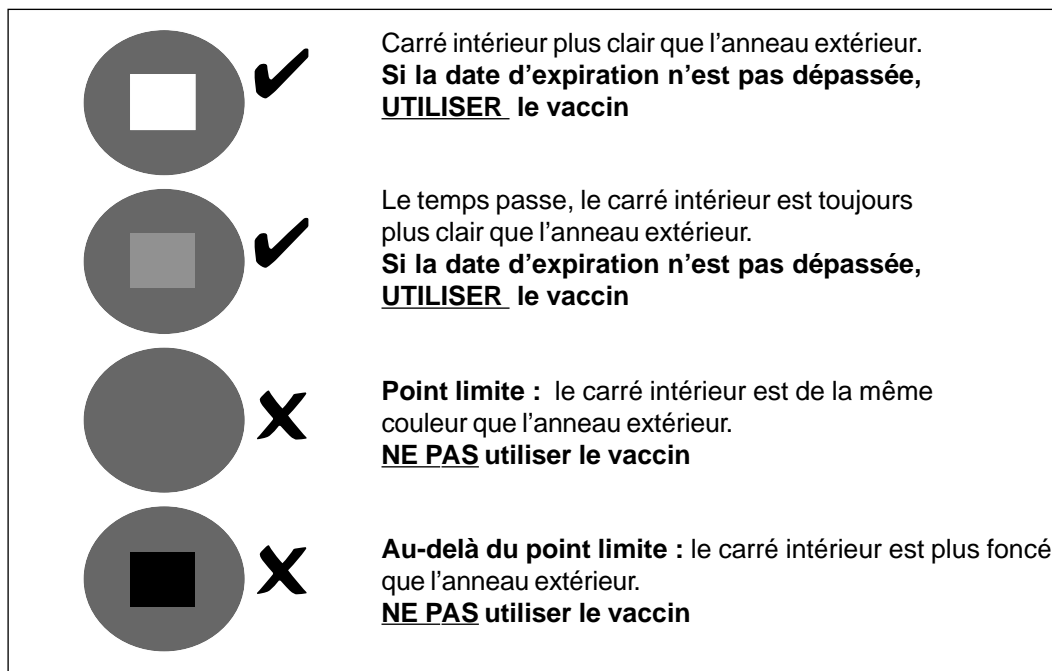
établissements de soins. En Hongrie, les contrôles de la chaîne du froid ont révélé qu'au moins 6 % des DTC et 30 % des BCG étaient exposés à une chaleur excessive lorsqu'ils étaient transportés par les services postaux au cours de l'été ; en hiver, 38 % des expéditions étaient exposés au gel (93). En Pologne, la conservation des vaccins était en général satisfaisante dans les dépôts centraux et les centres sanitaires d'épidémiologie, mais c'était moins le cas dans les services de consultations externes et les centres de santé. Les conditions de transport des vaccins n'étaient absolument pas satisfaisantes à aucun niveau (94).

2. Pastilles de contrôle des vaccins ; avenir de la chaîne du froid

Les pastilles de contrôle des vaccins, qui mesurent l'exposition à la chaleur, sont des étiquettes, sensibles au temps écoulé et à la température, que l'on fixe sur les flacons de vaccin au moment de la fabrication. Au moyen d'une modification progressive de leur couleur, ils avertissent les agents de santé et les responsables du stockage quand un vaccin a été exposé à une chaleur excessive et ne doit plus être utilisé. Elles sont conçues pour réagir en fonction de la courbe de stabilité thermique du vaccin avec une marge de sécurité (160). Elles répondent soit aux normes de l'OMS concernant la thermostabilité, soit aux données fournies par le fabricant lorsque celles-ci sont plus strictes.

L'information donnée par une PCV est simple. Si le carré intérieur est d'une couleur plus claire que l'anneau de référence externe, on peut alors employer le vaccin. Si ce carré est de la même couleur ou plus foncé que l'anneau extérieur, le vaccin ne peut plus être utilisé (Fig. 1).

Figure 1 : Pastille de contrôle des vaccins avec les quatre stades de l'exposition



Les PCV sont apparues pour la première fois sur les flacons de VPO fournis à l'UNICEF et à l'OMS durant le premier trimestre de 1996. Elles font partie des spécifications des appels d'offre lancés par ces deux organisations. Les pays qui se fournissent directement en vaccins commencent également à exiger les PCV sur les VPO.

Lorsque l'administration et les infrastructures du Programme élargi de Vaccination (PEV) ont été établies, il était impossible de vérifier si les vaccins conservaient une activité suffisante pendant la distribution. Par conséquent, au cours des 20 dernières années, on a bâti et entretenu les systèmes de chaîne du froid sur la base d'un seul ensemble de règles gouvernant la manipulation des vaccins dans le monde entier, sans tenir compte spécifiquement des conditions locales ou des types de vaccin. Cette approche avait le mérite de la simplicité : elle facilitait la compréhension, la mise en œuvre et l'administration de la chaîne du froid et elle présentait un objectif concret à réaliser et ne prêtant pas à controverses.

Toutefois, elle a suscité l'apparition graduelle d'une vision dogmatique de la chaîne du froid et a empêché les agents de santé de profiter au mieux de la thermostabilité réelle des différents vaccins.

Les programmes de vaccination ont désormais évolué et ils se sont diversifiés : la stratégie opérationnelle atteint des régions difficiles d'accès, des campagnes spéciales couvrent de grandes populations cibles et l'on consent un effort majeur pour atteindre chaque enfant non protégé. Les vaccins sont devenus plus stables et une thermostabilité améliorée, voire intégrale, fait partie des perspectives clairement établies. Dans ces conditions, la conception dogmatique de la chaîne du froid entraîne un gaspillage des ressources et impose aux opérations sur le terrain des restrictions inutiles.

On peut considérer la PCV comme le catalyseur d'un changement très nécessaire des stratégies de distribution des vaccins par la chaîne du froid. Au bout du compte, elle devrait permettre aux programmes de vaccination d'exploiter le plus possible la stabilité de chaque vaccin, de minimiser les coûts de distribution et d'accroître la flexibilité de la manipulation des vaccins sur le terrain, contribuant ainsi à rendre les opérations plus efficaces.

3. Méthodes pour déterminer l'effet de la chaleur ou du froid sur l'activité d'un vaccin

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 variées. L'épreuve de dégradation accélérée (EDA) est plus pratique. Elle consiste à soumettre des échantillons à une gamme de températures élevées qui provoquent une dénaturation importante et facilement détectable dans un laps de temps relativement court. On mesure le taux de cette dégradation puis on l'extrapole pour les températures plus basses auxquelles les vaccins sont conservés, conformément à l'équation d'Arrhenius (144). La précision avec laquelle l'EDA permet de prévoir les taux de dégradation varie considérablement en fonction des gammes de températures utilisées, du nombre d'échantillons testés et du 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 viral des vaccins vivants atténués antipoliomyélitiques, antirougeoleux et antirubéoleux fait appel à une technique simple. Par contre, les tests biologiques des vaccins bactériens et des anatoxines implique des épreuves difficiles qui nécessitent un grand nombre d'animaux, l'activité du vaccin étant exprimée en unités fixées arbitrairement ou en doses réelles assurant une protection de 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'elle ne se soit produite nettement (120).

Les vaccins et les anatoxines sont faits de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'hydrates de carbone qui subissent des modifications lorsqu'ils sont exposés à la chaleur. La température de conservation conditionne le taux de dégradation d'un vaccin : plus elle est élevée, plus la dégradation est rapide et forte, mais les taux peuvent varier considérablement. Cependant, le taux de dégradation (b) n'est pas l'unique facteur déterminant l'activité résiduelle (Y_t) d'un vaccin : le temps (T) pendant lequel le vaccin est conservé à une température donnée et son activité initiale (Y_0) interviennent également.

La relation entre ces trois facteurs s'exprime au moyen de la formule suivante :

$$Y_t = Y_0 - bT$$

L'utilité de cette formule est limitée par le fait que nombre de ceux qui sont engagés dans un programme de vaccination ne connaissent pas forcément 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 quoi faire de ce vaccin.

Le présent document examine les informations actuelles concernant la stabilité des vaccins de façon à pouvoir les utiliser avec le maximum d'efficacité.

II^e Partie :

Analyse de la stabilité des vaccins — vaccins couramment utilisés dans les programmes de vaccination

4. Anatoxines diphtérique et tétanique

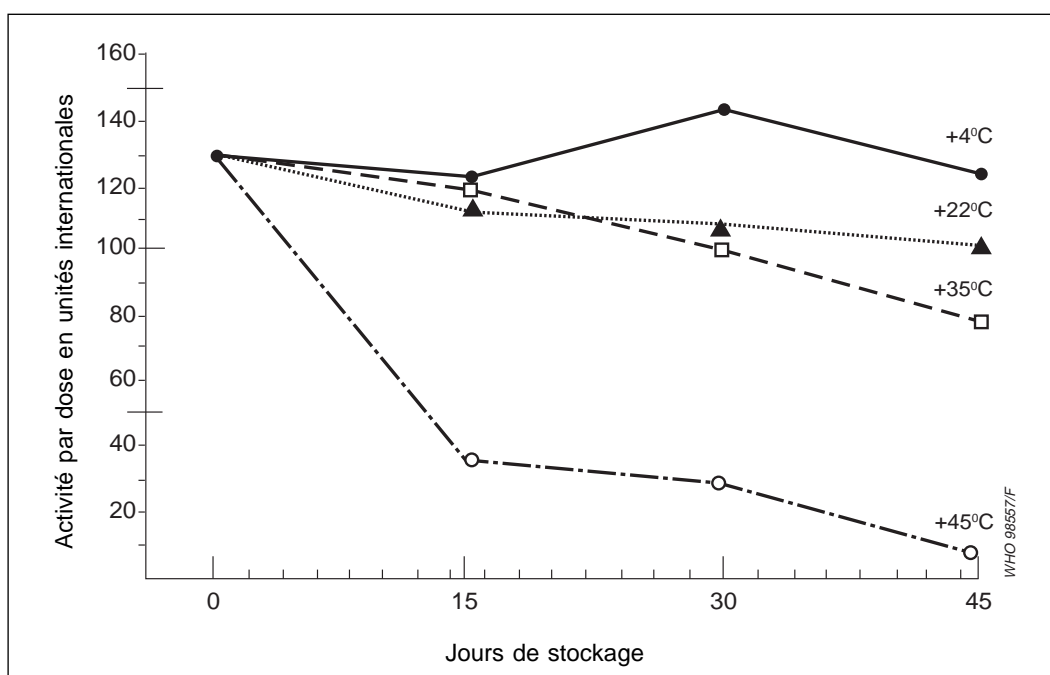
4.1 *Exposition à des températures élevées*

Les anatoxines diphtérique et tétanique adsorbées sous forme monovalente ou en tant que composantes des vaccins associés sont les plus stables des vaccins couramment utilisés dans les programmes nationaux de vaccination. Étant des protéines, elles obéissent en général aux principes de thermostabilité gouvernant cette classe de produits. 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, non pas à cause des propriétés des anatoxines elles-mêmes mais à cause de l'adjuvant à base d'aluminium dont la structure particulière en gel est détruite par la congélation.

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 (80, 83, 130, 146). 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 à 24 mois). Pour les vaccins associés, les composantes coqueluche ou poliomyélite constituent les 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 (130), pendant 6 à 12 mois à 24 °C (136) et pendant 2 à 6 mois à 37 °C (83, 136, 146). D'autres études ont néanmoins montré une plus grande labilité à la chaleur. 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 (146). Pour d'autres vaccins DTC, la composante anatoxine tétanique, stockée pendant 45 jours à 22 °C et 35 °C, a présenté une détérioration encore plus marquée, la baisse quotidienne s'établissant à environ 0,5 % et 1 % respectivement (Fig. 2) (85).

Figure 2 : Activité de la composante tétanique d'un DTC stocké pendant 45 jours à différentes températures.



Source : Kumar V et al. (85)

Les composantes anatoxines diphtérique et tétanique de certains vaccins DTC peuvent résister plusieurs semaines à une exposition à des températures supérieures à 37 °C. 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 baisse de l'activité de l'ordre de 40 % (83) 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 (85).

A des températures supérieures à 45 °C, la dégradation de l'activité de l'anatoxine est accélérée et elle ne suit plus l'équation d'Arrhenius à cause de la dénaturation des protéines. Après une exposition à 53 °C pendant quatre et huit jours, l'anatoxine tétanique adsorbée monovalente soumise à l'EDA a perdu respectivement 17 % et 47 % de son activité initiale (Tableau 1) (30). Les anatoxines tétanique et diphtérique exposées à 60 °C sont détruites en trois à cinq heures (30, 135).

Tableau 1 : Activité de l'anatoxine tétanique adsorbée en fonction du temps de stockage et de la température

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

Source : Cohen H, van Ramshorst JD, Tasman A (30).

Les anatoxines diphtérique et tétanique adsorbées testées en Pologne (2) ont montré une baisse de l'activité de 50 % (demi-vie) après 4 à 8 jours à 53 - 55 °C, après 80 à 90 jours à 45 °C, après 10 à 13 mois à 35 - 37 °C et après 5 à 7 ans à 20 - 25 °C. Les auteurs en ont conclu que les anatoxines laissées par erreur à température ambiante pendant deux semaines au maximum pouvaient être utilisées chez l'homme en toute sécurité sans qu'il soit besoin de contrôler leur activité.

4.2 Exposition à la congélation

La réduction de l'activité de l'anatoxine tétanique varie légèrement avec la composition du vaccin. Pour deux vaccins DTC sur cinq conservés 12 heures à - 30 °C, cette composante a montré une baisse d'activité d'environ 30 % tandis qu'il n'y a pas eu une telle diminution pour les vaccins conservés entre - 5 °C et - 10 °C. Toutefois, on a noté une diminution de l'activité de la composante anatoxine tétanique dans les vaccins DT adsorbés après congélation aux températures de - 5 °C et - 30 °C (42). Cette différence est sans aucun doute attribuable à l'élément coqueluche des vaccins DTC lorsque l'activité est testée au moyen d'essais sur l'animal. L'intérêt de cette observation pour l'efficacité protectrice n'est pas connu.

L'anatoxine tétanique monovalente congelée, utilisée chez de jeunes recrues, en particulier de l'anatoxine congelée à quatre reprises, a suscité une réponse moyenne plus faible et une proportion moindre de titres élevés par rapport au produit non congelé, bien que la signification de cette différence ne soit pas éclaircie. Néanmoins, toutes les personnes vaccinées au moyen d'anatoxines congelées développent des niveaux protecteurs d'anticorps antitétaniques. La congélation ne semble pas affecter l'immunogénicité de l'anatoxine non adsorbée (qui reste toutefois moins immunogène que le produit adsorbé) (Tableau 2) (106).

Tableau 2 : Réponse immunitaire chez des recrues vaccinées au moyen d'une anatoxine tétanique adsorbée congelée et non congelée.

Anatoxine	Traitement	10 jours après la première dose		10 jours après la deuxième dose		10 jours après la troisième dose	
		% > 0,01 UI/ml	Moyenne en UI/ml	% >0.01 UI/ml	Moyenne en UI/ml	% >0.01 UI/ml	Moyenne en UI/ml
Adsorbée sur AIPO ₄	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

Source : Menon PS et al. (106)

4.3 Modifications physiques de l'adjuvant d'aluminium à hautes et basses températures

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 néanmoins 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, 163, 164), 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. Les 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 (163, 164).

Le point de congélation pour les vaccins DTC adsorbés se situe entre - 5 °C et - 10 °C (42). Le temps nécessaire pour congeler le DTC, le DT ou l'anatoxine tétanique dépend du nombre de doses dans le flacon (plus le volume est grand, plus cela demande du temps) et de la température : 110 à 130 minutes à - 10 °C, 25 à 45 minutes à - 20 °C et 9 à 11 minutes à - 70 °C. A cause du phénomène de surfusion, la température dans les flacons de DTC, de DT ou d'anatoxine tétanique tombe bien en dessous de zéro (- 1,6 à - 2,6 °C lorsque la température extérieure se situe entre - 4,2 °C et - 4,6 °C) avant d'atteindre le seuil d'instabilité. Au moment de la solidification, la température du vaccin remonte à la valeur scientifique du point de congélation qui se situe aux alentours de - 0,5 °C (50, 103).

Les vaccins adsorbés, sous forme monovalente ou en association, changent d'aspect après que la congélation a induit des modifications de structure et de morphologie de l'adsorbant. Les modifications de pH et la conservation à des températures élevées n'influent pas sur la structure du gel d'alumine, mais la congélation provoque de profondes modifications morphologiques visibles au microscope électronique (3).

La formation de particules agrégées, floconneuses ou granuleuses accélère la vitesse de sédimentation (3, 6, 42, 106, 130), et elles ne forment pas une suspension homogène même en agitant vigoureusement le flacon. La taille de ces particules semble augmenter avec la répétition du cycle congélation/décongélation (106).

Les 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 (42). Cette épreuve est facile à exécuter : après avoir agité vigoureusement le récipient du vaccin, on cherche d'éventuelles modifications physiques dans le contenu puis on contrôle l'ampleur de la sédimentation après 30 minutes. La présence de particules granuleuses ou floconneuses lorsque le vaccin est secoué ou la formation d'un dépôt sédimentaire surmonté d'une colonne de liquide clair dans les 30 minutes indique que le vaccin a été congelé. La réalisation de cette épreuve nécessite néanmoins une certaine expérience. De surcroît, tous les vaccins ne subissent pas des modifications physiques après congélation.

Les vaccins DTC, DT, l'anatoxine tétanique et le vaccin contre l'hépatite B, susceptibles d'avoir été congelés, seront examinés pour voir s'ils présentent des modifications physiques. Si c'est le cas, il faudra les jeter. L'administration d'un vaccin non homogène peut entraîner de fortes variations dans la quantité d'antigènes inoculés ainsi qu'une réponse immunitaire diminuée ou une augmentation de l'incidence des réactions locales.

4.4 Résumé

Les anatoxines diphtérique et tétanique comptent parmi les vaccins les plus stables couramment administrés. Ils se conservent pendant des années à des températures entre 2 et 8 °C, pendant plusieurs mois à température ambiante, et pendant plusieurs semaines à 37 °C. A 45 °C, leur dégradation s'accélère et leur activité peut diminuer en l'espace de quelques semaines. A 53 °C, elles perdent leur activité en quelques jours et à 60 °C en quelques heures seulement. La congélation peut réduire l'activité des anatoxines adsorbées mais elle ne semble pas affecter cependant l'immunogénicité des produits non adsorbés. Le point de congélation des anatoxines adsorbées se situe entre - 5 °C et - 10 °C ; il ne faut jamais les congeler.

5. Vaccin contre l'hépatite B

5.1 Exposition à la chaleur et aux basses températures

Le vaccin contre l'hépatite B (HB) est une suspension liquide se composant d'un antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg) purifié et adsorbé sur un sel d'aluminium. Deux types de vaccin sont disponibles sur le marché : l'un est dérivé du plasma, l'autre est à base d'ADN recombinant. Comme pour les autres vaccins adsorbés sur des sels d'aluminium, la congélation peut provoquer des baisses importantes d'activité. Ce risque est susceptible de s'accroître au bout de la chaîne du froid, lorsque le vaccin est transporté dans des boîtes isothermes et peut se trouver en contact avec des blocs à glace. Le vaccin anti-HB doit être protégé de la congélation et il ne faut pas l'utiliser si l'on pense qu'il a été congelé. Son point de congélation se situe à - 0,5 °C environ.

A des températures comprises entre 2 et 8 °C, le vaccin anti-HB semble stable pendant de nombreuses années et l'on n'a pas établi la limite supérieure de sa durée de conservation.

Un vaccin anti-HB à base d'ADN recombinant et dérivé de la levure (Engerix-B) semble être stable aux températures élevées. Le fabricant estime que sa stabilité est de 30 jours entre 20 et 25 °C, d'une semaine à 37 °C et de 3 jours à 45 °C, avec des demi-vies correspondantes calculées à 9 mois, 31 jours et 13 jours.

On n'a pas observé de différence dans les réponses immunitaires entre des personnes en bonne santé ayant reçu un vaccin recombinant chauffé à 37 °C pendant une semaine et des sujets similaires auxquels on a administré 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 ont été semblables dans les deux cas et l'on n'a pas signalé de réactions indésirables graves (78).

Une autre étude a porté sur le vaccin recombinant administré à des volontaires sains. En utilisant des vaccins conservés à 4 °C aux fins de comparaison, il est apparu que le chauffage du vaccin à 45 °C pendant une semaine ou à 37 °C pendant un mois n'altérait pas sa réactogénicité ni sa capacité à produire des titres d'anticorps à un niveau considéré comme protecteur (145).

Cinq fabricants ont fourni des données sur la thermostabilité de leurs vaccins anti-HB lorsqu'ils sont conservés à différentes températures. Les épreuves ont porté sur des lots produits en routine : quatre produits dérivés du plasma et un vaccin recombinant (Tableau 3).

Les résultats montrent que les vaccins anti-HB conservés entre 2 et 8 °C sont tout à fait stables pour des périodes allant jusqu'à quatre ans. A des températures ambiantes comprises entre 20 et 26 °C, les vaccins de trois des fabricants ont été stables pendant au moins un an, tandis que celui d'un autre a perdu 50 % de son activité initiale en quatre mois. A des températures comprises entre 36 et 40 °C, le vaccin du cinquième fabricant a montré un niveau plus faible de thermostabilité que les autres. L'aspect physique, le pH, le contenu en merthiolate, en aluminium et en protéines, la stérilité et la toxicité anormale sont restés les mêmes pour les vaccins produits par un des fabricants et conservés pendant 24 mois à des températures allant de 2 à 36 °C.

Tableau 3 : Stabilité de cinq vaccins anti-HB d'après les essais d'immunogénicité sur l'animal

Vaccins testés	Paramètres utilisés pour tester les vaccins	Température de conservation (°C)			
		2 - 8	20 - 26	36 - 40	45
A (plasma)	Conservation maximale sans perte significative d'activité	24 mois	12 mois	3 mois	-
C (plasma)	Activité restante (%) après un laps de temps donné	100% après 24 mois	70% après 24 mois	70% après 24 mois	-
D (plasma)	Conservation maximale avec un intervalle de confiance pour l'activité relative > 1	44 mois	-	-	-
E (recombinant)	Conservation maximale avec un intervalle de confiance pour l'activité relative > 1	53 mois	12 mois	7 mois	1 mois
	Demi-vie *	-	9 mois	1 mois	3 jours
F (plasma)	Demi-vie	>3 ans	4 mois	7 jours	-

* Demi-vie : temps au bout duquel on observe une baisse de 50 % de l'activité initiale

Source : données fournies par les fabricants

5.2 Vaccins anti-HB utilisés en dehors de la chaîne du froid

Une étude a été réalisée en Chine pour évaluer si les vaccins conservés en dehors de la chaîne du froid pour des périodes allant jusqu'à trois mois pouvaient rester efficaces et être toujours administrés à des enfants à la naissance (7). Les vaccins, stockés à température ambiante, ont été administrés par les sages-femmes à 358 enfants à leur naissance. Pour le groupe témoin, le même vaccin, conservé au réfrigérateur, a été administré par des médecins de village à 232 nourrissons entre 24 et 72 heures après la naissance. Les deuxièmes et troisièmes doses ont été données avec les autres vaccins dans le cadre des services de santé périphériques, disponibles à des intervalles d'environ deux mois. Les taux de séroconversion pour l'anti-HBsAg avec les vaccins stockés réfrigérés ou non ont été de 81,6 % et 81,9 % respectivement.

Bien que le vaccin anti-HB soit extrêmement stable à la chaleur, nous ne disposons pas encore de données suffisantes pour recommander une utilisation intégralement en dehors de la chaîne du froid. Les rapports prometteurs de Chine ne donnent pas d'informations sur la gamme des températures ambiantes auxquelles les vaccins ont été exposés et utilisés par les sages-femmes. Il existe néanmoins la latitude d'élaborer une instruction permettant de sortir les vaccins de la chaîne du froid en cas d'urgence ou pour les activités périphériques de courte durée, dans la mesure où une pastille de contrôle est fixée sur chaque flacon.

5.3 Résumé

Ces informations laissent penser que le vaccin anti-HB se trouve dans la gamme supérieure de la thermostabilité, avec les anatoxines diphtérique et tétanique, parmi les vaccins couramment utilisés dans les programmes de vaccination. Il est stable jusqu'à 4 ans entre 2 et 8 °C, plusieurs mois entre 20 et 25 °C, plusieurs semaines à 37 °C et plusieurs jours à 45 °C. Comme pour les autres vaccins adsorbés sur des sels d'aluminium, sa congélation peut entraîner une baisse d'activité importante. Son point de congélation se situe à - 0,5 °C environ. Il convient donc de toujours le protéger du gel, notamment en bout de la chaîne du froid, lorsqu'il est transporté dans des boîtes isothermes en contact avec des accumulateurs de froid.

6. Vaccin antirougeoleux

6.1 Stabilité du vaccin lyophilisé

Ces dernières années, on a fait des progrès sensibles pour améliorer la thermostabilité de ce vaccin. La mise au point d'un stabilisant efficace (59, 102, 119) et la formulation de normes OMS relatives à la thermostabilité du vaccin antirougeoleux lyophilisé (152, 153) ont eu un retentissement considérable sur la qualité des vaccins antirougeoleux disponibles sur le marché.

Ces deux normes font appel à deux critères de stabilité :

- (1) Les vaccins lyophilisés doivent conserver au moins 1 000 particules virales vivantes par dose destinée à l'homme à la fin d'une durée d'incubation de 7 jours à 37 °C ;
- (2) Si, au cours de l'incubation, le titre viral a diminué, cette baisse ne doit pas dépasser 1 log₁₀ (152).

L'augmentation de la thermostabilité dans les conditions normales de travail revêt une importance particulière dans les pays en développement (65).

Le vaccin antirougeoleux sous sa forme sèche est extrêmement stable aux températures en dessous de zéro (102). Il reste actif s'il est conservé au froid et des congélations successives ne l'endommagent pas.

La dégradation thermique des vaccins antirougeoleux de seconde génération est lente (Fig. 3) (4, 100). A une température comprise entre 2 et 8 °C, ces vaccins améliorés conservent une activité minimale pendant plus de deux ans (19, 102, 119).

La stabilité des vaccins antirougeoleux actuels est grande aux températures élevées. A température ambiante (20 à 25 °C), les produits modernes ont un taux de dégradation lente d'environ 0,17 et 0,33 DICC₅₀ après deux et quatre semaines respectivement de stockage (119). Le titre infectant minimal requis persiste encore après deux à quatre mois de conservation à température ambiante (73, 102). Des vaccins antirougeoleux conservés à 25 °C pendant 7 jours ont induit la séroconversion chez 122 (92 %) des 132 enfants vaccinés (66).

On a montré que des vaccins antirougeoleux gardaient le titre infectant requis après 14 jours de stockage à 37 °C (102, 119). Les vaccins de deuxième génération ont perdu respectivement 0,39 et 0,47 log₁₀ DICC₅₀ après 7 et 14 jours de conservation à 37 °C, tout en gardant des concentrations virales résiduelles supérieures à 1 000 DICC₅₀ par dose (73). Sur l'ensemble des 30 jours d'exposition à 37 °C, le taux de dégradation a été de 0,025 log₁₀ DICC₅₀ par jour. La demi-vie était d'environ sept jours.

La thermostabilité renforcée des vaccins antirougeoleux de seconde génération s'est confirmée sur le terrain. Des études au Cameroun ont montré que ceux-ci, stockés à 37 °C pour une durée allant jusqu'à 14 jours, pouvaient induire la séroconversion chez les enfants séronégatifs (65).

A 41 °C, le processus de dégradation est rapide et se traduit par une baisse du titre de 50 % en deux jours et de 0,4 à 0,7 log₁₀ en une semaine (48, 119). On a estimé la demi-vie des vaccins antirougeoleux à 31 jours à 20 - 25 °C, à 16,6 jours à 37 °C et à 3,3 jours à 41 °C (5).

Entre 54 et 56 °C, le vaccin antirougeoleux est inactivé rapidement, perdant plus de 0,65 log₁₀ et 1,3 log₁₀ pour un et trois jours d'exposition respectivement. Le temps nécessaire pour que le titre descende à 1 000 DICC₅₀ a été d'environ 12 heures (102).

6.2 Stabilité du vaccin reconstitué

Les vaccins antirougeoleux, même ceux dotés d'une thermostabilité renforcée sous forme sèche, perdent rapidement leur activité une fois reconstitués et conservés à des températures élevées.

L'activité des vaccins antirougeoleux reconstitués à 4 °C est restée supérieure à 1 000 DICC₅₀ pendant au moins 24 heures, bien qu'ils aient subi une dégradation de 0,014 log₁₀ DICC₅₀ par heure (48). Lorsqu'un vaccin reconstitué est conservé à 26 °C, la baisse du titre peut atteindre 0,02 à 0,027 log₁₀ par heure. Le temps nécessaire pour que le titre descende à 1 000 DICC₅₀ se situe entre 16 et 24 heures (48, 102, 73).

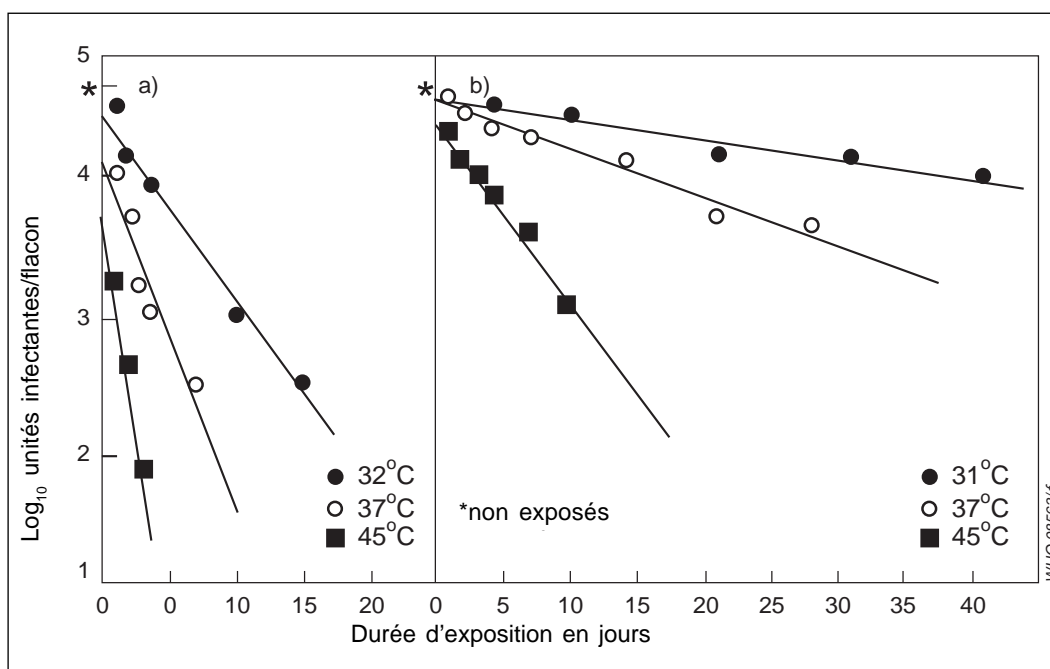
A 37 °C, le vaccin se dégrade plus rapidement : la baisse du titre atteint environ 0,1 log₁₀ par heure, ce qui donne une réduction du titre à 1 000 DICC₅₀ pouvant prendre moins de sept heures (48, 102, 119).

La reconstitution du vaccin avec un diluant chaud peut être nocive : un vaccin reconstitué avec un diluant préchauffé à 41 °C puis incubé au bain-marie à cette température a perdu la moitié de son activité de départ en une demi-heure et 0,5 à 0,7 log₁₀ en une heure (119). A 37 °C, la baisse du titre a été de 0,4 à 0,5 et de 0,8 à 1,0 log₁₀ en 3 et 6 heures respectivement (48, 119).

Les vaccins antirougeoleux reconstitués doivent être utilisés au cours de la séance de vaccination. Le vaccin antirougeoleux est produit sous forme lyophilisée (procédé de congélation - dessiccation) et doit être reconstitué extemporanément avec le diluant fourni par le fabricant. Cela rend possible des erreurs lors de la manipulation (156).

Il existe un risque sérieux lorsque le vaccin reconstitué est conservé plus de six heures, quelle que soit la température et à plus de 8 °C quelle que soit la durée de conservation. Ceci est dû à la possibilité de contamination du produit pouvant entraîner des effets secondaires graves pour les sujets vaccinés. Lors de son utilisation, le vaccin antirougeoleux doit être protégé des températures élevées et de la lumière (celle-ci pouvant inactiver le virus). Les vaccins reconstitués doivent être jetés à la fin de chaque séance de vaccination et ne doivent **JAMAIS** être gardés pour une séance ultérieure (156).

Figure 3 : Essais de stabilité accélérés à trois températures pour un vaccin de première génération (a) et de seconde génération (b)



* Valeur pour les vaccins non exposés

Sources : Allison LMC et al., Mann GF et al. (4, 100)

6.3 Résumé

Le vaccin antirougeoleux sous forme lyophilisée est très stable. Il l'est aux températures inférieures à zéro degré et des congélations successives ne l'abîment pas. Entre 2 et 8 °C, il maintient une activité minimale pendant plus de deux ans. A température ambiante (de 20 à 25 °C), le titre infectieux minimal requis se maintient pendant au moins un mois et pendant au moins une semaine à 37 °C. A 41 °C, il se dégrade rapidement, le titre baissant de 50 % en deux jours.

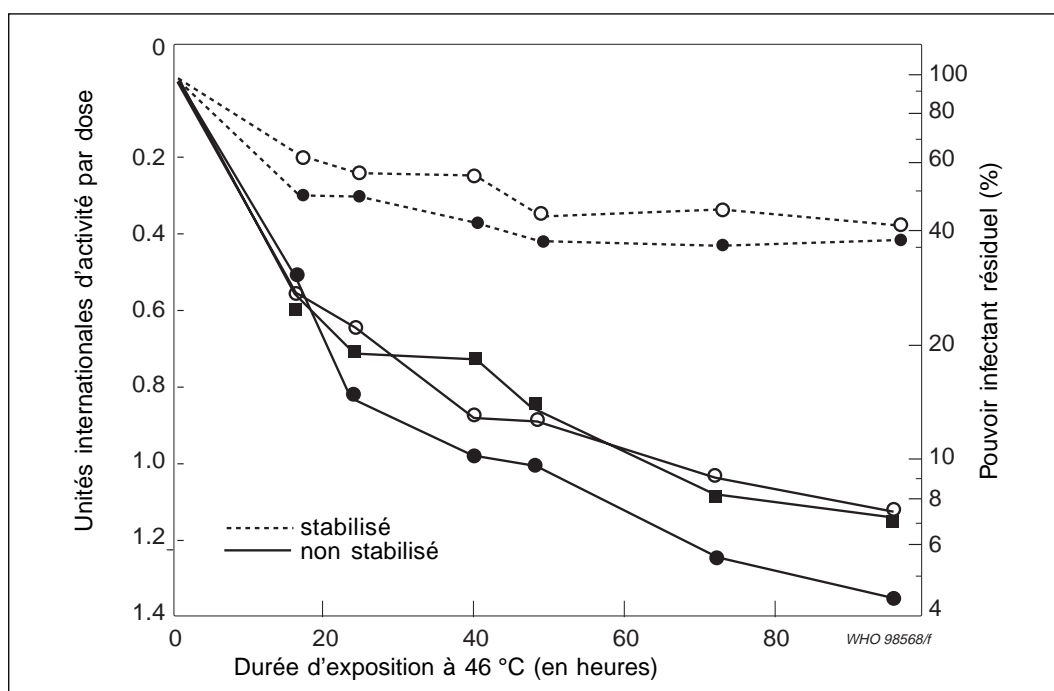
Après reconstitution, le vaccin antirougeoleux perd rapidement son activité lorsqu'il est conservé à des températures élevées. A 26 °C, le titre baisse au niveau minimal en 16 heures environ et à 37 °C en sept heures approximativement. **Il faut conserver au froid les vaccins reconstitués pendant la vaccination, les jeter à la fin de chaque séance et ne jamais les garder en vue d'une séance ultérieure.**

7. Vaccin antamaril

7.1 Stabilité du vaccin lyophilisé

La stabilité médiocre des premiers vaccins antiamarils a été préoccupante. Pour la plupart, ils perdaient de leur activité durant une période de stockage de 6 mois à -20°C ou à 5°C et, soumis à des températures élevées, ils se dégradent très rapidement (125, 133). Plusieurs fabricants ont préparé des vaccins à stabilité renforcée. Des milieux comme le lactose, le sorbitol, l'histidine et l'alanine ont amélioré considérablement la thermostabilité du vaccin 17D lyophilisé (12, 13, 133). On utilise avec succès les vaccins stabilisés sur le terrain (55, 126). La Figure 4 montre les différences de stabilité entre les anciennes et les nouvelles formulations.

Figure 4 : Diminution du pouvoir infectant de vaccins viraux antiamarils lyophilisés, stabilisés et non stabilisés, conservés à 46°C pendant quatre jours



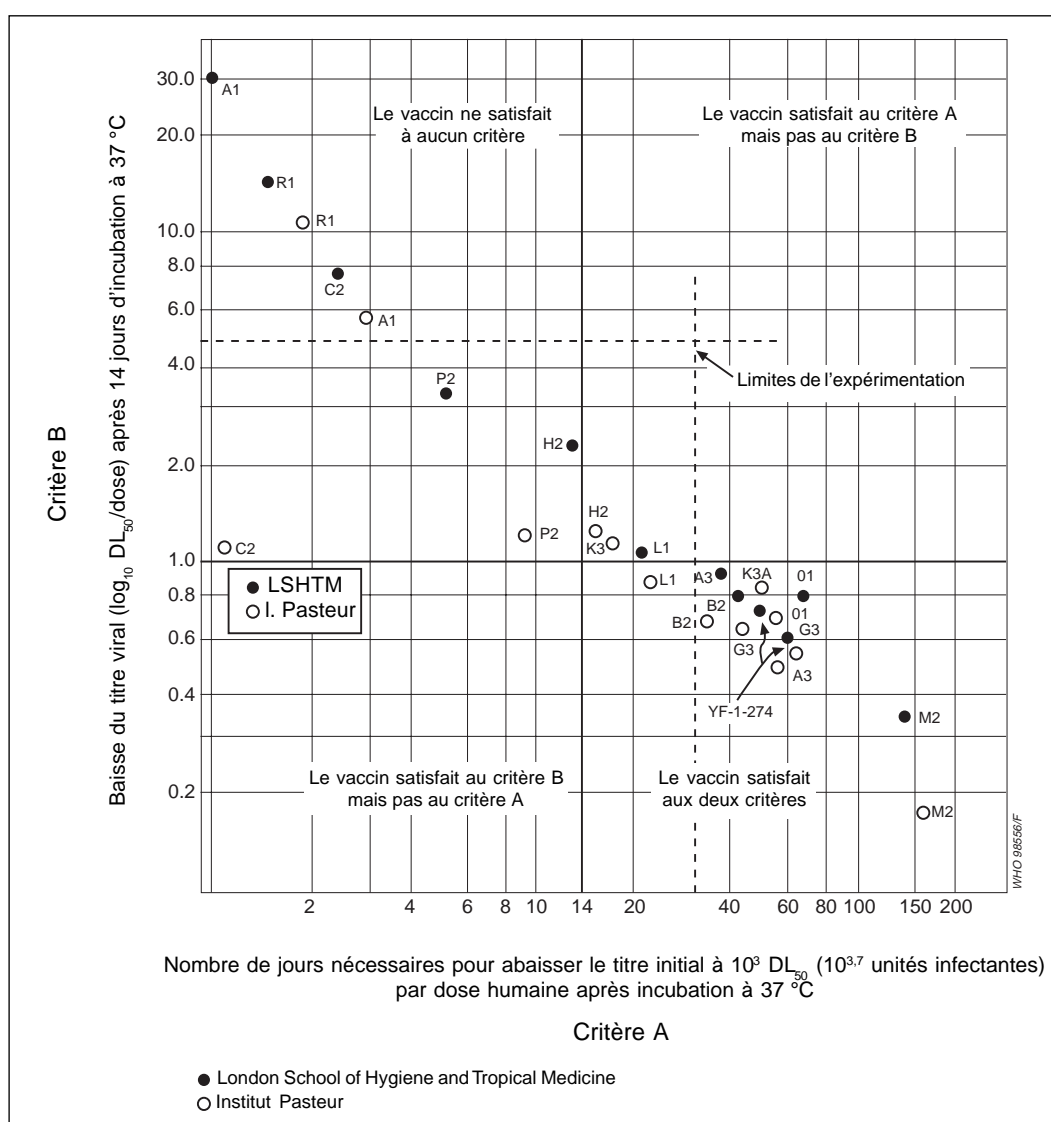
Source : Burfoot C, Yound PA et Finter NB (25)

Le vaccin antiamaril se conserve sans problème à -20°C ou à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant deux ans ou plus (25). On estime la demi-vie du pouvoir infectant entre 3 et 10 mois à température ambiante, entre 10 et 20 jours à 37°C et à environ deux jours à 46°C (25, 52). Le temps requis pour réduire le titre initial du vaccin à 1 000 unités infectantes se situe entre 2,6 et 6,1 jours à 46°C , entre 5,7 et 15,7 jours à 37°C et entre 12,4 et 26 jours à 31°C (72). On observe des réductions semblables du titre lorsqu'on garde un vaccin stabilisé continuellement à 37°C ou lorsqu'on le soumet alternativement à des températures de 37°C et 4°C (52).

En 1987, les fabricants ont fait parvenir à l'OMS une étude portant sur 11 vaccins antiamarils. Celle-ci montrait une stabilité très variable (148). Le nombre de jours requis pour réduire le titre initial à 1 000 unités infectantes, lorsque les vaccins étaient conservés à 37°C allait de 1 à 5 jours pour 4 vaccins, de 13 à 21 jours pour 2 vaccins et de 38 à 146 jours pour 5 vaccins (voir Fig. 5).

Dans la Figure 5, les vaccins apparaissant au-dessus de la ligne horizontale, qui indique la limite fixée pour la perte à $1 \log_{10}$ de virus, sont ceux qui ont subi une baisse trop importante du titre. De même, les vaccins qui apparaissent à la gauche de la ligne indiquant les 14 jours d'incubation, ont fait preuve d'une trop grande perte d'activité. Les vaccins qui apparaissent dans le quart inférieur droit répondent à la fois aux critères A et B correspondant à la norme de stabilité demandée par l'OMS. Cette norme stipule que le vaccin doit conserver $1\ 000\ DL_{50}$ pour la souris, ou son équivalent en unités formatrices de plage par dose humaine (A) et que la baisse moyenne du titre doit être inférieure à $1 \log_{10}$ après incubation pendant deux semaines à $37\ ^\circ C$ (B) (155). Tous les vaccins antiamarils produits par des fabricants approuvés par l'OMS répondent à cette norme.

Figure 5 : Classement des vaccins antiamarils 17D en fonction de la norme de thermostabilité envisagée



Source : Organisation mondiale de la Santé (148)

7.2 Stabilité du vaccin reconstitué

Lorsqu'on le garde entre 0 et 8 °C, le vaccin reconstitué conserve sa dose vaccinale minimale (1 000 unités infectantes) pendant au moins 10 jours (72). Il se dégrade rapidement cependant lorsqu'il est exposé à des températures élevées. A 37 °C, 31 °C et 27 °C, il a perdu 50 % de son pouvoir infectant après 1,5, 3,1 et 4,9 heures d'exposition (25, 72). L'utilisation d'un diluant à 37 °C entraîne une inactivation rapide du virus et la perte totale d'activité en une heure (134). L'exposition d'un vaccin reconstitué pendant une heure à 46 °C a provoqué une baisse de 0,5 log₁₀ et la diminution du pouvoir infectant a dépassé 1 log₁₀ après deux heures (25). Comparée à plusieurs diluants, comme un soluté salin, une solution tampon, la gélatine et la peptone, l'eau distillée a été la plus efficace pour garder au vaccin un titre viral satisfaisant pendant trois heures après reconstitution à 37 °C (134).

Dans une étude au Cameroun, les taux de séroconversion d'un groupe d'enfants vaccinés avec un vaccin antiamaril conservé après reconstitution à des températures comprises entre 25 et 30 °C pendant une, deux et trois heures ont été respectivement de 100 %, 82 % et 67 % (37).

7.3 Résumé

On peut conserver en toute sécurité les vaccins antiamarils lyophilisés à - 20 °C et à + 4 °C pendant deux ans. On estime la demi-vie du pouvoir infectant du vaccin à température ambiante (20 à 25 °C) à une valeur comprise entre 3 et 10 mois. La baisse du titre initial du vaccin au niveau minimal acceptable se produit en deux à trois semaines à 31 °C, en une à deux semaines à 37 °C et en trois à six jours à 41 °C. Comme pour le vaccin antirougeoleux, le vaccin antiamaril se dégrade rapidement après reconstitution lorsqu'il est exposé à des températures élevées. A 27 °C, il perd 50 % de son pouvoir infectant après une exposition de cinq heures. L'utilisation d'un diluant à 37 °C entraîne une inactivation rapide du virus et une perte totale d'activité en une heure. Il faut donc rapidement administrer le vaccin antiamaril après reconstitution (dans l'heure qui suit). Si le vaccin reconstitué est gardé continuellement dans un bain glacé, on peut l'utiliser pendant toute la durée d'une séance de vaccination, mais on devra le jeter à la fin de celle-ci.

8. Vaccin anticoquelucheux

L'absence d'une épreuve simple, économique et reproductible pour déterminer l'activité limite les études de stabilité pour le vaccin anticoquelucheux. L'épreuve d'activité recommandée par l'OMS (149) est techniquement difficile et exige du personnel très qualifié ainsi qu'un grand nombre de souris appartenant à une certaine souche. Les résultats sont soumis à de grandes variations biologiques et il est difficile d'obtenir des données précises sur la détérioration de l'activité du vaccin exposé à des températures élevées, sauf en cas de modifications sensibles.

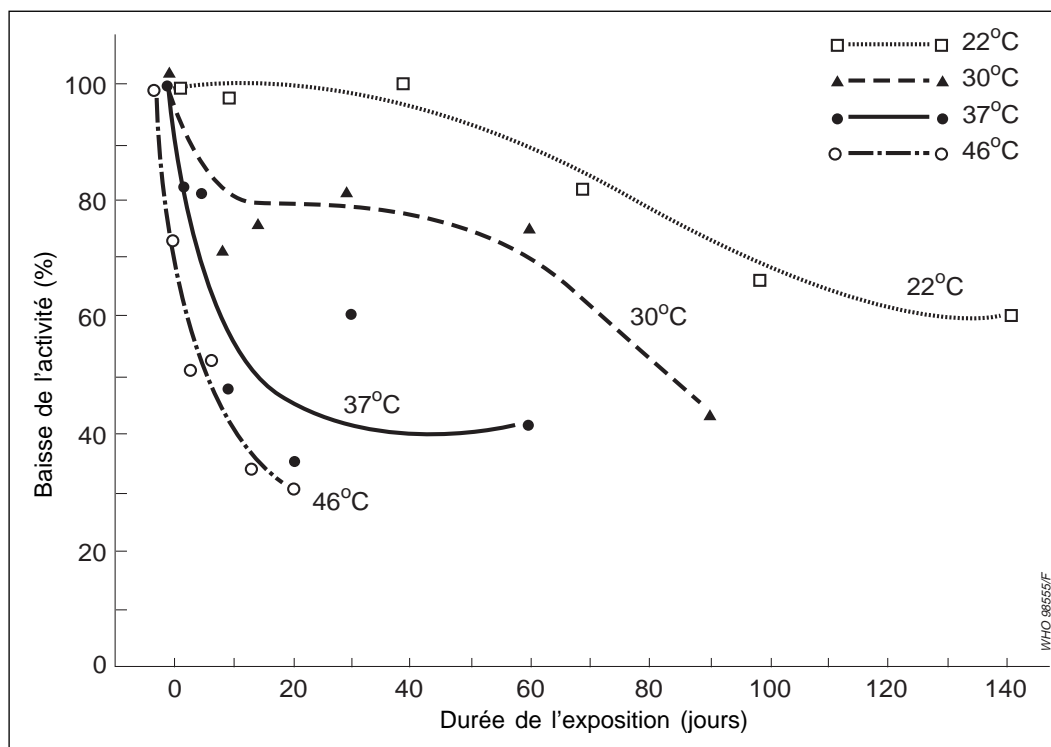
Néanmoins, plusieurs études ont fourni des informations précieuses sur les divers facteurs qui influencent la stabilité du vaccin anticoquelucheux. Les paramètres les plus souvent étudiés sont les suivants:

- la température (6, 34, 44, 82, 83, 85, 124, 146) ;
- le type de vaccin : vaccin monovalent ou composante coqueluche du DTC (6, 34, 69, 79) ;
- la méthode d'inactivation (60, 77, 79) ;
- la souche de *B. pertussis* (26) ;
- la nature de l'adjuvant ou de l'agent conservateur (113, 146).

8.1 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 ; la congélation comme la chaleur peuvent la faire diminuer. La Figure 6 (44) et le Tableau 4 montrent les effets de diverses températures ambiantes sur la composante coqueluche du DTC.

Figure 6 : Baisse de l'activité de la composante coqueluche dans le vaccin DTC en fonction de la durée de conservation et de la température



Source : Organisation mondiale de la Santé (44)

Conservée au réfrigérateur entre 4 et 6 °C, la composante coqueluche des vaccins DTC ou DTC-polio semble garder une activité satisfaisante pendant une période de deux ans (80, 83, 146). Toutefois, même dans des conditions de stockage optimales, on observe une diminution constante de l'activité sur de longues durées. L'activité initiale moyenne des 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 (80). De même, celle de la composante coqueluche dans les vaccins DTC-polio a chuté de 5,2 - 8,6 UI/ml à 1,2 - 1,6 UI/ml après trois ans de stockage à 4 °C (83).

La baisse d'activité annuelle moyenne de la composante coqueluche des vaccins DTC est évaluée à 0,35 UI par dose humaine. L'activité atteint un minimum de 4 UI par dose après six ans de conservation à 4 °C (33, 34, 77). Entre 22 et 25 °C, elle demeure supérieure à 80 % de la valeur initiale pendant 2 à 8 semaines, puis elle diminue ensuite progressivement selon un taux de dégradation estimé entre 0,3 et 0,4 % par jour.

A 37 °C, le processus de dégradation s'accroît et semble se dérouler en deux phases : au début, le déclin de l'activité est plus rapide avec un taux de dégradation estimé entre 1 et 6 % qui ralentit par la suite (44, 60, 83, 146).

Tableau 4 : Stabilité de la composante coqueluche des vaccins DTC en fonction de la température

Température de stockage (°C)	Références	Estimation de la baisse d'activité par jour (%)	Durée de stockage et durée utilisée pour le calcul du taux de dégradation
4 - 8	34 85 6 61 83	0.06 0 0 0.01 0.05 - 0.06	6 ans 45 jours 12 - 18 mois 90 jours, 15 - 90 jours 3 ans
22 - 25	85 44 6 60	0.31 0.41 0 0.26	45 jours, 0 - 45 jours 140 jours, 40 - 140 jours 30 jours suivis de 18 mois à 4 °C 90 jours, 15 - 90 jours
30	44	1.80 0.80	90 jours, déclin rapide 0 - 15 jours déclin lent, 30 - 90 jours
35 - 37	146 124 44 60 83	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	82,83 44	6.7 10.8	56 jours, 0 - 7 jours 20 jours, 0 - 4 jours

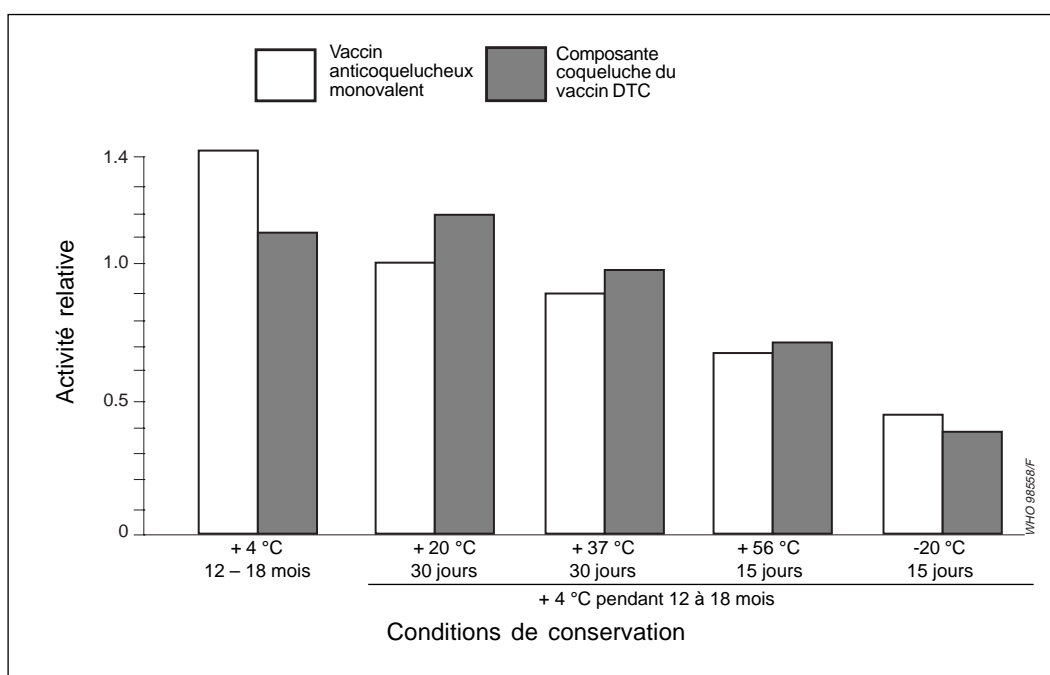
* Deux vaccins DTC-polio avec différents agents conservateurs

Conservé à 45 - 46 °C, le vaccin voit son activité diminuer fortement les premiers jours d'exposition, la baisse atteignant environ 10 % par jour. Une baisse de 50 % peut se produire au bout d'une exposition de 4 à 7 jours seulement et un stockage à 50 - 56 °C amène une destruction rapide et complète de l'activité de la composante coqueluche (15, 69). On a signalé une résistance plus élevée de cette composante aux températures élevées sans que le fait ait pu être expliqué (15, 85, 124, 136).

On ne dispose pas de données sur la stabilité du vaccin anticoquelucheux acellulaire qui, dans le DTC renferme des protéines adsorbées sur un sel d'aluminium. On s'attend donc à ce que sa stabilité ait un profil comparable à celle des autres vaccins protéiques, c'est-à-dire une thermostabilité relativement bonne, une résistance faible à la congélation et une durée de conservation comprise entre deux et trois ans à 2 - 8 °C (81).

La congélation peut altérer l'activité des vaccins anticoquelucheux. L'activité de la composante coqueluche des vaccins DTC, subissant une congélation à - 20 °C pendant 15 jours, perd plus de 50 % de sa valeur initiale. L'altération est plus grande par la congélation que par le stockage à des températures élevées (Fig. 7) (6). Lorsque des vaccins DTC adsorbés provenant de 5 fabricants différents ont été conservés pendant 12 heures entre - 5 °C et - 10 °C et entre - 20 °C et - 30 °C, trois d'entre eux ont vu l'activité de leur composante coqueluche subir une baisse sensible aux deux plages de températures (42).

Figure 7 : Immunogénicité* du vaccin anticoquelucheux monovalent et de la composante coqueluche du DTC conservés dans des conditions variées



* 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

Source : Andrescu V et al. (6)

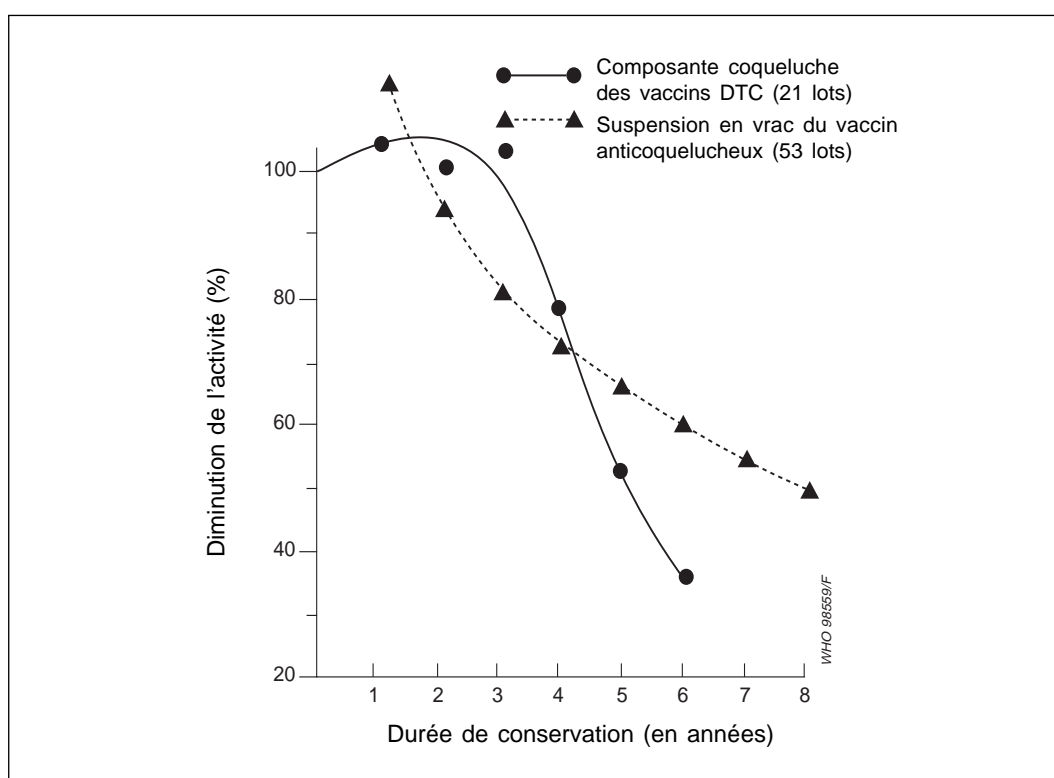
Rien n'indique que la toxicité du vaccin anticoquelucheux augmente avec la durée de stockage, comme l'établissent les épreuves de prise de poids de la souris et de sensibilisation à l'histamine (6, 26, 61). En fait, on observe une diminution de la toxicité dans des vaccins conservés à 25 °C et 35 °C pendant une durée de 4 semaines à 3 mois (26, 61).

8.2 Vaccins anticoquelucheux monovalents comparés à la composante coqueluche des vaccins associés

Une étude a montré que les vaccins anticoquelucheux monovalents étaient instables à 4 °C : au cours d'un stockage de 18 mois, certains échantillons ont perdu 58 à 87 % de leur activité initiale (69).

Les suspensions en gros de *B. pertussis* semblent se dégrader plus rapidement à 4 °C pendant la première année de conservation que la composante coqueluche des vaccins DTC adsorbés sur le phosphate d'aluminium (Fig. 8), probablement parce qu'il leur manque l'effet protecteur exercé par les protéines des anatoxines et les ions aluminium présents dans les vaccins trivalents. (Les effets des ions aluminium seront abordés à la section 8.5.)

Figure 8 : Activité des suspensions en vrac de *B. pertussis* et de la composante coqueluche du vaccin DTC conservées de 1 à 8 ans à 4 °C



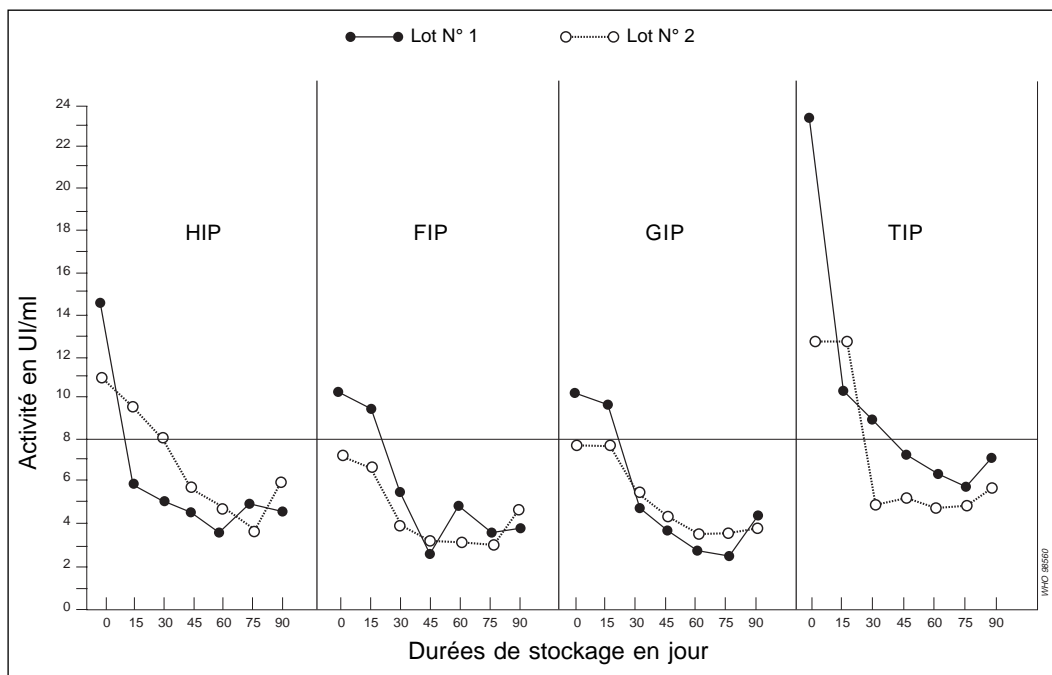
Sources : Csiszer Z, Zsidai J, Joo I (33, 34)

8.3 Méthodes d'inactivation de *B. pertussis*

Les premières études 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 définitivement le pas sur les autres dans ce domaine. Mais, en cas de stockage prolongé, 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.

Les observations anciennes faites par Kendrick (79) ont été confirmées par Gupta et al. 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) (Fig. 9) (60). Les épreuves de stabilité pratiquées après la conservation des vaccins pendant 90 jours à 4 - 8 °C, à 25 °C et à 35 °C n'ont fait apparaître aucune différence de stabilité attribuable à l'agent d'inactivation utilisé.

Figure 9 : Activité de la composante coqueluche des vaccins DTC stockés à 35 °C après inactivation par la chaleur (HIP), le formaldéhyde (FIP), le glutaraldéhyde (GIP) et le thiomersal (TIP)



Source : Gupta RK et al. (60)

Les travaux de Gupta et al. montrent les problèmes rencontrés dans les études portant sur les vaccins anticoquelucheux : faible reproductibilité des évaluations de l'activité de ces vaccins et différences dans les vitesses de dégradation des vaccins préparés selon le même procédé. L'activité initiale des vaccins préparés au moyen de diverses méthodes d'inactivation varie considérablement, celle des vaccins inactivés au thiomersal étant la plus forte et celles des vaccins traités à l'acétone étant inférieure à la norme admise.

8.4 Souches de *B. pertussis*

Dans les recherches (26), les vaccins préparés à partir de six souches différentes ont révélé une stabilité variable, mais les chiffres n'étaient pas assez significatifs pour que l'on puisse faire une nette distinction entre les souches stables et instables. Toutefois, dans une souche qui a donné un vaccin doté d'une plus grande stabilité, l'action du facteur favorisant la leucocytose et du facteur de sensibilisation à l'histamine (mesures de la toxine coquelucheuse) s'est exercée plus longtemps que dans des vaccins préparés avec d'autres souches.

8.5 Influence du conservateur et de l'adjuvant

Une baisse sensible de l'activité de la composante coqueluche du vaccin DTC-polio risque de se produire si l'on utilise le chlorure de benzéthonium (CB) comme conservateur (38, 122). Ce dernier a été introduit pour remplacer le merthiolate quand il est apparu qu'il inactivait la composante poliovirus du vaccin. Le CB est un ammonium quaternaire qui agit probablement en se fixant sur les sites chargés négativement à la surface de *B. pertussis*.

Ensuite, Olson et al. ont montré que le vaccin anticoquelucheux conservé par le CB et stocké à 37 °C pendant 16 semaines n'avait pas d'activité protectrice mesurable chez la souris (Tableau 5) (113). Cependant, on pourrait diminuer l'effet dommageable du CB en traitant le vaccin avec des sels d'aluminium, de calcium ou de magnésium ou avec la choline ou la D-lysine avant d'ajouter cet agent conservateur. On a laissé entendre que ces substances étaient capables d'empêcher l'absorption du CB sur les cellules du bacille de la coqueluche, ce qui stabiliserait par conséquent les antigènes protecteurs ainsi que le détermine l'épreuve de protection sur la souris.

Van Ramshorst et van Wezel (146) ont étudié la stabilité de toutes les composantes des vaccins DTC-polio tétravalents, conservés par le CB, 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'ont pas différé fondamentalement de ceux observés pour les vaccins conservés par le merthiolate. Il est possible que le phosphate d'aluminium présent dans le vaccin tétravalent atténue les effets délétères du chlorure de benzéthonium.

Tableau 5 : Activité des vaccins anticoquelucheux contenant divers conservateurs et stockés à 37 °C

Conservateur	Activité en UI/ml Durée du stockage à 37 °C				
	0 semaine	5 semaines	10 semaines	16 semaines	42 semaines
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 + phosphate 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

Source : Olson BH, Eldering G, Graham B (113).

8.6 Résumé

Dans sa présentation habituelle, le DTC renfermant du thiomersal et un adjuvant d'aluminium est sensible à la congélation mais relativement stable à 4 °C pendant au moins deux ans. Il résiste à une conservation de plusieurs mois à des températures comprises entre 22 et 25 °C, de plusieurs semaines à 37 °C et moins d'une semaine à 45 °C. Comme pour la plupart des vaccins comportant des protéines, les températures supérieures à 56 °C les abîment immédiatement.

9. Vaccin BCG

Plusieurs facteurs compliquent la standardisation de ce vaccin et les études relatives à sa stabilité, notamment :

- (1) le nombre des différentes souches dérivées utilisées pour la production des vaccins.
- (2) les différences dans les méthodes de fabrication et de contrôle appliquées par les fabricants de vaccins. La technique et la durée de culture du BCG ainsi que la nature de l'agent stabilisant sont des facteurs importants.
- (3) les différences dans la teneur bactérienne et le nombre de particules cultivables.
- (4) l'absence d'une technique de laboratoire approuvée 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 par dénombrement des colonies sur milieu solide, constitue l'épreuve la plus importante. Ce test de viabilité revêt également une importance capitale pour l'évaluation de la stabilité du BCG stocké dans des conditions variables.

Le BCG a été le premier vaccin pour lequel des normes OMS de thermostabilité ont été fixées (150). Chaque lot de BCG doit faire l'objet d'une EDA. Le nombre de particules cultivables dans le vaccin incubé à 37 °C pendant 28 jours ne devra pas être inférieur de plus de 20 % à celui provenant d'un vaccin conservé à 4 °C (154).

9.1 Effet de la température sur la viabilité du BCG

Conservé au réfrigérateur à des températures inférieures à 8 °C, ce vaccin est relativement stable et la plupart des fabricants donnent une durée de validité d'un an si cette condition est remplie. La viabilité a décliné de 20 % pour une durée de stockage de deux ans à 4 °C (53), laissant entendre une perte annuelle d'environ 10 % en dessous de 8 °C (53, 165). Cependant, certains vaccins peuvent perdre jusqu'à 20 - 25 % de leur viabilité initiale en six mois de stockage seulement (137).

Conservés à 13 - 15 °C pendant deux mois, les BCG n'ont subi qu'une légère perte de viabilité, mais celle-ci a atteint environ 20 % au bout de neuf mois (24). A 18 °C, la viabilité diminue d'environ 10 % par mois (165).

A température ambiante (22 - 25 °C), certains vaccins BCG peuvent perdre de 25 à 40 % de leur viabilité initiale en deux mois de stockage (74) et d'un cinquième à un tiers en trois mois (24). A 30 °C ou à 37 °C, la dégradation se déclenche plus rapidement et la vitesse de diminution des particules cultivables est plus importante pendant la phase initiale qu'au cours des phases ultérieures de l'exposition (Tableau 6) (24, 129). On ignore si ce taux de dégradation précoce serait aussi fort si l'on répétait l'exposition à des températures élevées. La baisse quotidienne de viabilité pour les vaccins conservés à 37 °C pendant quelques semaines s'est située entre 1 et 2 % (11, 20, 24, 74, 165).

Tableau 6 : Baisse d'activité de quatre vaccins BCG gardés à 30 °C et 37 °C pendant 36 semaines

	Taux de perte d'activité par jour (en pourcentage de la valeur initiale) à			
	30°C		37°C	
	Durée de stockage en semaines			
Vaccins	0 - 9	10 - 36	0 - 4	6 - 36
Japonais	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
Danois	0.8	0.2	1.9	0.2

Source : Bunch Christensen K (24)

La dégradation du vaccin BCG est très rapide à des températures dépassant 37 °C. L'exposition à 54 °C entraîne une baisse de la viabilité initiale de 25 à 73 % en un jour et de 74 à 85 % en trois jours (74). Elle peut diminuer de moitié après une exposition de 30 minutes à 70 °C et de 80 % après 5 minutes d'ébullition (56).

L'exposition du BCG à des températures élevées aboutit à une baisse du nombre des particules cultivables, proportionnelle à la température et à la durée de l'exposition. Il est cependant difficile de déterminer une limite de dégradation thermique acceptable faute de connaître la dose vaccinale optimale. Administrés à des enfants d'âge scolaire, 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 sont demeurés capables 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 (20, 165). Une conservation prolongée à des températures élevées a diminué l'allergie postvaccinale et la taille des lésions vaccinales (20). L'interprétation de ces résultats n'est pas facile, car l'hypersensibilité retardée à la tuberculine et les nodules au point d'inoculation, qui sont les marques caractéristiques des réponses cellulaires spécifiques, n'ont pas de rapport direct avec la protection.

On se demande souvent si la conservation du vaccin BCG en dessous de 0 °C est conseillée. De plus, il a été indiqué que la répétition de cycles de congélation et de décongélation pourrait nuire. Toutefois, les données expérimentales montrent que la viabilité n'est pas affectée par un stockage à des températures de - 20 ou de - 30 °C, ni par une répétition des cycles de congélation - décongélation répétés jusqu'à 10 fois (24, 56).

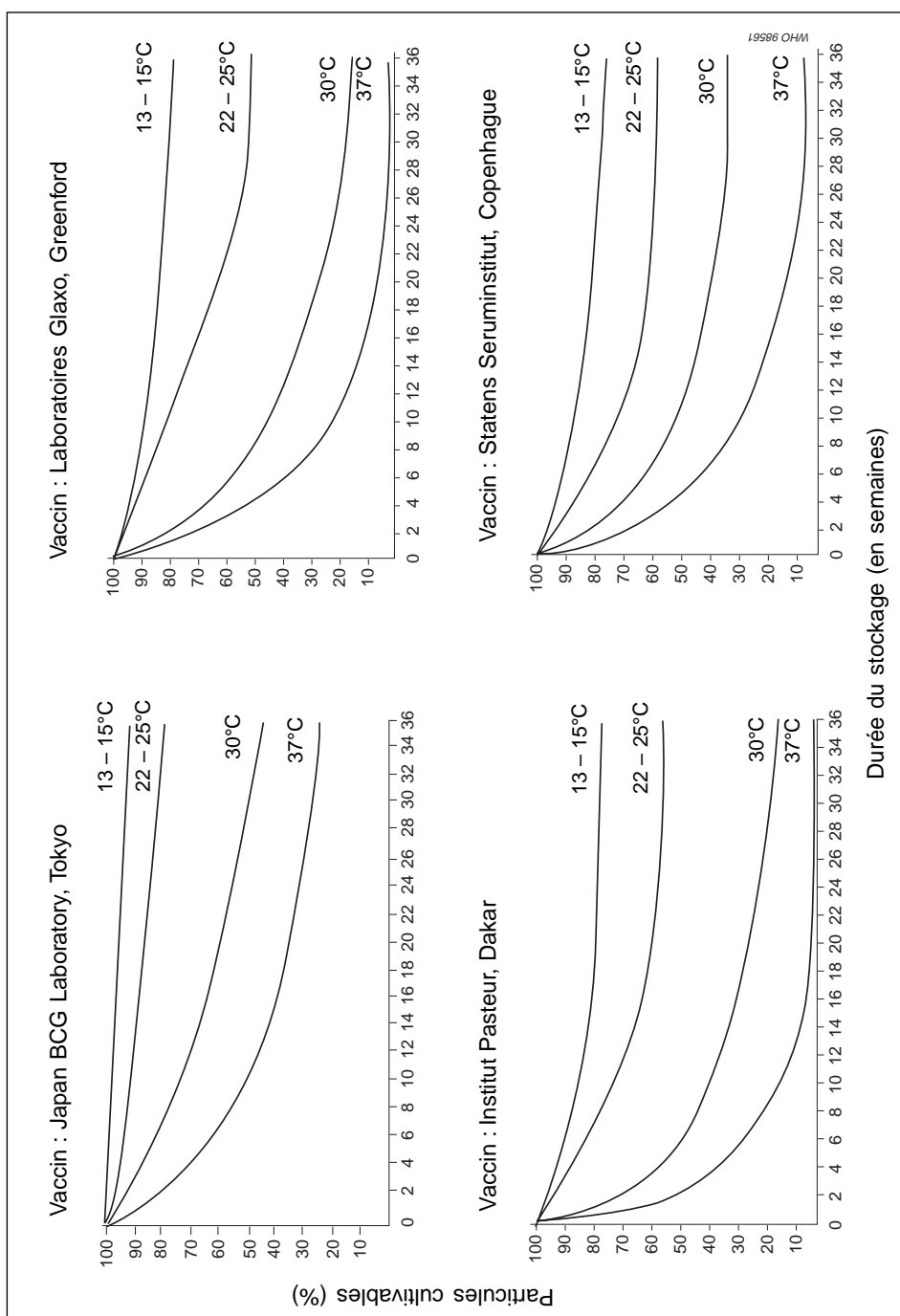
9.2 Stabilité des vaccins produits à partir de différentes souches dérivées du BCG

Toutes les souches de BCG disponibles dérivent de celle produite par Calmette, il y a plus de 65 ans. Avec cette longue période de survie de la souche d'origine par transferts sur milieux de culture, on observe des différences fondamentales entre les souches filles.

Les souches sont en général classées comme fortes, comme la souche française 1172 (Pasteur) et la souche danoise 1331 (Copenhague), ou faibles, comme la souche japonaise 172, la souche brésilienne Moreau ou la souche britannique 1077 (Glaxo). Cette distinction repose principalement sur les caractéristiques de croissance, la virulence résiduelle chez l'animal et la réactogénicité chez l'enfant. Les différences pourraient être liées à la teneur en antigènes lipidiques de surface et aux protéines sécrétées par ces souches (1).

Il existe des différences de thermostabilité en fonction des diverses souches secondaires utilisées pour la préparation du vaccin (Tableau 7, Figure 10) (24). A toutes les températures d'essai, les taux de dégradation ont été les plus faibles pour le vaccin japonais et les plus forts pour les vaccins Dakar et Glaxo, le vaccin danois occupant une place intermédiaire. Les différences entre les vaccins s'estompent avec la prolongation du stockage.

Figure 10 : Activité de quatre vaccins BCG stocké pendant 36 semaines à différentes températures



Source : Bunch Christensen K (24).

Une étude récente a confirmé les différences de thermostabilité entre les vaccins préparés à partir de diverses souches secondaires (74, 75). Le vaccin japonais, préparé à partir de la souche 172, est apparu doté d'une plus grande thermostabilité que le vaccin français (souche 1172), le vaccin danois (souche 1331, Copenhague) et le vaccin polonais (souche Moreau), (Tableau 7) (74). A 37 °C, il a fallu 56 jours pour obtenir une diminution de 50 % de la viabilité (particules cultivables/mg) du vaccin japonais, contre 28 à 35 jours pour les autres vaccins. A 54 °C, le vaccin japonais a gardé plus de 50 % de sa viabilité pendant plus de neuf jours, tandis que les autres vaccins ont perdu plus de 50 % de leur activité initiale en un à trois jours.

Tableau 7 : Particules de BCG cultivables dans les vaccins japonais, danois, français et polonais à diverses températures

Température	Nombre de jours	Nombre de particules cultivables/mg			
		Vaccin			
		Japonais	Danois	Français	Polonais
4°C	Témoin	47.86	4.68	7.76	6.17
20°C	28	45.71	3.72	6.31	4.57
	63	44.67	3.02	5.89	3.72
	84	39.81	2.24	4.90	2.75
	112	38.02	2.09	3.47	2.19
37°C	14	46.77	3.80	5.50	4.68
	28	37.15	2.34	4.90	2.69
	35	-	-	-	1.62
	42	-	1.32	1.51	0.55
	56	26.92	-	1.55	-
	84	17.78	2.29	0.41	-
54°C	1	47.86	3.47	2.75	1.66
	3	46.77	1.26	1.07	0.91
	6	39.81	0.98	0.63	0.25
	7	-	0.20	0.22	-
	9	32.36	-	-	-

Source: Janaszek W (74).

D'autres études ont également montré des différences de stabilité entre les vaccins BCG (57, 129 — voir également Tableau 8).

Tableau 8 : Activité et thermostabilité de 10 vaccins BCG

Vaccin	Nombre initial de particules cultivables (x 10 ⁶ /ml)	Viabilité au bout de 28 jours de conservation à 37 °C		Perte quotidienne de viabilité (%) (Durée de stockage analysée, jours)
		Part. cultivables (x 10 ⁶ /ml)	% par rapport au nombre initial	
Japonais	27.0	16.6	61	(0 - 28)
Glaxo	20.1	10.9	54	(0 - 21)
URSS	7.1	3.6	51	1.7 (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)
Copenhague	2.9	1.9	66	2.5 (0 - 28)
Mérieux	2.8	0.3	11	3.3 (0 - 28)
Institut Pasteur	2.7	1.3	48	1.9 (0 - 28)
Prague	1.1	0.2	18	5.2 (0 - 21)

Source: *Lugosi L (92)*.

9.3 Conditionnement des vaccins BCG

Ces vaccins nécessitent des précautions spéciales afin d'assurer une stabilité suffisante. A cet égard, la lyophilisation, un stabilisant efficace et la fermeture adéquate des récipients sont les mesures les plus importantes.

On a observé une meilleure stabilité à 4 °C et à 37 °C et une viabilité initiale plus grande (c'est-à-dire de meilleurs taux de survie après lyophilisation) après changement de la composition du stabilisant et amélioration de la méthode de dessiccation (53).

Actuellement, l'utilisation d'ampoules scellées sous vide est la pratique la plus courante. Toutefois, cette technique est difficile en comparaison du scellement en présence de gaz inerte. On n'a pas observé de différence significative entre les vaccins BCG scellés sous vide ou en présence d'azote ou de dioxyde de carbone, à 4 °C comme à 37 °C (53, 86). On a signalé que le nombre des particules viables diminuait plus rapidement pour les vaccins scellés sous azote que pour ceux scellés sous vide (20). Un vaccin BCG scellé en présence d'argon semblait avoir une moins bonne stabilité à 37 °C que le vaccin scellé sous vide (56).

Les vaccins BCG contenus dans des flacons fermés par un bouchon en caoutchouc ont une stabilité moindre que ceux conservés dans des ampoules (92, 129). Ce genre de flacon présente également l'inconvénient de tenter les utilisateurs de conserver le vaccin reconstitué (141).

9.4 Effet de la lumière sur la stabilité du vaccin BCG

Les vaccins BCG lyophilisés, indépendamment de la souche secondaire qui les compose, sont sensibles aux rayons ultraviolets et à la lumière fluorescente. Ils doivent donc être conditionnés en ampoules faites avec un matériau transmettant faiblement la lumière (comme le verre jaune) et protégés de la lumière au moment de leur utilisation (87).

9.5 Stabilité du vaccin reconstitué

Le vaccin BCG reconstitué est très instable et devrait être utilisé au cours d'une seule séance de vaccination de cinq à six heures, **après quoi ce qui reste doit être jeté**. Deux raisons justifient ces précautions :

- (1) le risque de contamination, car le vaccin BCG, contrairement à tous les autres, ne renferme pas d'agent bactériostatique ;
- (2) la perte d'activité (41).

9.6 Résumé

La plupart des vaccins BCG lyophilisés sont stables à des températures comprises entre 0 et 8 °C.

Leur stabilité varie à température ambiante ; après conservation pendant plusieurs mois, on peut s'attendre à une perte de viabilité d'environ 30 %. La baisse quotidienne de la viabilité des vaccins gardés quelques semaines à 37 °C se situe entre 1 et 2 %. Les vaccins reconstitués sont très instables. **Une fois reconstitués, tous les vaccins BCG doivent être jetés à la fin de la séance de vaccination, quel que soit le nombre de doses restant dans le flacon ou l'ampoule.**

10. Vaccin antipoliomyélitique

Des progrès remarquables ont été accomplis ces dernières années dans l'éradication mondiale de la poliomyélite. En 1996, plus de 400 millions d'enfants ont été vaccinés au cours de journées nationales de vaccination et 500 millions étaient ciblés en 1997. Le vaccin antipoliomyélitique oral (VPO) a été le vaccin de choix pour cette campagne.

Ce vaccin est le moins stable de tous ceux utilisés couramment dans les programmes nationaux de vaccination. Il fait appel à un virus vivant atténué qui, comme la plupart des virus, est instable à moins d'être gardé à de très basses températures (congelé). Les recommandations actuelles prescrivent, pour le maintien de l'activité, de garder et d'envoyer le vaccin à basse température. On améliore sa thermostabilité en utilisant des agents stabilisants, comme de fortes concentrations de chlorure de magnésium ou certains sucres. On les emploie systématiquement pour stabiliser tous les VPO.

10.1 Stabilité générale du vaccin antipoliomyélitique aux températures élevées

On a en général surveillé la stabilité des vaccins antipoliomyélitiques trivalents en mesurant la teneur totale en virus vivants des trois sérotypes (22, 46, 132). Cette pratique pourrait passer à côté des modifications des types 2 et 3 résultant de l'exposition à des températures élevées (10). On a observé une faible baisse du titre viral après un stockage de longue durée à - 20 °C (52, 132). La plupart des fabricants indiquent que leurs VPO sont actifs s'ils sont conservés à une température maximale de - 20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur le conditionnement (en général deux ans). Lorsque la distribution n'est pas imminente, il est conseillé de garder le vaccin à - 20 °C ou en dessous, cette mesure permettant de stopper la dégradation de son activité.

La perte d'activité au réfrigérateur peut varier. Peetermans et Colinet ont montré que l'activité de leur vaccin stabilisé par le $MgCl_2$ n'avait baissé que de 0,3 \log_{10} après exposition à 4 °C pendant 18 mois (117). D'autres résultats laissent penser cependant que la stabilité est plus faible dans cette gamme de températures et les observations ont montré des diminutions de 0,15 à 0,31 \log_{10} pour une période plus courte (30 jours) d'exposition à 5 °C (157).

La vitesse de dégradation est proportionnelle à la température d'exposition. Les VPO pourraient perdre 4 à 13 % de leur activité par jour à 25 °C, 11 à 21 % par jour à 31 °C et 26 à 34 % par jour à 37 °C (157). Les demi-vies de divers VPO testés en Inde ont été de 4,3 jours à 22 °C et 1,7 jours à 36 °C (132). La baisse quotidienne moyenne du titre a été de 0,03 - 0,04 \log_{10} DICC₅₀ avec les vaccins gardés à 26 °C et de 0,10 - 0,12 \log_{10} à 37 °C (48). Avec ces vitesses de dégradation, un vaccin d'une teneur virale totale de 6,15 \log_{10} DICC₅₀ perd la moitié de son activité en deux à trois jours d'exposition à 37 °C ou en 7 à 10 jours d'exposition à 22 - 26 °C. Cela correspond bien aux observations antérieures de Melnick et Wallis (105) ainsi que de Perkins et Magrath (121) qui considéraient que les vaccins antipoliomyélitiques conservaient une activité minimale pendant trois jours à 37 °C et pendant 14 à 21 jours à 25 - 28 °C.

A des températures supérieures à 37 °C, les vaccins antipoliomyélitiques se dégradent rapidement. A 41 °C, ils perdent chaque jour environ la moitié de leur activité (48), tandis qu'à 50 °C, un vaccin perd 0,1 \log_{10} DICC₅₀ en une heure (22), ce qui donne une demi-vie de trois heures.

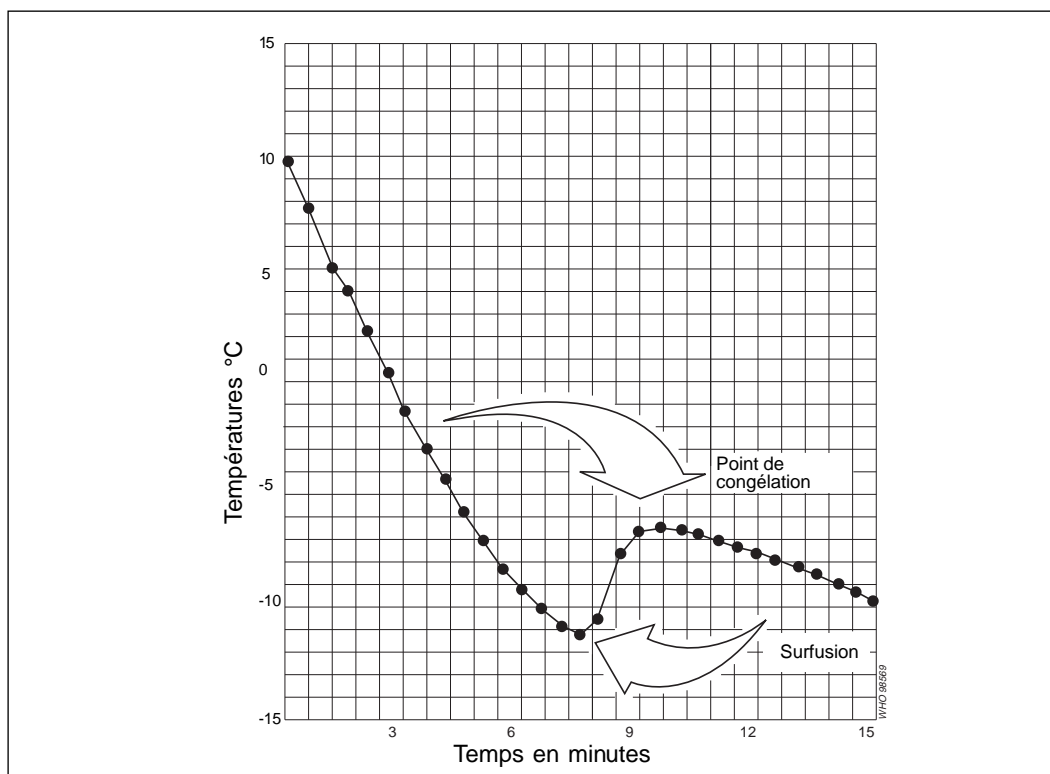
10.2 Le VPO aux températures de congélation

10.2.1 Point de congélation du VPO

La présence de stabilisants dans les préparations vaccinales abaisse leur point de congélation. Une étude a été menée sur des VPO trivalents produits par cinq fabricants afin de déterminer leur point de congélation et l'effet sur leur activité d'un nombre de cycles de congélation - décongélation pouvant atteindre 180 (49).

Lorsque ces vaccins sont gardés à - 25 °C, ils rentrent rapidement en surfusion entre - 8 °C et - 16 °C et restent donc à l'état liquide. Leur température remonte ensuite rapidement à environ - 7,5 °C pendant la phase de passage à l'état solide. La température à laquelle le vaccin remonte est considérée comme le point de congélation (Fig. 11) et elle varie entre - 6,6 et - 8,1 °C (49).

Figure 11 : Températures des vaccins trivalents exposés à -25 °C pendant 15 minutes



Source : Organisation mondiale de la Santé (49)

10.2.2 Activité du vaccin après des cycles répétés de congélation - décongélation

Certaines études ont montré qu'il n'y avait pas de baisse significative du titre viral pour les VPO ayant subi jusqu'à 10 cycles de congélation - décongélation (18, 40, 46, 52, 132). Mais l'on ne dispose pas de détails sur la rapidité des congélations et des décongélation, ni sur la longueur des intervalles pendant lesquels les vaccins ont été maintenus à l'état décongelés. Si les titres totaux des vaccins trivalents ont été mesurés, il n'y a pas en revanche de données sur la sensibilité spécifique de chaque type de poliovirus exposé aux cycles de congélation - décongélation. Tous ces facteurs sont de nature à influencer la survie des particules virales au cours de ces cycles (10)

Les vaccins soumis à 10, 90 et 180 cycles de congélation - décongélation (de -25 °C à 2,5 °C) ont donné des valeurs du titre viral qui ne différaient pas sensiblement de celles des échantillons témoins, maintenus à -25 °C. Il n'y a pas eu de tendance à la baisse liée à l'augmentation du nombre de cycles (49). Toutefois, la température maximale n'a pas dépassé 2,1 °C. Sur le terrain, une rupture de la chaîne du froid peut entraîner un réchauffement bien plus grand des vaccins. Par conséquent, ces résultats ne sont valables que pour les situations dans lesquelles la température du vaccin dégelé reste dans la gamme de celles que l'on trouve dans un réfrigérateur en bon état de fonctionnement.

Les compartiments à glace des réfrigérateurs, qu'on utilise parfois pour garder les VPO, fonctionnent à environ -5 °C. On est donc au-delà du point de fusion du vaccin qui est susceptible par conséquent de ne pas rester à l'état solide.

10.3 Températures recommandées pour le stockage

Comme il existe une relation étroite entre la température de stockage et la survie du poliovirus, les fabricants recommandent pour les VPO des dates d'expiration en fonction de la température à laquelle ils sont conservés. Nombre d'entre eux donnent deux chiffres : 1) jusqu'à deux ans en cas de conservation dans un congélateur ou à une température inférieure à - 20 °C ; 2) jusqu'à six mois en cas de conservation dans un réfrigérateur entre 0 et 8 °C. Un fabricant déclare que son vaccin stabilisé au chlorure de magnésium conserve une immunogénicité suffisante pendant 12 mois avec un stockage au réfrigérateur entre 2 et 8 °C, pendant trois semaines à 25 °C et pendant trois jours à 37 °C.

Il est nécessaire de surveiller constamment les chaînes du froid. Lors d'une étude en Inde, il s'est avéré que la fréquence de la perte d'activité des VPO, comparativement élevée au début, a diminué avec le temps (35). Lorsque la distribution et l'administration des VPO ne sont pas imminentes, on recommande le stockage à une température inférieure à - 15 °C pendant huit mois au plus au niveau central et trois mois au plus au niveau régional, des congélateurs fiables y étant en général disponibles.

Sur le terrain, où le risque de rupture sérieuse de la chaîne du froid est élevé et les congélateurs moins courants, l'OMS recommande pour la gestion de ne pas garder les VPO dans les réfrigérateurs (à 0 - 8 °C) plus d'un mois dans les centres de santé, ni de les transporter à ces températures pendant plus d'une semaine (45, 91). Le compartiment à glace des réfrigérateurs des centres de santé doit être réservé aux blocs à glace.

10.4 Normes de l'OMS en matière de thermostabilité

Chaque lot final de VPO doit subir l'épreuve de dégradation accélérée pour confirmer qu'il a une stabilité satisfaisante. Des échantillons représentatifs des récipients du produit terminal doivent être mis à incuber à 37 °C pendant 48 heures. La concentration virale totale des flacons exposés et non exposés est déterminée en même temps que celle d'une préparation trivalente témoin. Le test est concluant pour les vaccins si la baisse due à l'exposition ne dépasse pas un facteur de 10^{0.5} unités infectantes par dose humaine. Il revient aux organismes nationaux de contrôle de spécifier les titres viraux minimaux par dose humaine (158).

10.5 Facteurs affectant la stabilité du VPO aux températures élevées

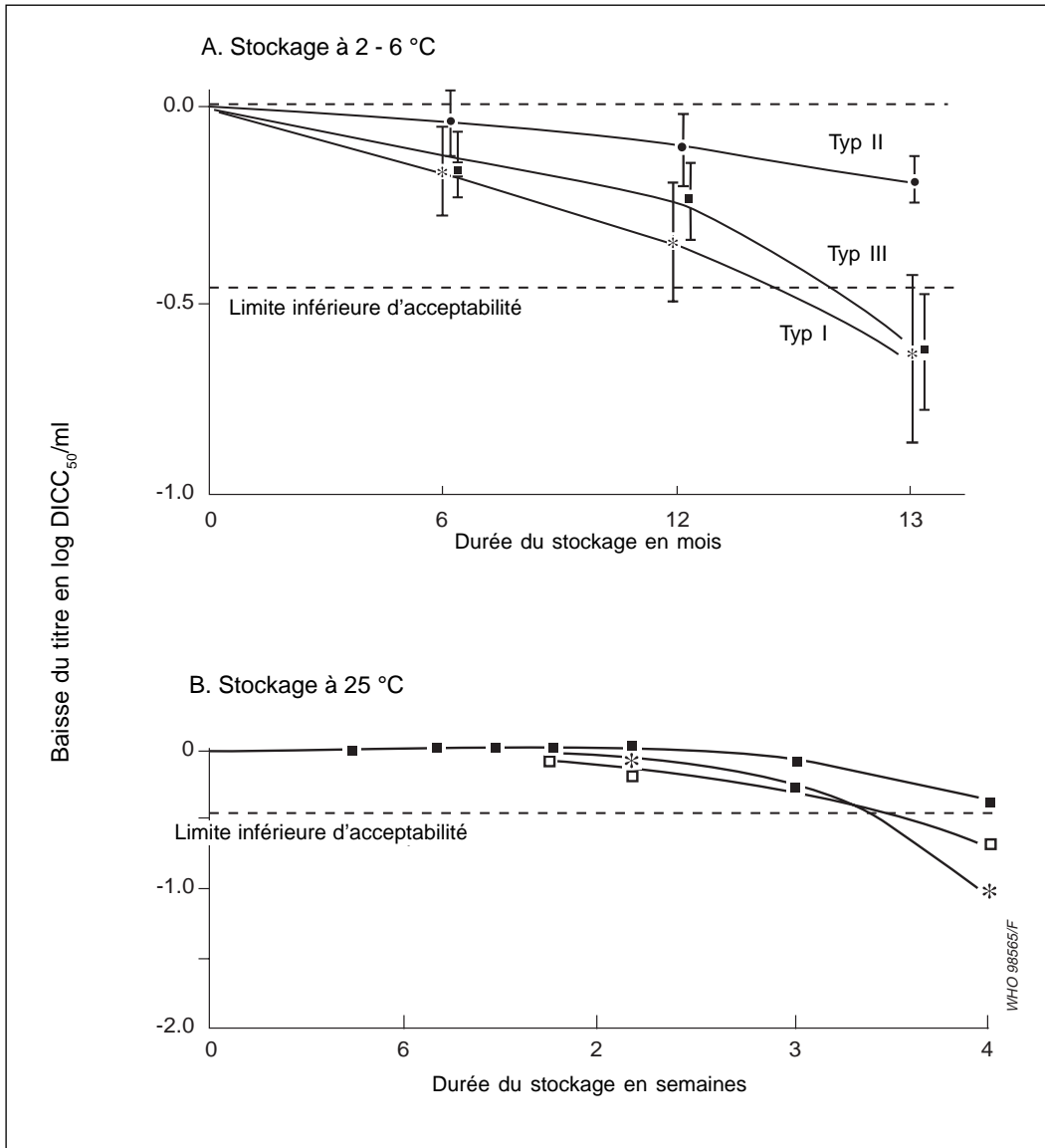
La stabilité du VPO dépend de plusieurs facteurs, notamment des différences éventuelles de sensibilité des types viraux, de la présence et de la nature d'un stabilisant, du pH de la préparation et du récipient dans lequel le vaccin est conservé.

10.5.1 Différences des types viraux pour la thermosensibilité

Les caractéristiques de croissance varient en fonction des divers types de poliovirus employés pour le triple vaccin. Le type 2 a la croissance la plus prolifique au cours de la répllication intestinale, suivi des types 3 et 1 lorsqu'ils sont administrés simultanément. Pour compenser ces différences, on a mis au point pour les vaccins trivalents des formulations équilibrées qui renferment habituellement les types 1, 2 et 3 dans les proportions de 10 :1 :3 (158). D'autres études ont montré que des modifications du rapport entre les composants pourraient renforcer l'immunogénicité du VPO, notamment pour le type 3 (114, 115).

Les essais sur 50 lots commerciaux de VPO conservés entre 2 et 6 °C ont indiqué que le type 2 était le plus stable et le type 1 le moins stable. On a observé les mêmes différences de stabilité pour des vaccins conservés à 25 °C (Fig. 12) (101).

Figure 12 : Stabilité du vaccin antipoliomyélitique oral trivalent stabilisé avec un tampon peptoné et stocké à 2 - 6 °C et 25 °C



Source : Magrath DI (96).

Ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres auteurs qui ont testé différents VPO. D'après Peetermans et al. (118), le type 1 s'est révélé plus stable que les types 2 et 3. Le type 1 a accusé une baisse de 0,06 log₁₀ DICC₅₀ seulement au bout de 12 mois de conservation du VPO à 4 °C, alors que la baisse a été de 0,20 et 0,27 log₁₀ DICC₅₀ pour les types 2 et 3 respectivement. Les différences entre les types viraux ne sont pas constantes et rien ne milite nettement en faveur d'une plus grande résistance d'un type en particulier lorsque les vaccins sont stockés à une température comprise entre 20 et 25 °C ou à 37 °C (Tableau 9). Mirchamsy et al. n'ont pu trouver aucune différence entre les types de poliovirus conservées pendant 9 mois à + 4 °C et - 20 °C.

Tableau 9 : Comparaison de la stabilité de différents types de poliovirus à 20 - 25 °C et à 37 °C

Vaccin	Baisse du titre en log ₁₀ DICC ₅₀ /jour à la température de:						Références
	20-25°C			37°C			
	Type 1	Type 2	Type 3	Type 1	Type 2	Type 3	
Stabilisé par MgCl ₂ par le saccharose	0.026	0.024	0.021	0.182	0.193	0.160	104
	0.043	0.064	0.040	0.220	0.302	0.214	
B	-	-	-	0.149	0.159	0.144	101
C	-	-	-	0.151	0.129	0.136	
D	-	-	-	0.207	0.171	0.150	
E	-	-	-	0.224	0.161	0.211	

10.5.2 Nature du stabilisant

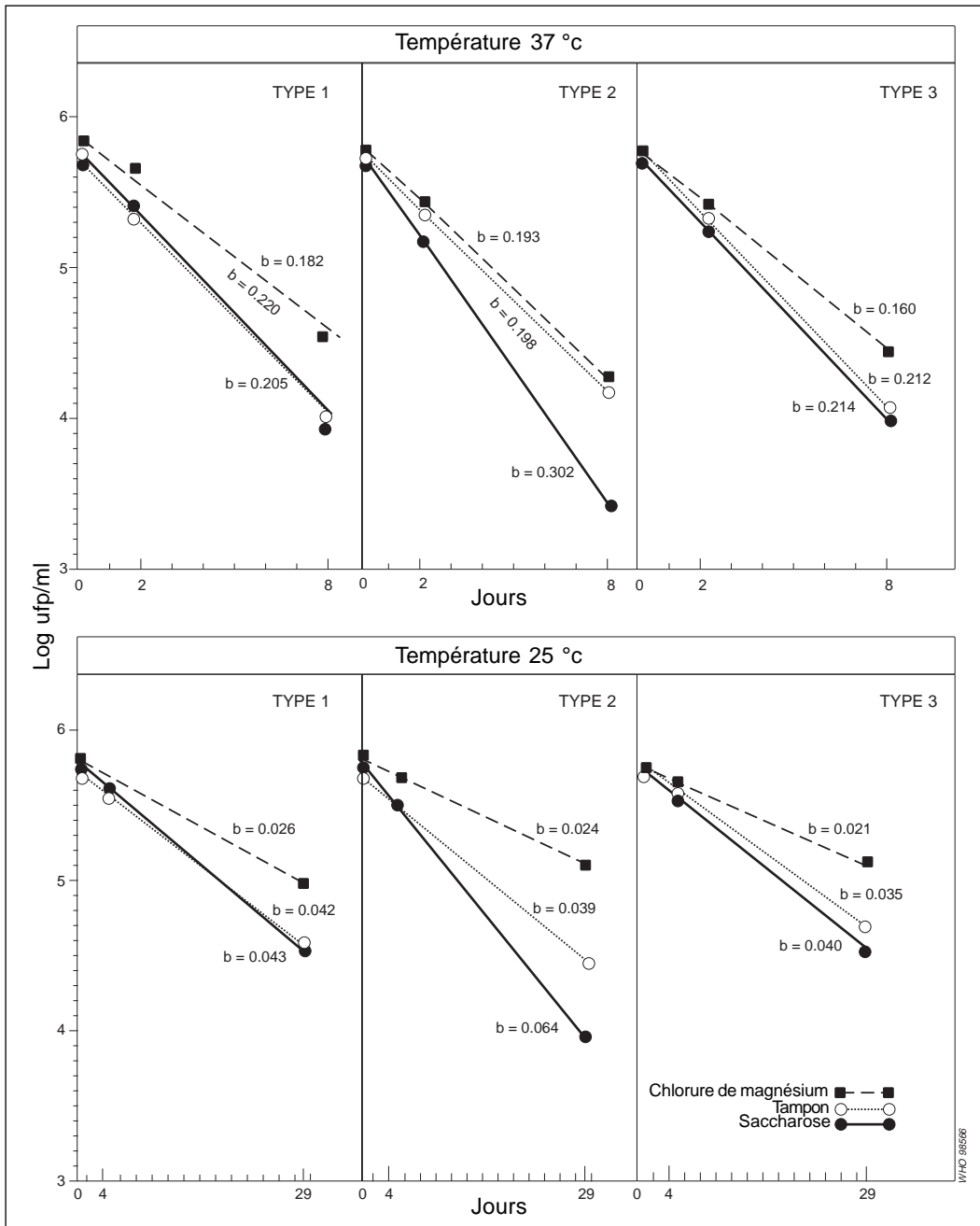
Les stabilisants les plus couramment utilisés avec les poliovirus atténués ont été le chlorure de magnésium et le saccharose ; on a également eu recours à des tampons, au lait ou à la gélatine.

Wallis et Melnick (147) 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 (MgCl₂) à des souches de poliovirus atténués permet de garder les vaccins à 4 °C pendant 3 mois ou à 25 °C pendant 25 jours sans qu'il y ait de baisse significative du titre. Melnick et al. (104) ont constaté que les vaccins, stabilisés par le MgCl₂, puis soumis à une exposition à 30 °C pendant 21 jours, suscitaient 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 le saccharose à 35 - 50 % était également efficace pour stabiliser les poliovirus atténués. Perkins et Magrath (121), ainsi que Magrath (95) ont conclu qu'aussi bien 1 mole de MgCl₂ que le saccharose à 50 % étaient des stabilisants efficaces. Pour obtenir une stabilité virale maximale, il est nécessaire d'éviter l'augmentation du pH qui se produit avec la libération de CO₂ par le récipient.

Actuellement, la plupart des VPO disponibles sur le marché sont stabilisés avec du chlorure de magnésium, bien que certains fabricants en produisent en utilisant du saccharose. Les études récentes semblent indiquer que le chlorure de magnésium est plus efficace que le saccharose pour accroître la thermostabilité des VPO. Pour une exposition de 8 jours à 37 °C ou de 29 jours à 25 °C, la baisse d'activité des trois types de vaccin monovalent a été plus rapide pour les produits stabilisés par du saccharose ou un tampon que pour ceux stabilisés par le chlorure de magnésium (Fig. 13).

Figure 13 : Perte d'activité du VPO monovalent stabilisé par le chlorure de magnésium, une solution tampon ou du saccharose et conservé à 37 °C et à 25 °C



Remarque : les valeurs b représentent la baisse du titre par jour

Source : Mann GF et al. (100)

Le vaccin stabilisé par le chlorure de magnésium est plus stable que celui produit par le même fabricant et stabilisé par le saccharose, aux températures inférieures à 37 °C (Tableau 10) (117). On a également observé ailleurs la meilleure stabilisation par le chlorure de magnésium (109).

On en a conclu que l'utilisation systématique du chlorure de magnésium contribuerait à accroître la stabilité des VPO et à dépendre au minimum de la chaîne du froid (71).

Tableau 10 : Baisses moyennes du titre viral total et demi-vies des vaccins antipoliomyélitiques oraux stabilisés par du saccharose ou du chlorure de magnésium et conservés à diverses températures

Température de stockage	Unité de temps (°C)	Saccharose		Chlorure de magnésium	
		Baisse du titre*	Demi-vie	Baisse du titre*	Demi-vie
4	mois	0.11	6 mois	0.02	20 mois
20-25	jour	0.03	12 jours	0.01	23.1 jours
37	jour	0.15	1.9 jours	0.16	1.8 jours
45	jour	-	-	0.61	0.6 jours

* Par unité de temps donnée, en $\log_{10} \text{DICC}_{50}$.

Source: Peetermans JH, Colinet G (117).

Dans une étude concertée de l'OMS portant sur 46 échantillons, 12 stabilisés par le saccharose et les autres par le MgCl_2 , 83 % des premiers et 91 % des seconds ont perdu moins de $0,5 \log_{10} \text{DICC}_{50}$ après incubation à 37 °C pendant 48 heures. La perte moyenne a été de $0,34 \log_{10} \text{DICC}_{50}$ quel que soit le stabilisant (157). Il est évident que le saccharose tamponné peut être un agent stabilisant efficace dans la mesure où le pH est soigneusement contrôlé.

Il est également possible de stabiliser les vaccins contre l'inactivation par la chaleur en ajoutant des acides gras ou des composés voisins. L'incubation d'un poliovirus Sabin de type 1 en présence d'acide myristique à 45 °C pendant 30 minutes a provoqué une réduction du pouvoir infectant de 19 %, contre 99 % pour l'incubation sans l'adjonction de cet acide gras (36). On a également observé une stabilisation thermique avec les poliovirus incubés en présence des acides hexanoïque, octanoïque et palmitique. La présence de ces agents stabilisants pendant le chauffage pourrait prévenir les changements de conformation au niveau de la capsid qui enlèvent au virus son pouvoir infectant.

L'eau lourde (D_2O) a également un effet stabilisant sur les poliovirus. Avec ses fortes liaisons hydrogène, elle peut protéger les protéines de la dénaturation et renforcer la thermostabilité des souches virales. Le pouvoir infectant de trois souches de VPO traitées par D_2O et MgCl_2 et exposées à 37 °C pendant 7 jours est resté dans les limites des normes, c.-à-d. qu'elles n'ont pas perdu plus de $0,5 \log_{10} \text{DICC}_{50}$ (166). Malgré l'augmentation considérable de la thermostabilité du VPO lorsqu'on remplace l'eau par de l'eau lourde, les recherches n'ont pas été poursuivies dans cette voie, principalement pour les raisons suivantes :

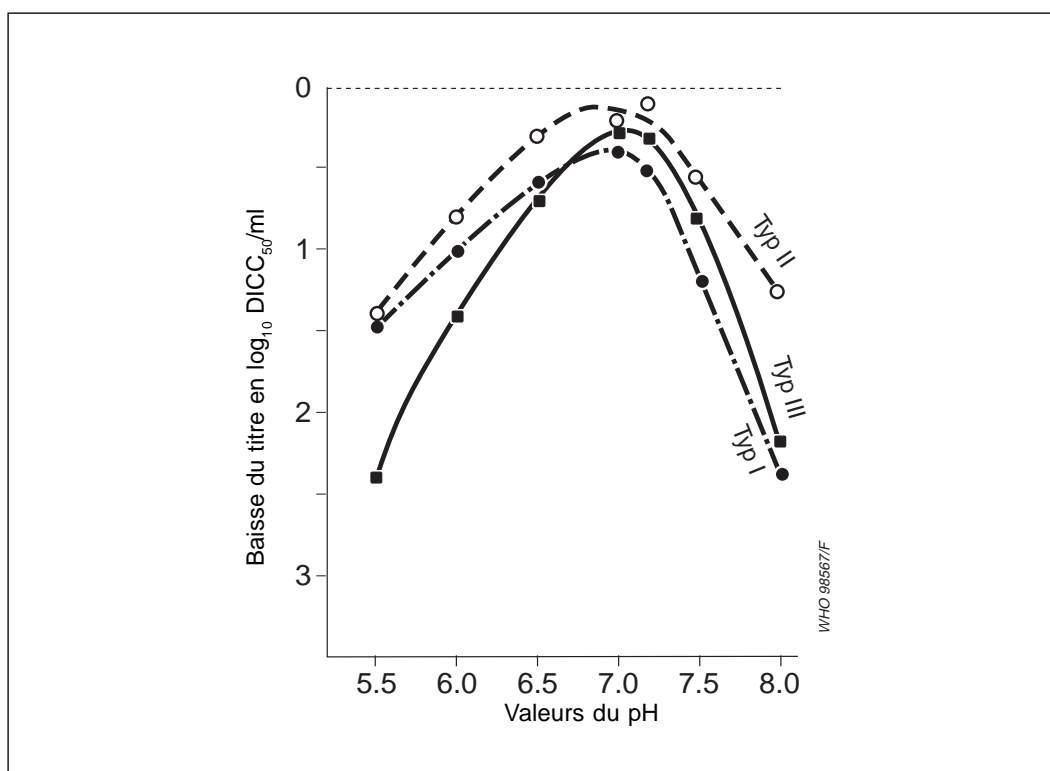
- les VPO disponibles sont suffisamment thermostables pour obtenir l'éradication de la poliomyélite ;
- l'homologation et l'introduction d'un nouveau VPO, en même temps que l'éradication de la polio progresse, présenteraient des inconvénients ;
- on utilise désormais les PCV pour surveiller l'exposition à la chaleur de chaque flacon de VPO.

10.5.3 Valeurs du pH des suspensions virales

Melnick et Wallis ont montré l'importance des valeurs du pH dans le maintien de la stabilité des VPO (105). Le pH a augmenté pour tous les vaccins testés, avec une augmentation bien plus marquée pour les flacons à fermeture non hermétique que pour ceux scellés. Dans les flacons à fermeture hermétique, les vaccins ayant un pH initial de 6,0 - 6,4 n'ont manifesté aucune baisse sensible de leur pouvoir infectant au bout de 20 jours à des températures de 25 à 28 °C avec, à la fin de l'observation, une baisse du titre limitée à 0,1 - 0,2 \log_{10} DICC₅₀. Les échantillons dans des flacons non hermétiques ont perdu rapidement leur pouvoir infectant, ce qui est clairement dû à l'augmentation du pH.

Mauler et Grushkau, qui ont étudié les vaccins antipoliomyélitiques monovalents ayant un pH compris entre 5,5 et 8,0, ont fait des observations similaires. Au bout de 3 jours à 37 °C, on a constaté les plus fortes diminutions pour les valeurs extrêmes du pH, 5,5 et 8,0 (Fig. 14) (101). Les vaccins antipoliomyélitiques ont montré une stabilité remarquable pour les pH compris entre 6,5 et 7,2.

Figure 14. Effet du pH sur la stabilité des poliovirus atténués à 37 °C pendant trois jours



Source : Mauler R, Grushkau H (101).

Le maintien du pH dans cette gamme de valeurs est possible en évitant que les vaccins qui renferment du bicarbonate ne libèrent du dioxyde de carbone, ce que l'on réalise en réduisant au minimum la quantité d'air présente au-dessus de la solution vaccinale et en conditionnant les vaccins dans des récipients hermétiquement fermés.

10.6 Résumé

Les VPO, tels qu'ils sont fournis par les fabricants sont stables pendant une période prolongée à - 20 °C, pendant plus de six mois entre 2 et 8 °C et pendant plus de 48 heures à 37 °C. Les PCV permettent de mieux respecter les limites de thermostabilité de ces vaccins.

III^e Partie :

Analyse de la stabilité des vaccins

— autres vaccins viraux

11. Vaccin antipoliomyélitique inactivé

La chaleur, la lyophilisation et l'addition de merthiolate (thiomersal) détruisent la capacité du poliovirus à produire des anticorps neutralisants. Comme nous l'avons dit plus haut, la composante polio du vaccin quadruple DTC-polio n'est pas stable quand on utilise le merthiolate comme conservateur. Beale et Ungar (13) ont mis en évidence une chute rapide de l'activité de l'antigène polio dans un vaccin tétravalent conservé par le merthiolate, l'EDTA sodique et à 4 °C. Un autre lot de vaccins tétravalents sans thiomersal, mais contenant la moitié de la quantité d'EDTA sodique, s'est révélé stable pendant une durée d'un an. Ces observations se sont confirmées récemment avec le vaccin antipoliomyélitique inactivé hautement actif (eIPV), associé au DTC. Le stockage de l'eIPV à + 4 °C en présence de merthiolate réduit l'activité antigénique du poliovirus de type 1 à des niveaux indécélables en quatre à six mois. Les antigènes de types 2 et 3 sont moins affectés par une exposition au merthiolate pendant huit mois à 4 °C (126). Il convient d'étudier davantage l'incompatibilité du vaccin eIPV et DTC conservé par le merthiolate.

Il semble qu'il existe des différences dans la thermostabilité des divers types de poliovirus inactivés, le type 1 étant le plus vulnérable. En l'absence de tout conservateur, la composante type 1 du vaccin antipoliomyélitique inactivé trivalent se dégrade lentement après deux ans de stockage à 4 °C, tandis que les deux autres types demeurent efficaces pendant 20 ans. La teneur en antigène D pour le type 1 a baissé sensiblement au bout de 20 jours à 24 °C et elle est devenue indécélable après exposition à 32 °C durant la même période. On n'a observé aucun changement significatif de la valeur en antigène D pour le type 2 avec l'une ou l'autre de ces températures, alors que le type 3 est resté stable pendant 20 jours à 24 °C et a décliné sensiblement à 32 °C (110).

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 d'un à plus de 4 ans. C'est le cas du vaccin DT-polio adsorbé sur de l'hydrate d'aluminium, conservé par du chlorure de benzéthonium (110) et du vaccin DTC-polio adsorbé sur du phosphate d'aluminium sans conservateur ou avec du phénoxyéthanol ou du formaldéhyde (146). Un stockage prolongé s'est traduit par une baisse du pouvoir antigénique, notamment pour la composante de type 1 (110).

À 37 °C, la teneur en antigène D de la composante poliomyélite du vaccin quadruple diminue au cours du stockage, mais l'activité est conservée en grande partie après 8 semaines. Le type 3 semble être la composante la plus stable (146).

12. Vaccin antiourlien

Les deux composantes du vaccin antiourlien-antirougeoleux 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 log₁₀ 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 (31).

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 des températures allant de 20 à 56 °C (102). La composante ourlienne dans les ROR indiens montre une bonne stabilité à 37 °C pendant 21 jours ; lors d'une exposition de 30 jours à 37 °C, elle a perdu 0,9 log₁₀, soit environ 0,03 log₁₀ par jour, avec des demi-vies d'environ 10 jours (73).

13. Vaccin antirubéoleux

Le vaccin antirubéoleux monovalent lyophilisé et la composante rubéole des vaccins bivalents (rougeole-rubéole ou oreillons-rubéole) ou du ROR présentent de faibles taux de dégradation. A 37 °C, la baisse moyenne du titre va de 0,046 à 0,109 log₁₀ DICC₅₀ par semaine (102). La composante rubéole du ROR indien présente également une bonne stabilité, la baisse moyenne du titre s'établissant à environ 0,1 log₁₀ DICC₅₀ et la demi-vie à plus de deux semaines (73). Elle semble plus stable que les autres composantes des vaccins viraux associés.

Les normes de stabilité requises par l'OMS pour les vaccins antiourliens et antirubéoleux sont semblables à celles pour le vaccin antirougeoleux. Au moins trois récipients de vaccins monovalents ou de ROR sont mis à incubés à 37 °C pendant sept jours, à la suite de quoi on dose pour chaque vaccin monovalent ou chaque composante individuelle les UFP ou la DICC₅₀ après neutralisation sélective des autres composantes, le cas échéant. La moyenne géométrique du titre viral infectieux doit égaler ou dépasser le nombre minimal requis d'unités infectieuses par dose humaine (3 log₁₀) et elle ne doit pas avoir diminué de plus de 1 log₁₀ d'unités infectieuses au cours de l'incubation (153).

14. Vaccin contre l'hépatite A

L'isolement et l'adaptation du virus de l'hépatite A à la culture cellulaire ont ouvert la voie à l'élaboration de vaccins. Les récoltes de virus, multipliés par culture cellulaire, sont clarifiées, purifiées puis concentrées et inactivées ensuite au formaldéhyde. On utilise comme adjuvants l'hydroxyde ou le phosphate d'aluminium.

Les EDA effectuées sur des lots de vaccins lors de leur mise sur le marché et après stockage pendant 15 mois dans un réfrigérateur n'ont pas révélé de perte d'immunogénicité pour une exposition jusqu'à trois semaines à 37 °C (116). Le vaccin contre l'hépatite A, gardé une semaine à 37 °C, a engendré chez les personnes séronégatives une réponse immunitaire sans différence significative avec celle induite par des vaccins stockés dans des conditions correctes (163).

15. Vaccin contre l'encéphalite japonaise

15.1 Vaccin lyophilisé

On utilise actuellement deux types de vaccins contre l'encéphalite japonaise inactivés par le formol. L'un, dérivé du cerveau de souris, s'emploie en Inde, au Japon, en République de Corée, en Thaïlande et dans d'autres pays, l'autre, qui provient de la culture primaire sur cellules rénales de hamster, en Chine.

Un vaccin lyophilisé produit en Inde est stable, ne subissant une perte d'activité que de 4,7 % en 52 semaines à 4 °C et de 8,7 % en 28 semaines à 22 °C. La dégradation est plus rapide à des températures plus élevées, l'activité diminuant de 14 et 24 % en 18 semaines à 37 et 40 °C respectivement (58).

15.2 Vaccin reconstitué

Après reconstitution, le vaccin reste stable à 22 °C. On constate une baisse de 1 % après deux semaines et une détérioration assez rapide en quatre semaines à 37 et 40 °C (58).

16. Vaccin antirabique

La solution au problème de l'innocuité des vaccins antirabiques consiste à développer des vaccins préparés à partir de virus rabiques obtenus sur des cultures tissulaires exemptes de tissu nerveux (123). Depuis 1976, l'utilisation de vaccins produits en culture de cellules diploïdes humaines (HDCV) s'est généralisée pour la vaccination des humains avant et après exposition. Le HDCV suscite une bien meilleure réponse immunitaire que d'autres comme le DEV (préparé à partir de virus multipliés dans des œufs embryonnés de canard) ou ceux préparés à partir de cerveaux de souris à la mamelle (vaccin Fuenzalida) ou de cervelles de moutons adultes ou de lapins (vaccin Simple).

Sous forme lyophilisée, le HDCV est un vaccin très stable ; il garde son activité pendant au moins 24 mois à des températures comprises entre 2 et 8 °C et pendant un mois à 37 °C (112). Un autre vaccin HDCV est resté stable pendant au moins 18 mois à - 20 °C et + 4 °C et il a résisté à des expositions à 37 °C et 60 °C pendant trois mois (97). Un vaccin HDCV expédié, transporté et stocké à des températures allant de 26 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 entre 2 et 13 °C (111).

Les vaccins provenant de culture sur cellules diploïdes humaines sont difficiles et coûteux à produire. Des efforts intensifs ont été consacrés dans le monde entier à produire des vaccins à faible coût qui puissent suivre ou améliorer les niveaux de sécurité obtenus pour le HDCV (123). Ces nouveaux vaccins sont produits à partir : de cellules d'embryons de poulet (PCEV), développé par le Chiron Institute en Allemagne (ex-Behringwerke), stable pendant trois mois à 37 °C (14) ; de culture primaire sur cellules rénales de hamsters de Syrie (PHK), développé par l'Institut de la Poliomyélite à Moscou (Fédération de Russie) et utilisé en Chine ; de la lignée cellulaire Vero (PVRV), développé par l'Institut Pasteur-Mérieux-Connaught (France) ; d'embryon de canard et purifié (PDEV), développé par le Swiss Serum and Vaccine Institute en Suisse. Tous ont probablement une meilleure stabilité que les anciens vaccins, préparés sur tissu nerveux.

IV^e Partie :

Analyse de la stabilité des vaccins — autres vaccins bactériens

17. Vaccin antiméningococcique polysidique

La dépolymérisation à température ambiante rend instable les polysaccharides purifiés, notamment ceux du groupe A. Les antigènes polysidiques se dépolymérisent facilement et leur masse moléculaire relative diminue à température ambiante. L'étude du degré de polymérisation est par conséquent utile pour évaluer tant l'immunogénicité que la thermostabilité du vaccin.

On recommandait le stockage à - 20 °C pour les premiers vaccins polysidiques du groupe A. A cette température, le taux de dépolymérisation est négligeable. L'immunogénicité du vaccin antiméningococcique est liée à la taille des molécules des antigènes protecteurs, les polysaccharides des groupes A et C, la réponse immunitaire s'accroissant avec le poids moléculaire. La découverte que le remplacement du chlorure de sodium par le lactose pour la lyophilisation stabilise les vaccins polysidiques contre la dépolymérisation thermique, a représenté une étape majeure dans l'obtention de vaccins plus stables (143, 151). Ces vaccins sont fournis sous forme lyophilisée. L'addition d'un stabilisant et la réalisation d'un faible taux d'humidité interne ont grandement amélioré leur stabilité thermique.

Les vaccins antiméningococciques stabilisés à l'état lyophilisé peuvent être conservés jusqu'à deux ans en réfrigérateur (8, 9). 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 (9). 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 (9).

On a signalé qu'un vaccin reconstitué avec un diluant contenant du phénol à la concentration de 0,25 % restait stable pendant deux mois si on le maintenait à - 20 °C, 4 semaines à 4 °C, 2 semaines à 25 °C et 4 jours à 37 °C (8). **En dépit de sa stabilité relative, le vaccin reconstitué sera conservé au réfrigérateur et jeté si on ne l'utilise pas le jour même où il a été reconstitué (151).**

18. Vaccin anti-*Haemophilus influenzae* type B

La stabilité des vaccins polysidiques conjugués, y compris celui contre l'*Haemophilus influenzae* type B (Hib), pourrait dépendre de divers facteurs affectant la force de la liaison entre le polysaccharide et le support protéique. Bien qu'on dispose de peu d'informations sur ces vaccins, les résultats préliminaires indiquent que le vaccin anti-Hib lyophilisé (vaccin conjugué à l'anatoxine tétanique renfermant un polysaccharide capsulaire, le PRP-T [polyribosyl-ribitol-phosphate]) est stable pendant 36 mois au réfrigérateur, et au moins 24 mois à 25 °C. Les vaccins anti-Hib reconstitués monovalents ou associés à d'autres vaccins (DTC, DTC-HB ou DTC-VPI) doivent être détruits après la séance de vaccination ou dans les six heures. Le vaccin anti-Hib liquide monovalent et le DTC-anti-Hib liquide sont stables au réfrigérateur pendant 24 mois. Dans les présentations multidoses, ils peuvent être utilisés lors de séances ultérieures, même s'ils ont été ouverts, conformément à la déclaration de l'OMS sur l'utilisation des flacons ouverts de vaccins lors de séances ultérieures de vaccination (161)

19. Vaccins antityphoïdiques

Dans le passé, les vaccins parentéraux antityphoïdiques à cellules entières tuées ont été utilisés couramment mais ils entraînaient fréquemment des douleurs et des tuméfactions locales, de la fièvre, des céphalées et un état de malaise général.

On a utilisé ces dernières années trois vaccins contre la typhoïde : le vaccin parentéral conjugué au support protéique du polysaccharide Vi, des souches atténuées de *Salmonella typhi* utilisées comme vaccin oral vivant et des vaccins oraux inactivés à cellules entières (88).

Le vaccin au polysaccharide Vi est très stable et la chaîne du froid n'est pas nécessaire, même en pays tropical. C'est le net avantage qu'il présente.

Les vaccins oraux vivants renferment la Ty21, un mutant de *S. typhi*, et doivent être conservés à 4 °C. La durée de vie des vaccins lyophilisés dépend de l'humidité résiduelle et du maintien de la chaîne du froid. Près de la moitié des erreurs d'observance constatées chez des voyageurs américains étaient imputables à de mauvaises conditions de stockage (32). On a associé les échecs vaccinaux chez les voyageurs suisses à des vaccins qui n'ont pas été gardés à l'état réfrigéré (67). Une conservation prolongée à température ambiante a entraîné progressivement la diminution du nombre des particules viables bien que tous les lots testés après stockage pendant 7 jours à 20 - 25 °C aient répondu aux normes d'activité. Trois lots de vaccin conservés pendant 12 heures à 37 °C ont également gardé leur activité (32).

20. Vaccin anticholérique

Bien que, d'après les recommandations de l'OMS, l'utilisation des vaccins anticholériques ne se justifie plus dans aucun cas ni à aucun âge, on les trouve toujours dans le commerce dans de nombreux pays.

Récemment, des vaccins oraux à cellules entières tuées associés à la sous-unité B (vaccin WC/BS) ont été développés pour tenter de stimuler la réponse immunitaire locale de la muqueuse intestinale d'une manière semblable à celle induite par l'exposition naturelle (127). Les conditions de stockage requises pour les vaccins oraux tués sont semblables à celles prévalant pour les anciens vaccins parentéraux (le vaccin est stable pendant trois ans au réfrigérateur entre 2 et 8 °C).

Le vaccin CVD103 HgR oral vivant est un autre vaccin récemment mis au point. Comme la souche vaccinale est vivante, il convient de préserver la viabilité des bactéries lors du stockage et la nécessité d'une chaîne du froid efficace est probable.

V^e Partie :

Conclusions

La stabilité des vaccins varie beaucoup. On peut les classer en fonction de leur résistance au stockage à des températures élevées, les anatoxines diphtérique et tétanique ainsi que le vaccin contre l'hépatite B étant les plus thermostables, le vaccin antirougeoleux lyophilisé, le vaccin anti-amaril et le BCG occupant une position intermédiaire et le vaccin antipoliomyélitique oral étant le plus fragile. Les vaccins reconstitués contre la rougeole, la fièvre jaune et la tuberculose (BCG) sont instables ; il convient de les utiliser le plus rapidement possible après leur reconstitution, de les conserver dans un bain glacé au cours de la séance de vaccination et de les jeter à la fin.

Les données présentées montrent que certains vaccins peuvent résister à de longues périodes d'exposition sans baisse significative de l'activité. La forte résistance de l'anatoxine tétanique et du vaccin contre l'hépatite B à la chaleur pourrait justifier des études sur l'utilisation de ces vaccins en l'absence de réfrigération. Ils pourraient conserver une activité suffisante lors d'exposition de courte durée à la chaleur lorsqu'on les emploie dans des programmes périphériques pour vacciner contre le tétanos les femmes en âge de procréer ou contre l'hépatite les enfants dans des régions où la chaîne du froid est impossible à maintenir.

Actuellement, on dispose de trois rapports concernant l'utilisation de l'anatoxine tétanique et du vaccin contre l'hépatite B en dehors de la chaîne du froid, sans réfrigération. Une étude a été réalisée en Indonésie avec un dispositif à injection prérempli et à usage unique "Unijet". Ce dispositif a été conservé à température ambiante au domicile des sages-femmes pour des périodes allant jusqu'à un mois. L'étude a révélé que les sages-femmes employaient convenablement et sans risque ce dispositif pour administrer le vaccin contre l'hépatite B aux nourrissons et l'anatoxine tétanique à leurs mères. Aussi bien les personnes traitées que les sages-femmes ont exprimé leur forte préférence pour ce dispositif à usage unique par rapport aux seringues habituelles (140).

Au cours d'une étude en Bolivie, l'acceptabilité d'Unijet, prérempli avec l'anatoxine tétanique et gardé par les sages-femmes à leur domicile sans réfrigération, a été également très bonne. Ce dispositif ne requiert aucun montage, élimine les étapes de remplissage de la seringue et de réglage de la dose et ne requiert ni glace ni récipient pour la conservation au froid. Avec sa capacité à améliorer l'innocuité, à simplifier la logistique et à diminuer le taux de gaspillage, il représente une stratégie potentiellement rentable pour la vaccination dans les régions périphériques (108). En Chine, le taux de séroconversion chez les nourrissons vaccinés contre l'hépatite B

par les sages-femmes et avec des vaccins stockés sans réfrigération n'a pas montré de différence significative avec celui observé chez des enfants vaccinés par les médecins des villages et à l'aide de vaccins conservés réfrigérés (7).

Cependant, toute exposition à des températures élevées entraîne une certaine dégradation du vaccin, même si l'activité restante demeure supérieure au niveau considéré comme nécessaire pour une action immunisante minimale. En outre, chaque exposition à la température ambiante a un effet cumulatif sur l'activité du vaccin. Au niveau des postes de santé périphériques, les vaccins ne pourront pas résister aux températures mentionnées dans le présent document si leur activité a déjà été compromise par des défaillances antérieures de la chaîne du froid. Les données présentées peuvent être utiles aux personnes qui sont impliquées dans les activités de vaccination aux niveaux central et provincial et doivent prendre des décisions 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 demeure un élément extrêmement vulnérable de ces programmes dans les pays en développement à climat tropical. Les pays développés à climat tempéré peuvent également connaître ce genre de problèmes. Dans tous les pays, seule 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 et qu'il est employé avant la date limite d'utilisation figurant sur l'étiquette.

Les tableaux en Annexe présentent un résumé des informations concernant la stabilité des vaccins stockés à des températures variées.

VI^e Partie :

Références

1. **Abou-Zeid C et al.** Effect of the method of preparation of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine on the properties of four daughter strains. *Journal of applied bacteriology*, 1987, **63**: 449-453.
2. **Aleksandrowicz J et al.** Heat stability of potency of bacterial vaccines and tetanus antitoxins. *Prezegląd epidemiologiczny*, 1990, **44**: 333-335.
3. **Aleksandrowicz J et al.** Evaluation of the physico-chemical state of aluminium hydroxide in biopreparations stored at various conditions. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 1990, **42**: 163-170.
4. **Allison LMC et al.** An accelerated stability test procedure for lyophilized measles vaccines. *Journal of biological standardization*, 1981, **9**: 185-194.
5. **Andre FE.** Thermodegradation of lyophilized measles vaccine. *Reviews of infectious diseases*, 1983, **5**: 532-534.
6. **Andrescu V et al.** Influence of temperature on the stability of pertussis vaccine. *Archives Roumaines de pathologies experimentales et de microbiologie*, 1985, **44**: 283-292.
7. **Anonymous.** Hepatitis B vaccine delivery outside the cold chain: the Long-An County, China, example. *Global perspective on hepatitis*, 1991, **2**: 3, (Newsletter of the International Task Force on Hepatitis B and the Programme for Appropriate Technology in Health [PATH]), copy available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
8. **Arickx M et al.** Analysis of a bivalent meningococcal vaccine (A+C). II. Stability. *Annales de la société Belge de médecine tropicale*, 1979, **59**: 267-277.
9. **Artenstein MS.** Infections méningococciques. 4. Stabilité des vaccins polysaccharides du groupe A et du groupe C. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1971, **45**, 287-290.
10. **Arya SC.** Stability of oral polio vaccine at different temperatures. *Vaccine*, 1988, **6**: 298.
11. **Balazs D et al.** Stability of the Romanian dried BCG vaccine in different conditions of storage. *Development in biological standardization*, 1986, **58**: 173-177.

-
12. **Barne M, Bronnert C.** Thermostabilisation du vaccin anti-mariol 17D lyophilisé. I. Essai de substances protectrices. *Journal of biological standardization*, 1984, **12**: 435-442.
 13. **Barne M et al.** Thermostabilisation du vaccin anti-mariol 17D lyophilisé. II. Lots-pilots préparés dans les conditions d'une production industrielle. *Journal of biological standardization*, 1987, **15**: 67-72.
 14. **Barth R et al.** Purified chicken embryo cell rabies vaccine for human use. *Lancet*, 1983, **1**: 700.
 15. **Beale J.** Extrait de : *Report of an informal working group on the production and testing of pertussis vaccines*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1978. (En anglais seulement, document BLG/PNUD/PERT 78.1 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
 16. **Beale AJ, Ungar J.** Potency and stability of combined pertussis, diphtheria, tetanus and poliomyelitis (quadruple) vaccine. *Lancet*, 1962, **2**: 805-808.
 17. **Beauchamp J, Mansoor O.** Temperature and the storage of vaccines. *New Zealand medical journal*, 1992, **105**: 135.
 18. **Begum A et al.** Stability of oral polio vaccine at different temperatures. *Pakistan journal of medical research*, 1993, **32**: 273-274.
 19. **Bhargava I.** Control of measles, mumps and rubella. Churchill Livingstone, New Delhi, 1996.
 20. **Bhushan K et al.** Freeze dried BCG vaccine sealed in presence of nitrogen. *Indian journal of medical research*, 1975, **63**: 1335-1343.
 21. **Bishai DM et al.** Vaccine storage practices in pediatric offices. *Pediatrics*, 1992, **89**: 193-196.
 22. **Boll GK, Barron I, de la Sierra L.** Estabilidad a temperatura de la vacuna antipoliomielitica de virus atenuados elaborados en el Instituto Nacional de Virología. *Salud publica de Mexico*, 1979, **21**: 263.
 23. **Briggs H, Ilett S.** Weak link in vaccine cold chain. *British medical journal*, 1993, **306**: 557-558.
 24. **Bunch Christensen K.** *The thermostability of different BCG products*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1981. (En anglais seulement, document BLG/Tb/81.118 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
 25. **Burfoot C, Yound PA, Finter NB.** The thermal stability of a stabilized 17D yellow fever virus vaccine. *Journal of biological standardization*, 1977, **5**: 173-179.

-
26. **Canadjija I.** *Stability testing of pertussis vaccines prepared from different B. pertussis strains.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1979. (En anglais seulement, document BLG/PRT/79.16 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
 27. **Cheriyen E.** Monitoring the vaccine cold chain. *Archives of disease in childhood*, 1993, **69**: 600-601.
 28. **Cheyne J.** Vaccine delivery management. *Reviews of infectious diseases*, 1989, **11** (Suppl. 3): S617-S622.
 29. **Cohen H, Bos JM.** The influence of storage at 37°C on the potency of freeze dried and reconstituted live measles vaccine. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 95-101.
 30. **Cohen H, van Ramshorst JD, Tasman A.** Consistency in potency assay of tetanus toxoid in mice. (Résumé en français). *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1959, **20**: 1133-1150.
 31. **Colinet G, Rossignol J, Peetermans J.** A study of the stability of a bivalent measles-mumps vaccine. *Journal of biological standardization*, 1982, **10**: 341-346.
 32. **Cryz SJ.** Post-marketing experience with live oral Ty21a vaccine. *Lancet*, 1993, **341**: 49 -50.
 33. **Csizer Z, Zsidai J, Joo I.** Factors influencing the stability of acid-precipitated polyvalent *Bordetella pertussis* bulk suspensions. *Acta microbiologica academiae scientiarum Hungaricae*, 1975, **22**: 83-93.
 34. **Csizer A, Zsidai J, Joo I.** Stability of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccines. suspensions. *Acta microbiologica academiae scientiarum Hungaricae*, 1978, **25**:1-9.
 35. **Deivanayagam N et al.** Potency of oral polio vaccine stored at distribution centres in Madras. *Indian journal of paediatrics*, 1990, **57**: 757-761.
 36. **Dorval BL, Chow M, Klibanov AM.** Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochemical and biophysical research communications*, 1989, **159**: 1177-1183.
 37. **Durand JP et al.** Étude de la stabilité d'un nouveau vaccine amaril 1D thermostable. *Journal of biological standardization*, 1988, **16**: 1-7.
 38. **Edsall G et al.** Significance of the loss of potency in the pertussis component of certain lots of "quadruple antigen". *New England journal of medicine*, 1962, **267**: 687-689.
 39. **Evans M, Pope M.** Vaccine handling and storage in general practice. *Health trends*, 1995, **27**: 124-126.

-
40. **Programme élargi de vaccination.** Effet de la congélation et de la décongélation sur la conservation de l'activité des vaccins. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1977, 52: 199.
 41. **Programme élargi de vaccination.** Thermostabilité des vaccins. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1980, 55: 252 - 256.
 42. **Programme élargi de vaccination.** Effets de la congélation sur l'aspect, l'activité et la toxicité des vaccins DTCoq adsorbés et non-adsorbés. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1980, 55: 385-389 and 396-398.
 43. **Programme élargi de vaccination.** Contrôle de la chaîne du froid. Tunisie. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1984, 59: 157-160.
 44. **Programme élargi de vaccination.** Thermostabilité des vaccins anticoquelucheux. Yougoslavie. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1985, 60: 300-301.
 45. **Programme élargi de vaccination.** Assurer le fonctionnement de la chaîne du froid. Module de formation pour les gestionnaires au niveau intermédiaire. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1985 (Edition révisée).
 46. **Programme élargi de vaccination.** Evaluation de la chaîne du froid, Népal, Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1988, 63: 60-62.
 47. **Programme élargi de vaccination.** Evaluation de la chaîne du froid, Inde, Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1988, 63: 193-196.
 48. **Programme élargi de vaccination.** Thermostabilité des vaccins antipoliomyélitiques et antirougeoleux, Pologne. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1988, 63: 349-352.
 49. **Programme élargi de vaccination.** Stabilité du vaccin antipoliomyélitique après congélation et décongélation répétées. Organisation mondiale de la Santé, Genève, *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1990, 65, 207-210.
 50. **Programme élargi de vaccination.** Tests of the freezing point of vaccines. *Cold chain newsletter*, 1990, 90.3: 5. (En anglais seulement).
 51. **Programme élargi de vaccination.** EPI information system. *Global summary*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1996. (En anglais seulement, document WHO/EPI/CEIS/96.07 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
 52. **Finter NB et al.** Effects of adverse storage on live virus vaccines. *Developments in biological standardization*, 1978, 41: 271-276.

-
53. **Freudenstein H.** Successful stabilization of BCG vaccines in ampoules sealed under protective gas. *Journal of biological standardization*, 1978, **6**: 243-253.
 54. **Galazka A.** *Stabilité des vaccins*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1989. (Document WHO/EPI/GEN/89.8 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse).
 55. **Georges AJ et al.** Thermostability and efficacy in the field of a new, stabilized yellow fever virus vaccine. *Vaccine*, 1985, **3**: 313-315.
 56. **Gheorghiu M, Kosloff F, De Rudder J.** Étude de la thermostabilité du vaccin BCG intradermique lyophilisé (Souche de L'Institut Pasteur). *Progress in immunological standardization*, 1972, **5**: 437-661.
 57. **Gheorghiu M, Lagrange PH.** Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. *Annales d'immunologie (Institut Pasteur)*, 1983, **134 C**: 125-167.
 58. **Gowal D et al.** Thermostability of Japanese encephalitis vaccine produced in India. *Biologicals*, 1990, **19**: 37-40.
 59. **Gray A.** Stability of measles vaccine. *Development in biological standardization*, 1978, **41**: 265-266.
 60. **Gupta RK et al.** The effect of different inactivating agents on the potency, toxicity and stability of pertussis vaccine. *Journal of biological standardization*, 1987, **15**: 87-98.
 61. **Gupta RK et al.** Effects of elevated temperatures on the opacity and toxicity of pertussis vaccine manufactured with different inactivating agents. *Vaccine*, 1986, **4**: 185-190.
 62. **Hanjeet K et al.** Evaluation de la surveillance de la chaîne du froid dans l'Etat du Kelantan, Malaisie. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1996, **74**, 391-397.
 63. **Haworth EA et al.** Is the cold chain for vaccines maintained in general practice? *British medical journal*, 1993, **307**: 242-244.
 64. **Henzell MC.** Handling and storage of vaccines in Bay of Plenty general practices. *Communicable diseases*, New Zealand, 1992, **92**: 65.
 65. **Heyman DL et al.** Further field testing of the more heat-stable measles vaccines in Cameroon. *British medical journal*, 1982, **285**: 531-533.
 66. **Heyman DL et al.** Field trials of a heat stable measles vaccine in Cameroon. *British medical journal*, 1979, **2**: 99-100.
 67. **Hirschel B et al.** Inefficacy of the commercial live oral typhoid vaccine in the prevention of typhoid fever. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 1985, **4**: 295-298.
 68. **Hunter S.** Storage of vaccines in general practice. *British medical journal*, 1989, **299**: 661-662.

-
69. **Ikic D et al.** Testing of stability of freeze dried and fluid pertussis vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 205-212.
 70. **Ikic D et al.** Thermostability of live freeze-dried measles vaccine after reconstitution. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 103-112.
 71. **Institute of Medicine, Washington DC.** *Workshop on temperature-stable vaccines for developing countries: significance and development strategies,* 13-14 April 1987.
 72. **Ishak R, Howard CR.** The thermal stability of yellow fever vaccines. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* 1990, **85:** 339-345.
 73. **Jadhav SS.** Direct information, 1997.
 74. **Janaszek W.** Evaluation of thermostability of lyophilized BCG vaccines with a test of an accelerated thermal degradation. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia,* 1991, **43:** 43-49.
 75. **Janaszek W.** The comparative assays of BCG vaccines of Polish, Danish and Japanese production - laboratory tests. *Przeglad epidemiologiczny,* 1994, **48:** 285-292.
 76. **Jeremijenko A et al.** Improving vaccine storage in general practice refrigerators. *British medical journal,* 1996, **312:** 1651-1652.
 77. **Joo I, Csizer Z, Zsidai J.** Stability of pertussis vaccines and the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines.* Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 181-188.
 78. **Just M, Berger R.** Immunogenicity of a heat treated recombinant DNA hepatitis B vaccine. *Vaccine,* 1988, **6:** 399-400.
 79. **Kendrick P et al.** A study of the stability of pertussis vaccine under different conditions of storage. *American journal of public health,* 1955, **45:** 1131-1137.
 80. **Kindt H et al.** Stability of DTP vaccine. *Journal of biological standardization,* 1974, **2:** 183-187.
 81. **Kohl D.** *Thermostability profile of pediatric vaccines used in the EPI frame.* Kuala Lumpur, 1990 (presented at a meeting on vaccine thermostability).
 82. **Kreeftenberg JG.** *Results of investigations regarding the stability of pertussis vaccine lot 86 of the Rijksinstituut voor de Volkgezondheid.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1979. (En anglais seulement, document BLG/PRT/79.16 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)

-
83. **Kreeftenberg JG.** Personal communication, 1989.
 84. **Krugman RD et al.** Impotency of live virus vaccines as a result of improper handling in clinical practice. *Journal of Pediatrics*, 1974, **85**: 512-514.
 85. **Kumar V et al.** Studies on the stability of tetanus and pertussis components of DTP vaccines on exposure to different temperatures. *Indian journal of pathology and microbiology*, 1982, **25**: 50-54.
 86. **Ladefoged A.** Personal communication, 1989.
 87. **Landi S et al.** Effect of light on freeze-dried BCG vaccines. *Journal of biological standardization*, 1977, **5**: 321-326.
 88. **Levine MM.** Typhoid fever vaccines. Chapter in: *Vaccines*, eds. SA Plotkin, EA Mortimer, II ed. W. Saunders, Philadelphia, 1994, 597-631.
 89. **Lerman SJ, Gold E.** Measles in children previously vaccinated against measles. *Journal of American medical association*, 1991, **216**: 1311-1314.
 90. **Liddle JLM, Harris MF.** How general practitioners store vaccines. A survey in south-western Sydney. *The medical journal of Australia*, 1995, **162**: 366-368.
 91. **Lloyd JS.** Storage of vaccines. *Post Graduate Doctor – Middle East (the journal of prevention, diagnosis and treatment)*, 1984, February: 110-120, copy available on request from the Global Programme for Vaccines and Immunization, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.
 92. **Lugosi L.** Multiple comparison of dried BCG vaccines: stability at 37°C and persistence of strains in the mouse spleen. *Vaccine*, 1984, **2**: 149-156.
 93. **Lugosi L, Battersby A.** Transport et stockage des vaccins en Hongrie : première étude sur la chaîne du froid en Europe, *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1990, **68**, 431-439.
 94. **Magdzik W.** Thermal conditions of storage and transport of vaccines. *Prezegląd epidemiologiczny*, 1987, **41**: 335-342.
 95. **Magrath DI.** Factors affecting the storage life of oral poliovaccine. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 35-44.
 96. **Magrath DI.** Direct information.
 97. **Majer M et al.** A purified human diploid cell rabies vaccine. *Developments in biological standardization*, 1978, **40**: 25-28.
 98. **Mann GF, Allison LM, Zuckerman AJ.** *Stability of poliovirus vaccines*. Manuscrit, 1985. (En anglais seulement, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)

-
99. **Mann GF, Zuckerman AJ.** *Design of a routine test for the thermal stability of poliomyelitis vaccine (oral).* Manuscript, 1985.
 100. **Mann GF et al.** Stability of further-attenuated measles vaccine. *Reviews of infectious diseases*, 1983, 5: 482-486.
 101. **Mauler R, Gruschkau H.** On stability of oral poliovirus vaccines. *Developments in biological standardization*, 1978, 41: 267-270.
 102. **McAleer WJ et al.** Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer. *Journal of biological standardization*, 1980, 8: 281-287.
 103. **Mehta JM.** Personal communication, 1996.
 104. **Melnick JL et al.** Immunogenic potency of MgCl₂ stabilized oral poliovaccine. *Journal of American medical association*, 1963, 185: 406-408.
 105. **Melnick JL, Wallis C.** Effect of pH on thermal stabilization of oral poliovirus vaccine by magnesium chloride. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 1963, 112: 894-897.
 106. **Menon PS et al.** Field trial on frozen and thawed tetanus toxoid. *Indian journal of medical research*, 1976, 64: 25-32.
 107. **Miller, NC, Harris MF.** Les programmes australiens de vaccination infantile en danger ? Enquête sur la chaîne du froid dans le Territoire du Nord *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1994, 72, 401- 408.
 108. **Ministère de la Santé de la Bolivie, Organisation panaméricaine de Santé, Program for Appropriate Technology for Health.** *Evaluation of UniJet prefilled syringe for outreach tetanus immunization in bolivia*, Juin 1996. (En anglais seulement, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
 109. **Mirchamsy H et al.** Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine. *Developments in biological standardization*, 1978, 41: 255-257.
 110. **Moynihan M, Petersen I.** The durability of inactivated poliovirus vaccine: studies on the stability of potency in vivo and in vitro. *Journal of biological standardization*, 1982, 10: 261-268.
 111. **Nicholson KG et al.** Stability of human diploid-cell-strain rabies vaccine at high ambient temperatures. *Lancet*, 1983, 1: 916-918.
 112. **Nicolas AJ et al.** 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. *Developments in biological standardization*, 1978, 40: 17-24.
 113. **Olson BH, Eldering G, Graham B.** Stabilization of pertussis vaccine in the presence of benzethonium chloride. *Journal of bacteriology*, 1964, 87: 543-546.

-
114. **Patriarca PA et al.** Randomized trial of alternative formulations of oral poliovaccine in Brazil. *Lancet*, 1988, 1: 429-432.
 115. **Patriarca PA, Wright PF, John TJ.** Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine in developing countries: review. *Reviews of infectious diseases*, 1991, 13: 926-939.
 116. **Peetermans J.** Production, quality control and characterization of an inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine*, 1992 10 (Suppl. 1): S99-S101.
 117. **Peetermans JH, Colinet G.** Production, control and stability of live poliovirus vaccine. *Proceedings of Smith Kline-RIT Symposium on Potency and Efficacy of Vaccines*. Manila, February 1980.
 118. **Peetermans J, Colinet G, Stephenne J.** Activity of attenuated poliomyelitis and measles vaccines exposed at different temperatures. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 61-65.
 119. **Peetermans J et al.** Stability of freeze dried and reconstituted measles vaccines. *Developments in biological standardization*, 1978, 41: 259-264.
 120. **Perkins FT.** The need for stable vaccines in the developing countries. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 23-31.
 121. **Perkins FT, Magrath DI.** *The potency of stabilized oral poliovaccines*. Stockholm, European Poliomyelitis Association, 9th Symposium, 1962, 371-375.
 122. **Pittman M.** Instability of pertussis vaccine component in quadruple antigen vaccine. *Journal of American medical association*, 1962, 181: 25-30.
 123. **Plotkin SA, Koprowski H.** Rabies vaccines, chapter in: *Vaccines*, eds. SA Plotkin, EA Mortimer, II ed., WB Saunders, Philadelphia, 1994, 649-670.
 124. **Rao YU, William J, Kalyanaraman VR.** A study of the stability of the pertussis component of diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccines. *Journal of biological standardization*, 1985, 13: 267-270.
 125. **Robin Y et al.** Étude de la thermostabilité du vaccin antiamaril sur des échantillons de huit lots provenant de divers pays. *Bulletin of the World Health Organization*, 1971, 44: 729-737.
 126. **Roche JC et al.** Comparative clinical study of a new 17D thermostable yellow fever vaccine. *Vaccine*, 1986 4: 163-165.
 127. **Sack DA, Cadoz M.** Cholera vaccines, chapter in *Vaccines*, eds. SA Plotkin, EA Mortimer, II ed. WB Saunders Philadelphia, 1994, 635 -647.
 128. **Sawyer LA et al.** Deleterious effect of thiomersal on the potency of inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*, 1994, 12: 851-856.

-
129. **Sekhyis VM, Freudenstein H, Sirks JL.** Report on results of a collaborative assay of BCG vaccines organized by the International Association of Biological Standardization. *Journal of biological standardization*, 1977, 5: 85-109.
130. **Shmelyova EI.** Study of stability of physical properties and biological activity of liquid and freeze dried adsorbed pertussis-diphtheria-tetanus vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 159-179.
131. **Simba DO, Msamanga GI.** Use of cold chain to assess vaccine exposure to adverse temperatures in rural Tanzania. *East African medical journal*, 1994, 71: 445-446.
132. **Sokhey J et al.** Stability of polio vaccine at different temperatures. *Vaccine*, 1988, 6: 12-13.
133. **Sood DK et al.** Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. *Vaccine*, 1993, 11: 1124-1128.
134. **de Souza Lopez O et al.** Studies on yellow fever vaccine. II. Stability of the reconstituted product. *Journal of biological standardization*, 1988, 16: 71-76.
135. **Sporzynska Z.** Studies on the stability of toxoids. I. The effect of temperature on the immunogenic properties of diphtheria toxoid. *Experimental medicine and microbiology*, 1965, 17: 130-139.
136. **Stainer DW, Hart FE.** The stability of bacterial vaccines at elevated temperatures. *Developments in biological standardization*, 1978, 41: 249-253.
137. **Stainer DW, Lansie S.** Stability of BCG vaccines. *Developments in biological standardization*, 1986, 58: 119-125.
138. **Steinmetz N et al.** Storage conditions of live measles, mumps and rubella virus vaccines in Montreal. *Canadian medical association journal*, 1983, 128: 162-163.
139. **Sudarshan MK et al.** An evaluation of cold chain system for vaccines in Bangalore. *Indian journal of paediatrics*, 1994, 61: 173-178.
140. **Suntano A, Suarnawa IM, Nelson CM et al.** Home delivery of heat-stable vaccines in Indonesia : outreach immunization with a prefilled, single-use injection device. *Accepté pour le Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*. (En anglais seulement.)
141. **Ten Dam HG et al.** Present knowledge on immunization against tuberculosis. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1976, 54 : 255-269. (En anglais seulement.)
142. **Thakker Y, Woods S.** Storage of vaccines in the community: weak link in the cold chain? *British medical journal*, 1992, 304: 756-758.

-
143. **Tiesjema RH, Beuvery EC, Pas BJ**, Accroissement de la stabilité des vaccins antiméningococciques polyosidiques grâce à l'utilisation du lactose comme milieu de lyophilisation. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 1977, 55, 43-38.
 144. **Tydemans MS, Kirkwood TBL**. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards. I. Properties of maximum likelihood estimators. *Journal of biological standardization*, 1984, 12: 195-206.
 145. **Van Damme P et al**. Heat stability of a recombinant DNA hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 1992, 10: 366-367.
 146. **Van Ramshorst JD, van Wezel AL**. The stability of the components of quadruple (DTP polio) vaccines. *Proceedings of the symposium on stability and effectiveness of measles, poliomyelitis and pertussis vaccines*. Zagreb, Yugoslav Academy of Sciences and Arts, 1976, 189-195.
 147. **Wallis C, Melnick JL**. Stabilization of poliovirus by cations. *Texas reports on biology and medicine*, 1961, 19: 683.
 148. **OMS**. Vaccins anti-marijuana. Thermostabilité des vaccins lyophilisés *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 1987, 62, 181-183.
 149. **OMS**. *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives à l'anatoxine diphtérique, au vaccin antioquelet, à l'anatoxine tétanique et aux vaccins associés*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1990 (Série de Rapports techniques, No. 638: 39 - 125).
 150. **OMS**. *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes révisées relatives au vaccin BCG desséché*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1979 (Série de Rapports techniques, No. 638: 126 - 159).
 151. **OMS**. *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives au vaccin antiméningococcique polyosidique*. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1981 (Série de Rapports techniques, No. 658: 188 - 198).
 152. **OMS**. *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives au vaccin antirougeoleux (vivant) Additif 1981*, Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1982 (Série de Rapports techniques, No. 673, Annexe 6).
 153. **OMS**. *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives aux vaccins antirougeoleux, antiourlien et antirubéolique et aux vaccins associés (vivants)* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1982 (Série de Rapports techniques, No. 840, Annexe 3).
 154. **OMS**. *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives au vaccin BCG desséché*. Organisation mondiale de la Santé, 1987 (Série de Rapports techniques, No. 745, 64 - 98).

-
155. **OMS.** *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives au vaccin antiamaril.* Organisation mondiale de la Santé, 1988 (Série de Rapports techniques 771, 223 - 224).
156. **OMS.** Fournitures et assurance de la qualité des vaccins. Surveillance des manifestations post-vaccinales indésirables. 1996, 71: 237-242
157. **OMS.** *Report of Expert Committee on Biological Standardization. Investigation of the thermal stability of current oral poliovirus vaccines. Preliminary summary of results.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1995. (En anglais seulement, document BS/89.1614 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
158. **OMS.** *Rapport Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Normes relatives au vaccin antipoliomyélitique buccal.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1990 (Série de Rapports techniques, No. 800: 31-92).
159. **OMS.** *Liste des laboratoires homologués.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1995 (Série de Rapports techniques).
160. **OMS.** *Utilisation de flacons de vaccins entamés pour les séances de vaccination: déclaration OMS de politique générale.* Genève, Organisation mondiale de la Santé 1995. (Document WHO/EPI/LHIS/95.01, non publié ; disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
161. **OMS.** *Performance specification E6/IN5.* Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1997. (En anglais seulement, document WHO/EPI/LHIS/97.03 non publié, disponible sur demande auprès du Programme mondial des Vaccins et Vaccinations, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.)
162. **Wiedermann G et al.** Thermostability of an inactivated hepatitis A vaccine stored at 37°C for one week. *Journal of medical virology*, 1994, 44: 442.
163. **Wojciak W, Wolska E.** Some physico-chemical changes of the adsorbent used in the diphtheria toxoid-vaccine appearing on its prolonged storage (in Polish). *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 1962, 14: 331-337.
164. **Wojciak W, Wolska E.** Effect of storage on the adsorbent of the combined diphtheria-tetanus prophylactic (in Polish). *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 1963, 15: 133-139.
165. **Wright D, Muggleton PW.** Evaluation of the stability of dried BCG vaccine. *Tubercle*, 1972, 53: 92-99.
166. **Wu R et al.** Thermostabilization of live virus vaccines by heavy water (D₂O). *Vaccine*, 1995, 13: 1058-1063.

Annexe :

Tableaux résumant la stabilité des vaccins

Tableau A : Stabilité des vaccins couramment utilisés dans les programmes nationaux de vaccination

Vaccins ¹	Températures de stockage (°C)			
	0-8	22-25	35-37	Plus de 37
Anatoxines diphtérique et tétanique dans les vaccins monovalents ou en éléments de vaccins associés ²	Stable pendant 3 à 7 ans	Stable pendant des mois	Stable pendant des semaines	A 45 °C : stable 2 semaines A 53 °C : perte de l'activité après quelques jours A 65 °C : perte de l'activité après quelques heures
Vaccin contre l'hépatite B ²	Stable pendant 2 à 4 ans	Stable pendant des mois	Stable pendant des semaines	A 45 °C : stable pendant des jours
Vaccin antirougeoleux ³	Stable pendant 2 ans	Garde une activité satisfaisante (jusqu'à 50 %) pendant au moins un mois	Garde une activité satisfaisante pendant au moins une semaine mais pourrait perdre 20 et 50 % d'activité en 1 - 4 et 2 - 6 jours d'exposition respectivement	A 41 °C : 50 % de perte d'activité après 2 - 3 jours d'exposition ; A 54 °C : 80 % de perte d'activité après un jour d'exposition
Vaccin anti-amari ³	Vaccins stabilisés : stables pendant 2 à 3 ans	50 % de perte après 3 à 10 mois d'exposition	50 % de perte après 10 à 20 jours d'exposition	
Vaccin antioquelucheux ²	Stable pendant 18 à 24 mois malgré une diminution lente et continue de l'activité	Stabilité variée : 2 semaines pour certains vaccins	Stabilité variée : perte d'activité de 50 % pour certains vaccins stockés pendant 1 semaine	A 45 °C : environ 10 % de perte d'activité par jour; A 50 °C : perte rapide de l'activité
BCG ³	Stable pendant 1 an	Stabilité variée : 20 à 30 % de baisse de la viabilité en 3 mois d'exposition	Stabilité variée : 20 % de baisse de viabilité en 3 à 14 jours d'exposition	Instable. A 70 °C : 50 % de baisse en 30 mn d'exposition
Vaccin antipolio-myélitique oral ³	Stable pendant 6 à 12 mois	Certains vaccins conservent leur titre après 1 à 2 semaines d'exposition	Instable. Utilisation des PCV. Le titre n'est plus satisfaisant en 1 à 3 jours	Très instable. A 41 °C : 50 % de perte en un jour. A 50 °C : le titre satisfaisant disparaît en 1 à 3 heures d'exposition

1. Ces données concernent les vaccins antirougeoleux, anti-amari et le BCG lyophilisés ; les autres vaccins se présentent sous forme liquide. Les vaccins reconstitués perdent rapidement leur activité et il faut les jeter à la fin de chaque séance de vaccination. Le BCG reconstitué ne renferme aucun agent bactériostatique et il existe un risque de contamination. Le vaccin anti-amari reconstitué doit être administré rapidement après reconstitution (dans l'heure qui suit). Si l'on peut le garder continuellement dans un bain glacé, on peut l'utiliser tout au long d'une séance de vaccination, mais il faut le jeter ensuite.
2. Vaccins adsorbés sur sels d'aluminium. Il ne faut jamais les congeler.
3. Stockage optimal à long terme à - 25 °C ou à des températures inférieures. Il convient de garder à part le diluant et de ne jamais congeler celui-ci.

Tableau B : Stabilité des autres vaccins viraux et bactériens

Vaccins ¹	Températures de stockage (°C)			
	0-8	22-25	35-37	Plus de 37
Vaccin antipolio-myélique inactivé	Stable pendant 1 à 4 ans	Diminution de la teneur en antigène D ¹ du type 1 en 20 jours	Disparition de la teneur en antigène D du type 1 dans certains vaccins	Pas de données précises disponibles
Vaccin anti-méningococcique polysidique	Stable pendant 2 ans	Vaccin du groupe A : stable pendant 12 jours ; groupe A + C : stable pendant des mois	Demi-vie ² : 4 semaines	Pas de données disponibles
Vaccin antirabique obtenu par culture sur cellules diploïdes humaines	Stable pendant 3,5 ans	Conservation de l'immunogénicité après expédition, transport et stockage de 11 semaines	Stable pendant 4 semaines	Pas de données disponibles
Vaccin contre l'encéphalite japonaise	Stable pendant un an ; baisse d'activité d'environ 5 % en 52 semaines de stockage	Stable pendant 20 semaines ; baisse d'activité d'environ 9 % pendant cette durée de stockage	Stable pendant 6 semaines ; baisse d'activité d'environ 14 % pour 18 semaines de stockage	A 40 °C : baisse d'activité d'environ 10 % après 2 semaines de stockage et de 27 % après 6 semaines
Vaccin antityphoïdique oral vivant Ty21	Réfrigération nécessaire. La durée de vie dépend de la teneur en humidité résiduelle	Le stockage prolongé entraîne une diminution progressive du nombre des particules viables	Diminution rapide du nombre des particules viables. Garde une activité minimale après 12 heures d'exposition	Pas de données disponibles

1. La teneur en antigène D est établie *in vitro* par la méthode ELISA. Les normes pour le VPI sont exprimées en unités d'antigène D ; les VPI à activité renforcée renferment 40, 8 et 32 unités d'antigènes D des types 1, 2 et 3 respectivement.
2. Demi-vie : temps au bout duquel on constate une baisse de 50 % de l'activité initiale.