

La vaccination a révolutionné la santé de l'enfant dans le monde entier en évitant chaque année des millions de décès et en réduisant les risques d'handicap que causent les maladies infectieuses. Aujourd'hui, la vaccination est le moyen le plus rentable et efficace, en terme de coût, pour la prévention de ces maladies, et certainement le plus simple.

Des programmes de vaccination bien gérés ont permis de réduire considérablement la morbidité et la mortalité dues aux maladies dans la plupart des pays. Une maladie majeure, la variole, a été totalement éradiquée en grande partie grâce à la vaccination, et une autre, la poliomyélite, a disparu d'une bonne partie de la surface du globe et pourrait être éradiquée dans les prochaines années, tandis que l'incidence de la rougeole a beaucoup diminué.

Ces réalisations considérables ont été possibles, en partie, grâce à des principes et procédures efficaces, reconnus au niveau international. Ils ont permis de garantir un niveau élevé d'innocuité, d'efficacité et de qualité des vaccins.

Les vaccins ont de particulier qu'ils sont généralement administrés à un grand nombre de personnes en bonne santé, pour la plupart des nourrissons et des enfants, dans le cadre des programme de santé publique ; c'est pourquoi l'innocuité et la qualité de ceux-ci sont essentielles.

Les vaccins qui n'ont pas été fabriqués et testés selon des normes adéquates peuvent être dangereux pour la santé et risquent de ne pas protéger contre les maladies infectieuses. A la fin des années 90, par exemple, un « faux » vaccin contre la méningite a fait son apparition, il ne contenait aucun ingrédient actif mais a été distribué au Niger où se déclaraient de nombreux cas de la maladie. En l'absence d'autorités de réglementation, les vaccins de contrefaçon risquent de s'infiltrer et provoquer des dégâts mortels.

En raison de ces risques potentiels pour la santé publique, l'OMS recommande qu'un contrôle de chaque lot de vaccin avant sa commercialisation doit être réalisé par les autorités de santé en supplément de ceux réalisés par les fabricants. Ces contrôles sont destinés à vérifier la conformité des lots avec les référentiels en vigueur (Pharmacopée Européenne et /ou recommandations de l'OMS) et les spécifications approuvées dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Après une présentation de l'histoire du vaccin au fil des années, nous nous attacherons dans ce travail, dans un premier temps, à appréhender quelques rappels sur les bases de la vaccination, le programme élargi de vaccination en donnant un aperçu sur le programme national de vaccination, puis dans un deuxième temps, à faire le point sur la production vaccinale et les modalités de conservation des vaccins qui permettent de garantir leur efficacité depuis leur production jusqu'à leur administration. Enfin, nous terminons par une étude de la démarche à suivre par le laboratoire nationale de contrôle des médicaments pour la mise en circulation des lot de vaccin, tout en passant en revue le processus de contrôle et les différents contrôles de qualité des vaccins utilisés par le calendrier national de vaccination.

CHAPITRE I : VACCINS ET VACCINATION :

1. HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DES VACCINS A USAGE HUMAIN :

1.1. La période prémoderne :

Le principe de la vaccination est né de façon empirique, en Chine, il y a plus de 1000 ans. A cette époque, la variole sévissait sous forme d'épidémie grave. Les médecins chinois avaient observés que les patients, ayant réchappé à la maladie, ne récidivaient pas.

Dès XVII^{ème} siècle, ils utilisent un procédé d'inhalation : des cotons recouverts de pus frais ou de squames desséchés varioliques sont introduits dans les narines d'un individu sain pour le prémunir contre la maladie. A partir de la moitié du XVIII^{ème} siècle, cette méthode fut introduite en Europe. Cependant, celle-ci dénommée « variolisation » était dangereuse, la variole inoculée pouvait se révéler et provoquer la maladie dans toute sa sévérité.[11, 77, 87]

1.2. La période Jenner-Pasteur :

1.2.1. Jenner : la vaccination par des microbes atténués naturellement :

Il connaît le principe de la variolisation après l'avoir été soumise en tant qu'enfant et après l'avoir appliquée en tant que médecin. Aussi, il sait depuis longtemps, comme d'autres, que les fermières en contact avec des vaches infectées par la variole de la vache, deviennent résistantes à la variole humaine. Alors, il étudie la variole de la vache - la vaccine- (cowpox en anglais) et conclut qu'elle est constamment bénigne chez l'homme.

Ainsi, le 14 mai 1796, il inocule par scarification en deux points, à un garçon de 8 ans, James Phipps, le liquide d'une pustule d'une fermière atteinte de vaccine. Moins de 2 mois plus tard, Jenner inocule la variole humaine au garçon qui n'en sera pas affecté. L'idée de la vaccination avec un microbe différent est faite. Bien que déjà connue, Jenner en a tiré parti sur le plan médical. [32, 77]

1.2.2. Pasteur : la vaccination par des microbes atténués artificiellement :

Il faudra attendre Pasteur et près d'un siècle pour que l'idée de la vaccination soit étendue à d'autres maladies infectieuses. Ses premiers travaux concernent le choléra des poules. Pasteur démontre que l'inoculation d'une culture virulente de choléra des poules n'entraîne pas la mort des animaux ayant reçu préalablement une culture atténuée, alors que les animaux témoins meurent de la maladie (1878). Par la suite, il appliqua cette méthode au charbon du mouton (1881). Par ses travaux, Pasteur a découvert le principe général de l'atténuation des agents infectieux, permettant ainsi le développement de la vaccination. La première vaccination humaine est réalisée par Pasteur en juillet 1885 sur un jeune garçon, Joseph Meister, mordu par un chien enragé. C'est le vaccin rabique, préparé par Pasteur lui-même dans son laboratoire et minutieusement expérimenté sur de nombreux animaux, avant d'être essayé chez un humain. [87]

1.3. La période « après-Pasteur » :

Les principes établis par Pasteur ont été par la suite étendus à d'autres agents infectieux, ainsi, de nombreux vaccins humains ont été réalisés : vaccins antityphoïdique (Wright, 1896), anti-cholérique (Gamaleïa, 1888), antipesteux (Haffkine, 1895), anatoxines diphtériques et tétaniques (Ramen, 1923), vaccin BCG (Clamette et Guerin, 1924), anatoxines diphtériques et tétaniques (Ramen, 1923), etc...[10].

Le développement des techniques (culture, génie génétique, immunologie...) a très largement contribué à cette extension et a abouti à de nombreux perfectionnements d'une production accrue et diversifiée des vaccins. [8, 87]

2. DEFINITIONS :

2.1. Vaccin :

Le vaccin est un dérivé non pathogène d'un agent microbien ou viral qui, introduit dans l'organisme, induit une résistance spécifique contre cet agent pathogène grâce à l'acquisition d'une immunité cellulaire, humorale ou mixte. Les principaux antigènes (Ag) sont les anatoxines (toxines modifiées) et les agents soit tués, soit vivants et atténués.

Cette résistance se traduit en général par la production d'anticorps (AC) spécifiques de l'agent infectieux et par la formation de cellules mémoires.[78, 90]

2.2. Vaccination :

La vaccination consiste à introduire, chez un individu, une préparation antigénique dérivée ou proche d'un agent infectieux déterminé, de manière à créer une réponse immunitaire capable de le protéger contre la survenue d'une maladie liée à cet agent infectieux. Cette immunoprophylaxie active spécifique est, dans certains cas, très efficace, en faisant un moyen de prévention très utile en santé publique.[78, 14]

3. BASES IMMUNOLOGIQUES :

3.1. Réponses cellulaire et humorale :

Ce sont les lymphocytes T qui sont le support de l'immunité à médiation cellulaire et de la mémoire immunologique et les lymphocytes B, qui se différencient en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines spécifiques, IgM, IgG, IgA, supports de l'immunité humorale.[3, 5]

3.2. Réponses primaire et secondaire :

Le premier contact avec l'antigène est suivi d'une réponse primaire caractérisée par une ascension différée et lente des anticorps qui culmine entre la 2^{ème} et 4^{ème} semaine à un niveau faible, pour décroître ensuite rapidement.

Tout contact ultérieur, même très lointain, avec le même antigène induira une réponse secondaire, mettant en œuvre la mémoire immunologique thymodépendante, caractérisée par une ascension rapide (en quelques jours), importante et durable des anticorps protecteurs. [3]

3.3. Réactions immunitaires :

Se vacciner c'est déclencher une **réponse immunitaire primaire**. Ici, la vaccination constitue le premier contact avec l'antigène.

S'infecter, après s'être vacciné, c'est déclencher une **réponse immunitaire secondaire**. Ici, le second contact est déclenché par l'entrée de l'agent infectieux chez cet individu vacciné, assurant ainsi une réponse dite secondaire, capable de le protéger contre l'infection. La vaccination est donc la sensibilisation préalable d'une personne, au moyen d'un vaccin, afin d'augmenter la rapidité et l'efficacité de la réponse immunitaire contre un agent infectieux. Ceci est possible grâce à la mémoire immunitaire.

En général, l'immunité vaccinale est de type **humoral**, mais elle peut être de type **cellulaire**, comme dans le cas du BCG, ou elle peut être mixte.[13, 77]

La figure 1 illustre le mécanisme d'action des vaccins.

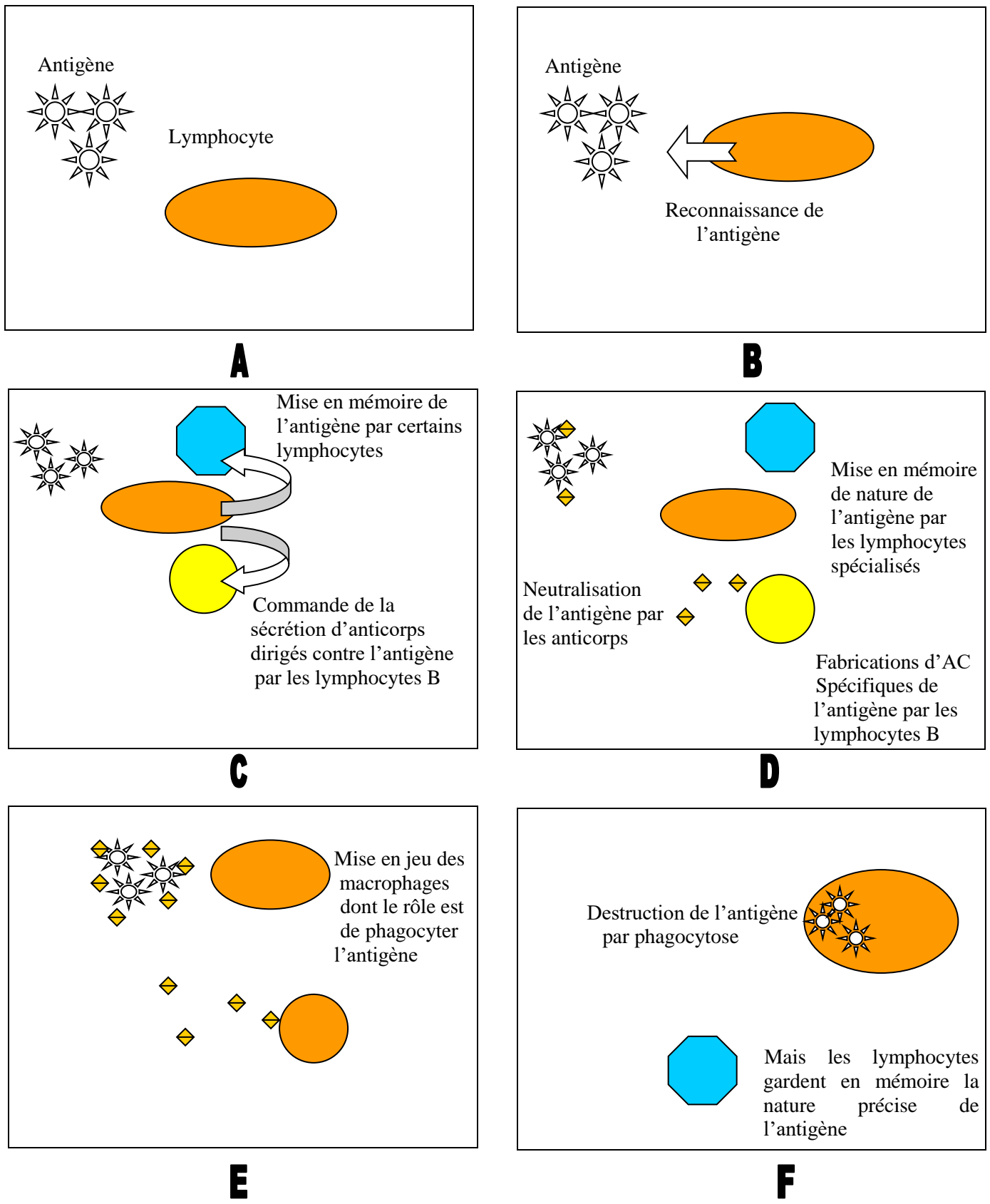


Fig. 1 : Mécanisme d'action des vaccins [87]

4. DIFFERENTS TYPES DE VACCINS :

Vaccins vivants atténués, vaccins tués, et vaccins sous-unités (ou cellulaires) sont encore les grands types de vaccins qui sont en développement aujourd’hui (cf. tableau). [72, 77]

Tableau I : Classification des principaux vaccins à usage humain [48]

Vaccins vivants atténués	
Viraux	Fièvre jaune Rougeole Rubéole Oreillons Poliomyélite (oral) Variole (supprimé) Varicelle
Bactériens	Tuberculose (BCG)
Vaccins inactivés	
Viraux	Poliomyélite (injectable) Rage Hépatite A Grippe
Bactériens	Choléra Coqueluche (« germes entiers ») Typhoïde
Vaccins sous-unités (acellulaires)	
Viraux	Hépatite B (vaccin recombinant)
Bactériens	Haemophilus influenzae type b (polysaccharides) Diphthérie (anatoxine) Tétanos (anatoxine) Pneumocoques (polysaccharides) Méningocoques A et C (polysaccharides) Typhoïde (antigène Vi) Coqueluche (toxine détoxifiée)

4.1. Les vaccins vivant atténués : [77, 79, 81]

Ils conservent leur capacité de se multiplier chez l’homme vacciné, mais ont perdu leurs effets pathogènes (virulence). Ils ont un pouvoir vaccinant plus efficace, car l’immunité induite est de longue durée. Une seule injection est souvent suffisante.

La virulence de l’agent pathogène est atténuée par passages soit sur cultures cellulaires soit sur oeufs embryonnés pour les vaccins vivants atténués conventionnels. Pour les nouveaux vaccins vivants l’atténuation peut se faire génétiquement, en utilisant des techniques permettant d’éliminer ce gène ou de le rendre non fonctionnel : on aboutit à un vaccin vivant génétiquement atténué (cf. figure ci-dessous). Ils ne sont pas dépourvus de risques infectieux (réversion du virus poliomyélite oral).

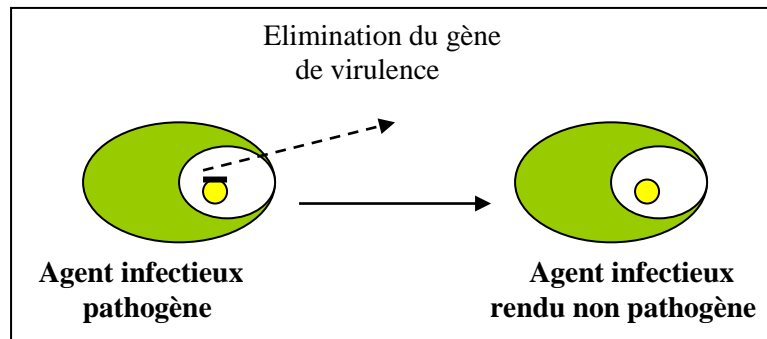


Fig. 2 : Vaccin vivant atténué génétiquement [77]

4.2. Les vaccins inactivés :

Ils sont constitués d'agents infectieux (bactérie ou virus) tués par divers agents physiques et chimiques (la température, divers réactifs chimiques : formol, β propanolactone).

Ils induisent une immunité de plus courte durée, nécessitant des rappels, par comparaison avec les vaccins vivants atténués.[20, 77]

4.3. Les vaccins sous-unités (acellulaires) :

Ces vaccins sont constitués d'une ou de plusieurs molécules immunisantes provenant de l'agent infectieux. Les recherches actuelles privilégient la mise au point de vaccins « moléculaires » comprenant des antigènes purifiés ou produits par génie génétique.

Ils permettent d'éviter d'éventuelles réponses secondaires liées à d'autres composants de l'agent infectieux.

4.3.1. La purification biochimique des molécules :

Selon la nature des molécules (des protéines, des sucres, des lipides, des lipoprotéines, des toxines détoxifiées...), différentes techniques biochimiques sont utilisées pour leur production . Ainsi, les toxines produites par certaines bactéries sont transformées ,par un traitement chimique (formol) et physique (chaleur), en anatoxines, non toxiques mais qui gardent leur immunogénicité. [38, 77]

4.3.2. La synthèse chimique des molécules :

Les techniques modernes ont permis d'établir la séquence complète de certains peptides et leur reconstitution in vitro.

Les peptides se révèlent moins immunogènes que les micro-organismes dont ils sont issus. C'est pourquoi ils sont conjugués à des macromolécules de façon à former un complexe fortement immunogène.[73, 79]

4.4. La production des molécules par génie génétique :

On fait appel à des techniques de génie génétique pour produire des antigènes vaccinaux. On utilise des agents infectieux, non pathogènes, que l'on transforme en « usine » à production de vaccin (ex : des levures, des cellules animales, bactérie E. coli).

Les gènes codant pour une molécule vaccinale sont insérés dans le génome de ces agents qui vont produire alors cette molécule. Il restera à l'extraire et la purifier. On parle ici d'antigène recombinant. [14, 77, 79, 84]

5. VACCINS DU FUTUR :

Aujourd'hui, le développement d'un vaccin est complexe et coûteux. On considère qu'il faut 10 ans de recherche et de développement et 200-500 millions de dollars pour en développer un. Aussi, le contexte réglementaire est de plus en plus exigeant. Les nouvelles technologies comme le génie génétique permettent d'obtenir des vaccins moléculaires, qui répondent mieux à ces exigences. [84, 86]

En effet, les nouvelles voies de recherche devraient permettre l'obtention rapide, en grande qualité, sans grande difficulté et avec un coût moindre de vaccins efficaces dirigés contre un plus grand nombre de maladies, notamment parasitaires, parfois polyvalents (actifs contre plusieurs maladies à la fois), faciles à manipuler, dépourvus d'activité pathogène, non générateurs d'effets secondaires, sans exigences particulières de conservation, pouvant être administrés à grande échelle, faciles à contrôler car exactement définis.[79]

Sont présentées ici les toutes dernières stratégies de recherche en vaccinologie :

5.1. Les vaccins ADN :

Il s'agit ici d'injecter comme vaccin le gène (ADN) codant pour la protéine vaccinale et non plus la protéine. Le vaccin ADN est constitué de plasmides dans lesquels on insère le gène d'intérêt, d'origine eucaryote, codant pour la protéine vaccinale responsable d'une immunité spécifique. Ces vaccins sont capables d'induire une réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) et une réponse immunitaire cellulaire (activation de lymphocytes T cytotoxiques). Deux grandes technologies sont utilisées actuellement pour développer ces vaccins : le vaccin est de l'ADN nu, ou de l'ADN intégré dans le génome d'un vecteur. [14, 41, 77, 84]

5.1.1. Les vaccins recombinants vivants multivalents :

L'idée est d'utiliser des agents infectieux vivants, de les atténuer s'ils sont pathogènes, et de greffer dans leur génome différents gènes qui codent pour des protéines vaccinales provenant d'autres agents infectieux. Ce sont « les vaccins recombinants vivants multivalents » qui devraient permettre de se vacciner simultanément contre plusieurs agents infectieux (cf. figure 3).

5.1.2. Les vaccins ADN nu :

Ici on utilise un petit morceau d'ADN (un plasmide qui est un ADN circulaire) à qui l'on greffe un gène étranger codant pour une protéine vaccinale (cf. figure 4).

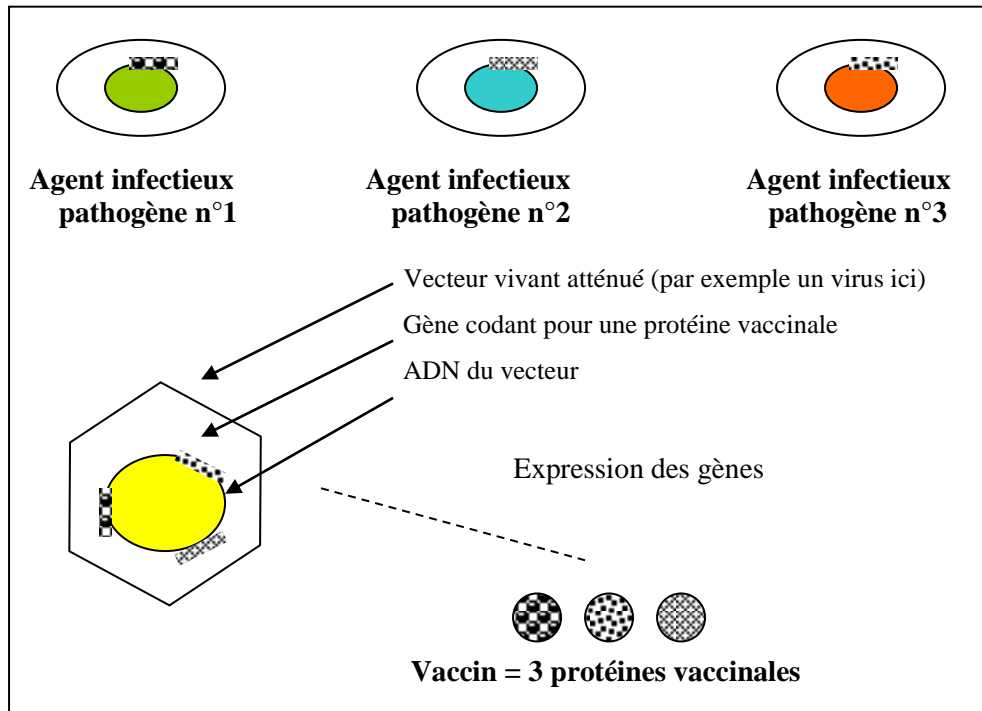


Fig. 3 : Vaccin vivant atténué recombinant multivalent. [77]

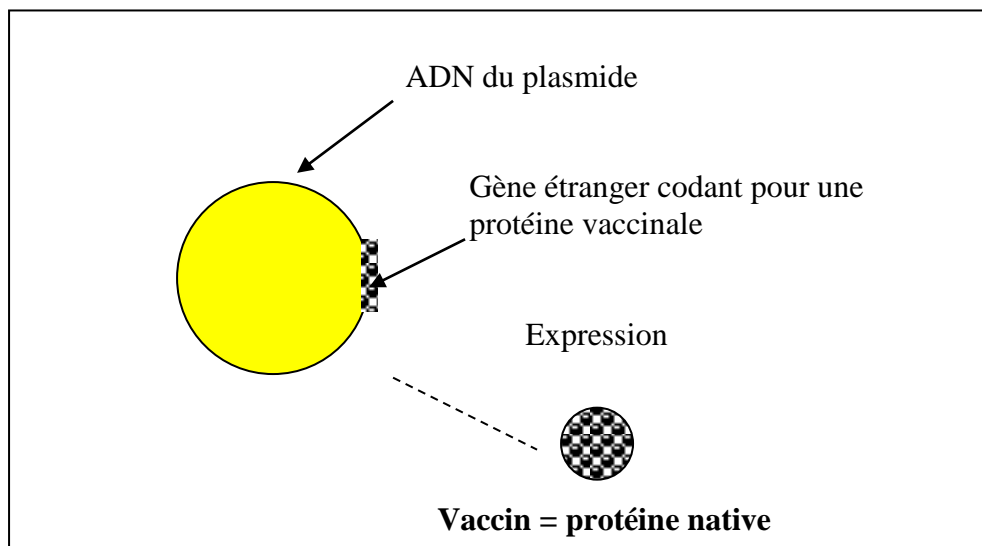


Fig. 4 : Vaccin ADN nu. [77]

5.1.3. Les avantages des vaccins ADN :

Les avantages de la vaccination à ADN sont multiples :

- La réponse immunitaire provoquée est de longue durée ;
- Il n'y a pas de risque d'infection par un agent adventice puisque le vaccin est composé d'ADN. Il n'y a pas d'effets secondaires ;
- Le vaccin peut être « multivalent » : on peut réaliser des cocktails de vaccins où plusieurs gènes, codant pour des protéines de différents pathogènes seraient introduits en même temps, ce qui rendrait inutiles des injections multiples. Certains vaccins « multivalents » existent actuellement (DT polio, par exemple) mais d'autres sont irréalisables à cause d'incompatibilité entre les préparations ;
- Le vaccin à ADN est chimiquement défini et thermiquement stable ce qui réduit la nécessité de maintenir la chaîne du froid ;
- Sa préparation est standardisée : le procédé reste le même quelle que soit la maladie. Seul change le fragment d'ADN du pathogène à cloner dans le plasmide. D'où une économie d'échelle pour la fabrication et des coûts moindres.[85]

5.2. Les vaccins anti-idiotypes :

On sait que le site anticorps possède une conformation complémentaire de l'épitope qui a introduit sa formation. Lorsqu'on injecte une immunoglobuline obtenue chez un animal d'une espèce A après immunisation contre un antigène (épitope X) à un animal d'une autre espèce B, cette immunoglobuline est reconnue comme étrangère et considérée comme anti-gène par le système immunitaire de l'animal de l'espèce B. Elle induit chez cet animal la formation de trois types d'anticorps :

- anti-xénotypiques spécifiques de l'espèce ;
- anti-xénotypiques spécifiques de la classe d'anticorps ;
- anti-idiotypiques spécifiques du site anticorps. Ces anticorps anti-idiotypiques peuvent donc se comporter comme cet antigène et être utilisé pour induire la formation d'anticorps spécifiques : ceci pourrait être utile dans les situations où l'agent infectieux ne peut être obtenu en culture et où la production d'antigène est défectueuse.[14, 79, 84]

Cette modalité originale d'immunisation contre un antigène en l'absence de cet antigène lui-même présente certains avantages, en particulier l'absence de pouvoir pathogène. Pourtant elle n'a pas encore été vraiment développée.

5.3. Les vaccins muqueux et les vaccins cellulaires T :

➤ Les vaccins muqueux :

La vaccination par voie muqueuse vise à induire une réponse immunitaire locale. Elle est essentiellement une immunité de type anticorps. Les champs d'application de ce type de vaccination concernent les allergies, les maladies virales, bactériennes, parasitaires et même les maladies auto-immunes.

➤ Les vaccins cellulaires T :

Les vaccins inducteurs de l'immunité cellulaire T, la plupart des vaccins traditionnels induisent une immunité de type humoral. Or, la protection contre certaines maladies infectieuses se fait surtout grâce à une réponse immunitaire cellulaire de type T. Elle est primordiale dans la défense contre les virus (VIH), les bactéries (lèpre, tuberculose) et les parasites intracellulaires (paludisme, leishmaniose). L'idée est donc de fabriquer des vaccins activateurs de l'immunité cellulaire T. [10, 77]

5.4. Les nouveaux procédés de vaccination :

➤ **Les vaccins comestibles à base de plantes :** sont des vaccins fabriqués à partir de plantes transgéniques. C'est le domaine des phytovaccins comestibles. (Voir annexe I)[4, 41]

➤ **Les vaccins en « sucre vitreux » :** c'est en appliquant les propriétés conservatrices de tréhalose (un sucre disaccharidique) aux vaccins, qu'on peut avoir différentes formes galéniques pour les vaccins sans subir des pertes décelables d'activité après des expositions prolongées à la chaleur.[41]

➤ **Les vaccins transdermiques :** c'est une vaccination transcutanée. Pour certains chercheurs, la peau semble être une porte d'accès privilégiée du système immunitaire. En effet, l'épiderme contient une forte quantité de cellules immunitaires qui sont les cellules dendritiques. Elles couvrent 25 % de la surface totale de la peau. Lorsqu'elles sont activées en présence d'un antigène, elles le transportent jusqu'aux ganglions lymphatiques les plus proches, déclenchant une réponse immunitaire.

5.5. Le grand défi : la « vaccinogénomique » :

Émerge aujourd'hui un nouveau concept : la « vaccinogénomique ». Il tient compte du profil génétique de chaque individu pour le vacciner. Il s'agit de développer des vaccins destinées à des groupes d'individus ayant un profil génétique relativement semblable. Ce développement « à la carte » de tels vaccins pourrait permettre une réelle optimisation des approches vaccinales, plus efficaces et sans effets secondaires. Se pose ici le problème de la production industrielle de ces vaccins par groupes de lots. [77]

6. VOIES D'ADMINISTRATION : [12, 78, 87]

En dehors des vaccinations par ingestion, limitée actuellement au vaccin polio, la plupart des vaccins se font en injection sous-cutanée (SC) ou intramusculaire (IM), parfois intradermique (ID).

Le mode d'administration doit souvent prendre en compte le type de vaccin.

- Les vaccins adsorbés sur l'hydroxyde d'alumine exposent souvent à des réactions locales lorsqu'ils sont administrés superficiellement. Ils doivent donc être injectés par voie IM profonde.
- Les vaccins atténués, les vaccins tués et les vaccins polysaccharidiques sont habituellement bien tolérés, tant par voie SC que par voie IM.
- La vaccination contre l'hépatite B et celle contre la grippe sont de meilleure qualité lorsque le vaccin est injecté par voie IM.
- Le BCG doit être administré par voie ID stricte, à la face externe du bras. Ce mode d'administration permet une réponse immunitaire d'origine cellulaire particulièrement efficace et assure une meilleure protection contre la maladie.

7. OBJECTIFS : [26]

Chaque vaccination a des objectifs anti-infectieux spécifiques, il s'agit de :

- Assurer la prévention individuelle (ex : vaccin tétanique) ;
- Protéger la collectivité : l'élaboration de programme de vaccination vis-vis des maladies à transmission inter-humaine (ex : rougeole) ;
- Eliminer une maladie infectieuse d'un pays ou d'une région.

Les vaccins disponibles permettent une réduction spectaculaire de la morbidité et de la mortalité de maladies à diffusion planétaire, autorisant à envisager leur contrôle, voire leur éradication (poliomyélite, rougeole...).

8. ASSOCIATION DES VACCINS :

L'association des vaccins améliore l'acceptabilité, allège les calendriers et permet d'augmenter la couverture vaccinale.[14, 40]

On distingue deux grands types d'associations vaccinales :

- Les vaccinations simultanées : les vaccins sont inoculés en un seul point de l'organisme.
- Les vaccinations combinées : les vaccins sont mélangés d'avance (ex : réhydratation du lyophilisat du vaccin triple Rougeole-Oreillons-Rubéole par le vaccin quadrapule) et sont inoculés en un seul point de l'organisme.

Un nouveau type de vaccination est actuellement en cours d'étude mais n'est pas encore au point. Il s'agit d'utiliser des « systèmes de libération retardée ». Ces systèmes permettraient de réaliser en une seule injection l'équivalent d'une primovaccination et de 2 rappels. Le problème encore rencontré est l'instabilité des vaccins encapsulés dans des microsphères biodégradables.[77]

Combinaison	Composition	Voie d'adm.	Spécialité en France	Spécialité en Maroc
Bivalente	Diphtérie-Tétanos	IM/SC	DIFTAVAX	DT, dT
	Tétanos-Poliomyélite	SC/IM	T.Polio	T-Polio
	HépatiteA-HépatiteB	IM	TWINRIX	-
	Méningocoque A et C	SC/IM	Vaccin Méningococcique A+C	Vaccin Méningococcique A+C
Trivalente	Diphtérie-Tétanos-Poliomyélite	SC/IM	DTP REVAXIS	TDPolio
	Diphtérie-Tétanos-Coqueluche cellulaire	SC/IM	DT coq	DTCOQ
	Rougeole-Oreillons-Rubéole	SC/IM	RORVAX	ROR vaccin
		SC/IM	PRIORIX	PRIORIX
Tétravalente	Diphtérie-Tétanos-Poliomyélite- Coqueluche Cellulaire	SC/IM SC/IM	DTCP TETRACOQ	DTCP vaccin TETRACOQ
	Diphtérii-Tétanos-Poliomyélite- Coqueluche acellulaire	IM	TETRAVAC acellulaire	INFANRIX-IPV
Pentavalente	Diphtérie-Tétanos-Poliomyélite- Coqueluche cellulaire-H. influenzae b	SC/IM	PENTACOQ	PENTACOQ
	Diphtérie-Tétanos-Poliomyélite- Coqueluche acellulaire-H. influenzae b	IM	INFANRIX Polio-Hib PENTAVAC	INFANRIX- Polio+Hib
Hexavalente	Diphtérie-Tétanos-Coqueluche acellulaire-Poliomyélite-Hib-Hépatite B	IM		INFANRIX-Hexa

Tableau II : Principales associations (ou combinaisons) vaccinales disponibles^[19, 33]

9. MANIFESTATIONS POST-VACCINALES INDESIRABLES (MAPI) :

Les effets indésirables liés à une vaccination sont de plus en plus rares du fait de la purification des vaccins [6, 7, 18, 20]. Leur mécanisme de survenue est variable (erreur programmatique, réactions dues au vaccin, réactions survenues par coïncidence).

9.1. Les effets indésirables locaux :

Ils sont bénignes et siègent sur le site de l'injection. Les biens connus sont une douleur passagère, une rougeur au point d'injection, une urticaire, un érythème, un œdème (avec ou sans induration, parfois suivi d'une nécrose). [77, 91] Tous les vaccins peuvent entraîner ce type de réactions.

9.2. Les effets indésirables généraux :

- Une fièvre d'intensité et de durée variable (24 à 48 h) ; [25]
- Des réactions allergiques : elles se voient essentiellement chez les sujets ayant des antécédents allergiques.
- Des réactions cutanées : elles peuvent apparaître 6 à 10 jours après la vaccination.
- Les accidents articulaires observés uniquement pour le vaccin anti-rubéolique, en particulier chez l'adulte. [90, 91]
- Des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et d'autres symptômes systémiques, tels que céphalées ou malaises... Ils sont d'origine allergique ou toxique et le plus souvent transitoires.

9.3. Les complications graves :

➤ **Les complications neurologiques** : sont certainement ceux qui sont signalées comme les plus dramatiques, il s'agit :

- De paralysie du nerf laryngé récurrent (nerf commandant les cordes vocales): le sujet vacciné est atteint d'enrouement, et incapable de parler à haute voix; l'atteinte disparaît au bout de deux mois. [21]

- Du syndrome des cris aigus et syndrome du cri persistant: le syndrome des cris aigus, consiste en des cris inhabituels, plaintifs, différents des pleurs d'un enfant normal., qui ressemblent aux cris encéphaliques décrits dans certaines encéphalopathies. Ces cris se poursuivent quelques heures ou quelques jours. [30]

- Des paralysies secondaires à l'administration du vaccin poliomyélitique oral ont été relevées.

➤ **Les autres complications** :

- Des ostéites et spondylodiscites induites par le BCG : complications rares, mais classiques, car décrites dans la littérature médicale.

- Une Purpura thrombopénique : destruction des plaquettes sanguines entraînant des hémorragies généralisées après vaccination contre la rougeole et la rubéole.

- Des chocs et collapsus: survenant dans les 48 heures après l'injection du vaccin anti-coquelucheux.[80]

9.4. Les erreurs programmatiques : [68]

En outre, dans certains pays, les erreurs programmatiques peuvent nuire à l'efficacité et à l'innocuité des vaccins. L'insuffisance de la formation du personnel et le manque de supervision de la manutention, du transport, de l'entreposage et de l'administration des vaccins peuvent conduire à administrer un vaccin qui n'est ni sûr ni efficace.

Par le passé, la vie d'enfants a été mise en danger par des erreurs de programmes, y compris des interruptions non détectées de la chaîne du froid (l'ensemble de réfrigérateurs, de congélateurs et de glacières permettant d'entreposer les vaccins à basse température) et l'utilisation de vaccins après leur date de péremption.

La reconstitution de certains vaccins comme celui contre la rougeole, qui doivent être mélangés à un diluant avant d'être administrés, présente d'autres risques. Il est arrivé à plusieurs reprises que des agents de santé utilisent par erreur une substance médicamenteuse à la place d'un diluant et que des enfants recevant ce mélange meurent ou que des enfants aient reçu un vaccin qui ne les protège pas, à cause d'une trop grande quantité de diluant ajoutée par erreur. Par ailleurs, des infections bactériennes ont mis en danger la vie d'enfants lorsque des vaccins reconstitués qui auraient dû être jetés après chaque séance de vaccination – de façon à éviter tout risque de contamination – ont été entreposés d'un jour à l'autre et réutilisés.

10. CONTRE-INDICATIONS : [77, 91, 86]

Il s'agit ici non plus de remettre en cause un vaccin, mais de remettre en cause l'individu à vacciner. Il s'agit d'éviter l'administration inadéquate d'un vaccin. En voici les principales :

10.1. Les contre-indications temporaires :

Elles sont appliquées dans les cas suivants :

- Convalescence,
- Affections aiguës,
- Fébrilité,
- Pyodermite ou eczéma,
- Virage spontané de la réaction tuberculinique de moins de 3 mois,
- Grossesse et allaitement pour certaines vaccinations (vaccins vivants atténués),
- Injections d'immunoglobulines. En principe, il faut attendre 6 semaines au moins après l'injection d'Ig, pour pratiquer les vaccinations contre la rougeole, les oreillons, la rubéole, le ROR, la varicelle. Les immunoglobulines risquent en effet de bloquer la multiplication de ces vaccins viraux, nécessaire à leur efficacité.

10.2. Les contre-indications durables :

- Maladies infectieuses en évolution : les vaccins vivants atténués, les vaccins inactivés, les polysaccharidiques et les anatoxines sont contre-indiqués.

- Maladies malignes évolutives : la plupart des vaccins sont contre-indiqués, sauf le BCG.

- Affections neurologiques évolutives : par sécurité, la vaccination contre la coqueluche utilisant le vaccin à germes entiers est contre-indiquée.
- Etats d'immunodépression (congénitale ou acquise) : les vaccins vivants atténués sont contre-indiqués. Le BCG n'est contre-indiqué que dans les cas de déficit de l'immunité cellulaire. Les vaccins tués ne sont pas contre-indiqués, mais doivent être administrés en dehors du traitement immunosuppresseur (corticothérapie, chimiothérapie). L'efficacité des vaccins chez les immunodéprimés n'est pas aussi bonne que chez les individus sains.

CHAPITRE II : PROGRAMME ELARGI DE VACCINATION

Ce programme évite le décès de 3 millions d'enfants par année.

L'OMS a lancé en 1977 le programme élargi de vaccination (PEV) qui avait pour objectif de vacciner tous les enfants du monde contre 6 maladies infectieuses : la rougeole, le tétanos, la coqueluche, la poliomyélite, la tuberculose et la diphtérie. En 1984, le PEV a été soutenu par l'UNICEF, la banque mondiale et la fondation Rockefeller. Récemment, le programme a été modifié pour y ajouter l'hépatite B pour tous les pays, la fièvre jaune pour certains pays. La rougeole et l'*Haemophilus influenzae* type b sont ajoutés par certains pays. [25, 74]

1. LES PROGRAMMES DE VACCINATION AU MAROC :

Les activités de vaccination au Maroc existent de longue date, mais elles ont subies de profonds changements , en passant par deux étapes importantes. La première étape était basée essentiellement sur des campagnes de masse et la seconde sur un programme national intégré au système de santé. Cette étape se subdivise elle-même en deux phases :

1.1. Le Programme Elargi de Vaccination (PEV) :

En 1980, une évaluation des stratégies vaccinales du pays a été réalisé. Elle a souligné la faible efficacité de la stratégie des campagnes et des quelques points fixes. C'est ainsi que le PEV a été adopté en 1981 dans le cadre du nouveau plan quinquennal de développement 1981 – 1985 réalisé par une équipe nationale en

collaboration avec l’OMS et l’UNICEF. Les résultats obtenus étaient assez encourageants sur le plan de la couverture vaccinale réalisée et sur l’incidence des maladies cibles (poliomyélite, diphtérie, coqueluche, rougeole, hépatite B tuberculose et tétanos). Cependant, la vitesse d’évolution restait en dessous des objectifs escomptés par le programme. [43]

1.2. Le Programme National d’Immunisation (PNI) :

A la suite de l’évaluation du PEV et compte tenu des objectifs de l’accélération de la couverture vaccinale et l’intégration des présentations vaccinales, le PEV a été restructuré en 1987 et rebaptisé Programme National d’Immunisation (PNI). Le PNI est rattaché à la division de la santé maternelle et infantile de la direction de la population.

Le PNI vise à répondre aux besoins de la population en matière de vaccination, à élargir davantage l’accès aux services de vaccination aux niveaux rural et périurbain, afin de réduire les écarts et d’éviter la constitution de zones à haut risque pour les maladies cibles et à promouvoir la collaboration intersectorielle. [43]

2. LES STRATEGIES VACCINALES :

Les stratégies vaccinales adoptées par le PNI ont pour objectif d’atteindre une couverture vaccinale satisfaisante et uniforme à tous les niveaux. L’application de la stratégie vaccinale s’appuie sur les structures de base de la couverture sanitaire. [44]

2.1. La stratégie fixe :

la stratégie fixe s’adresse à une population ayant des facilités d’accès aux formations sanitaires. Des séances de vaccination sont programmées et réalisées régulièrement au niveau de toutes les formations sanitaire. [44]

2.2. La stratégie mobile :

Cette stratégie inclut deux modes de couvertures : la vaccination par itinérance et la vaccination par équipe mobile avec à sa tête un médecin du programme national d'immunisation, permettant un suivi continu et régulier des activités de vaccination afin de reconnaître à temps les insuffisances et repérer les régions, les provinces ou circonstances où les performances ne sont pas satisfaisants et leur apporter l'aide nécessaire. [76]

2.3. La vaccination par mini-compagne : [43]

C'est une activité limitée dans le temps et dans l'espace ; elle est réservée à des situations particulières comme :

- Des cas de tétanos néonatal ;
- En cas de couverture vaccinale basse au niveau d'une localité ou d'un ensemble de localités.

2.4. Les Journées Nationales de Vaccination (JNV) :

Depuis 1987, le Maroc organise chaque année des journées nationales de vaccination contre les six maladies cibles de l'enfant. Grâce à cette stratégie notre pays a pu améliorer la couverture nationale et la maintenir à un niveau élevé. Les JNV permettent aussi de prendre en charge les enfants et les femmes ayant échappé au programme permanent ou ayant abandonné leur vaccination. [43]

3. LE CALENDRIER VACCINAL :

Le calendrier des vaccination est un programme indiquant le déroulement, en fonction de l'âge, des présentations vaccinales recommandées à l'ensemble de la population. Orienté d'abord vers l'enfant, cible prioritaire des vaccinations, le calendrier s'étend maintenant à toute la vie. Un tel programme peut être modulé en fonction des cas et des circonstances. [75]

Au Maroc deux calendriers de vaccination différents sont appliqués, selon que l'on exerce dans le secteur public ou privé.

Le premier calendrier, recommandé par l’OMS et préconisée par le ministère de la santé, est celui qui est adopté dans les structures sanitaires publiques. Il consiste à faire vacciner l’enfant le plus tôt possible après la naissance. Le calendrier ne prévoit pas les injections de rappel. [44]

Le second calendrier, utilisé par les médecins du secteurs privé, est calqué sur le calendrier officiel français.

Le calendrier vaccinal actuel est présenté dans le tableau 3. La nouveauté est l’introduction des rappels concernant le DTC et VPO.

Tableau III : Le calendrier national de vaccination appliqué dans le secteur public. (Source PNI)

Âge de l’enfant	Vaccins
A la naissance	BCG + VPO (zéro) + HB1
6 semaines	DTC1 + VPO1 + HB2
10 semaines	DTC 2 + VPO2
14 semaines	DTC 3 + VPO3
9 mois	VAR + HB3
18 mois	DTC + VPO (premier rappel)

➤ **NB :**

Il faut noter que le ministère de la santé achète la totalité de ses besoins en vaccin sur le budget de l'état à travers l'UNICEF.

GENERALITES :

La qualité des vaccins – de la production, du transport et de l'entreposage du vaccin jusqu'à son administration – est un aspect essentiel de la sécurité (fig. 5). De par leur nature, les vaccins ne sont pas stables sur le plan biologique. Ils doivent être produits dans des conditions garantissant que chaque lot présente les caractéristiques nécessaires à l'innocuité et à l'efficacité du produit. [53, 56, 68]

Pour garantir cette efficacité et innocuité, il faut contrôler chaque lot de fabrication. Ce contrôle est assuré à deux niveaux :

- Par le producteur lui-même.
- Par les Autorités Nationales de Réglementation (ANR).

En effet, l'OMS insiste sur l'importance d'assurer, en plus des contrôles effectués par les fabricants eux-mêmes, un contrôle de qualité supplémentaire par une autorité nationale de contrôle indépendante et compétente et ce, pour chaque lot de vaccin, qu'il soit produit localement ou importé. L'objectif est de veiller à ce que tous les pays aient accès à des vaccins de qualité fiable et que la qualité se maintienne jusqu'au moment où le vaccin est administré.[11, 17, 82]

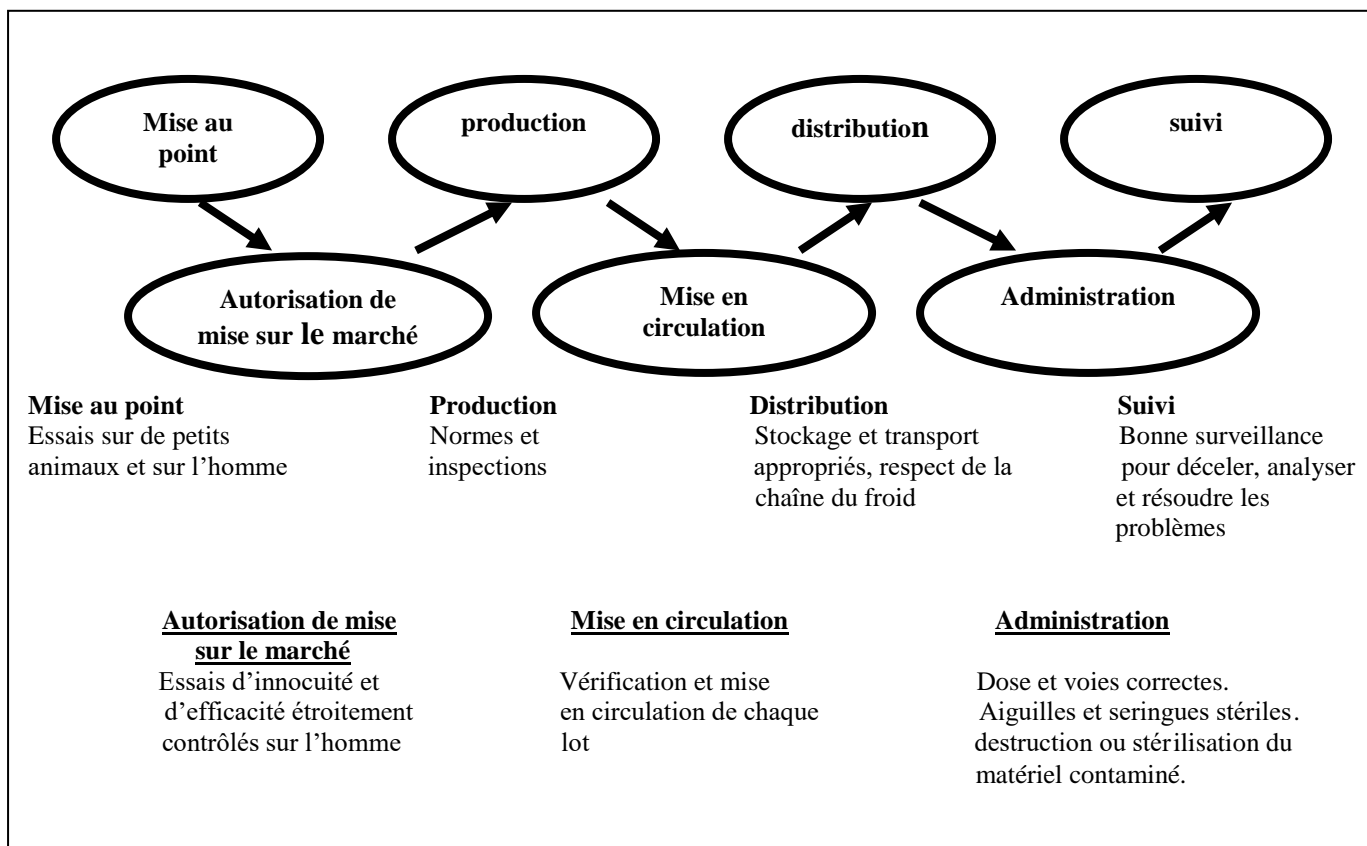


Fig. 5 : Démarche à suivre pour garantir la qualité des vaccins [67]

CHAPITRE II : INDUSTRIE ET VACCINS :

1. LES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION (BPF) :

Les BPF constituent une série de conditions dans lesquelles les médicaments et produits biologiques destinés à un usage humain doivent être fabriqués pour garantir que le produit est issu d'une procédure validée qu'il est possible de reproduire dans un environnement contrôlé spécifié par des opérateurs formés. [51, 66]

Le principe cardinal des BPF est que la qualité fait partie intégrante d'un produit et n'est pas seulement vérifiée à la fin de sa fabrication. Les BPF jouent un rôle critique dans le cas des vaccins qui constituent des produits biologiques fabriqués à partir de micro-organismes ayant un degré élevé de variabilité. La production doit être contrôlée strictement à tous les stades de la fabrication et des essais. [65]

En effet, contrairement aux produits pharmaceutiques classiques qui sont normalement produits et contrôlés par des méthodes chimiques et physiques reproductibles, les vaccins sont obtenus par des méthodes mettant en jeu des processus et des matériels biologiques caractérisés par leur variabilité. L'origine et l'historique des matières premières doivent être décrits et documentés, ceci incluant la stratégie de production, les procédés de purification/inactivation, avec leur

validation et toutes les procédures de contrôle en cours de fabrication destinées à assurer la qualité des lots de produit fini. [2]

Les contrôles de qualité, permettant d'éliminer les non-conformités à un stade donné du processus de fabrication, constituent donc une composante essentielle de la surveillance de ces produits.

2. PROCEDES DE PRODUCTION DES VACCINS :

Le procédé de production du principe actif doit permettre d'obtenir un principe actif le plus reproductible possible, malgré la variabilité de la matière première de départ. La reproductibilité globale du vaccin sera d'autant meilleure que le procédé d'obtention est lui-même suffisamment maîtrisé : connaissance exacte du procédé mis en œuvre, des milieux de culture, maîtrise des conditions des cultures cellulaires, validation de ce procédé par analyses de lots. [55]

La production des vaccins viraux s'oppose à celles des vaccins bactériens par l'utilisation d'un support cellulaire. En effet, un virus ne peut se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule, obligeant celle-ci à synthétiser ses propres constituants. [34, 50, 51, 55]

La pharmacopée européenne précise : « Les vaccins viraux sont préparés à partir de virus cultivés soit sur animaux ou sur embryons, soit sur cultures de cellules modifiées par génie génétique ».

Les bactéries destinées à la production des vaccins sont cultivées sur des milieux de croissance de composition chimiquement définie.

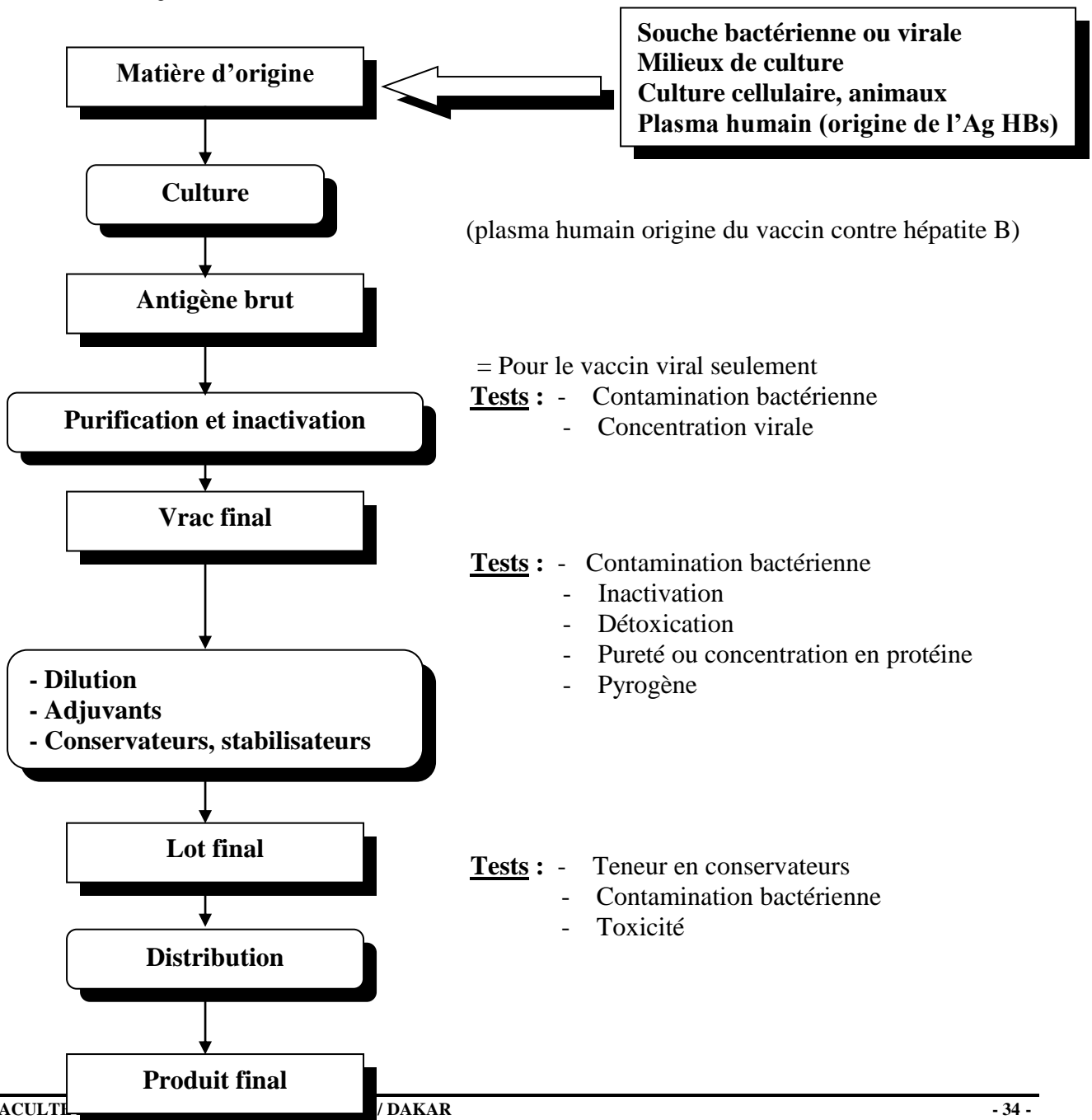
La plupart de vaccins bactériens sont constitués par des germes entiers tués ou des extraits de bactérie (anatoxines). Sans oublier de rappeler que le vaccin BCG est un agent microbien dont on a atténué le caractère pathogène tout en

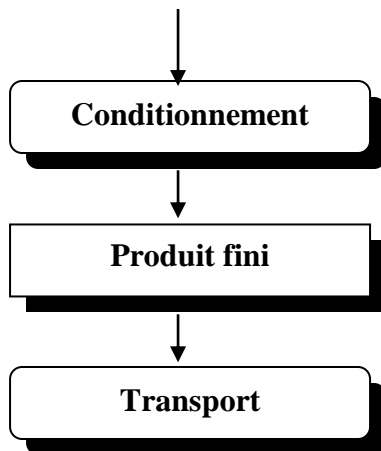
préservant ses propriétés immunogènes. Dernièrement, des vaccins recombinants développés grâce à l'utilisation de la technique de l'ADN recombinant.

Cette diversité rend la production des vaccins complexe, et le protocole de fabrication variable selon qu'il s'agit d'un vaccin vivant ou inactivé, d'un vaccin bactérien ou viral.

2.1. Production de vaccins inactivés ou anatoxines :

Les agents des vaccins inertes sont totalement incapables de se multiplier, aussi bien in vitro que in vivo. De manière à obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une masse importante d'agents pathogènes et nécessitant fréquemment la présence d'adjuvant, deux facteurs qui expliquent leur coût de production plus élevé que les vaccins à souche vivante modifiée. [22]





- Tests :**
- pH
 - Teneur en conservateurs
 - Concentration en formaldéhyde
 - Contamination en protéine
 - Toxicité
 - Inactivation
 - Détoxication
 - Activité

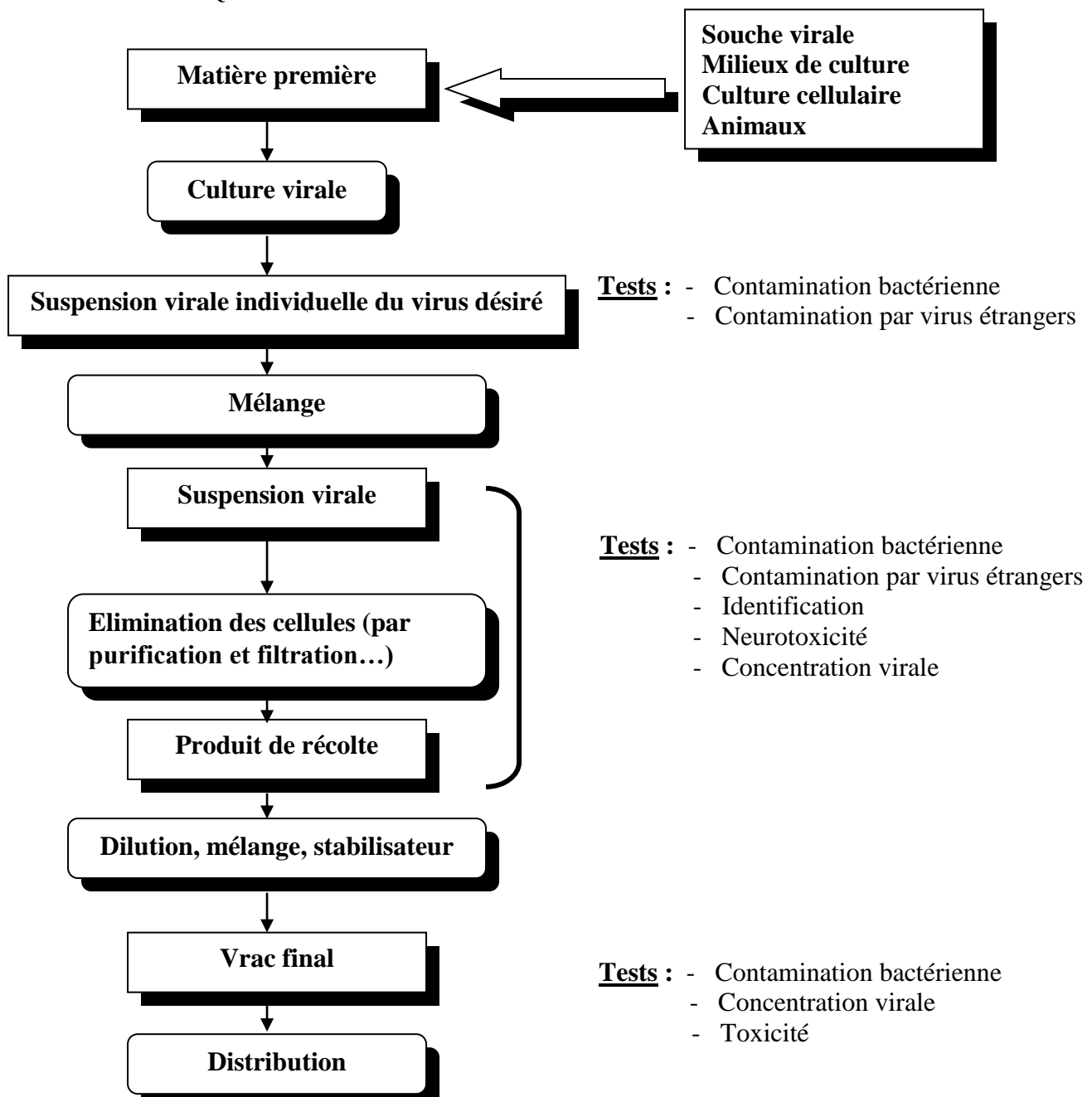
Etiquette conforme

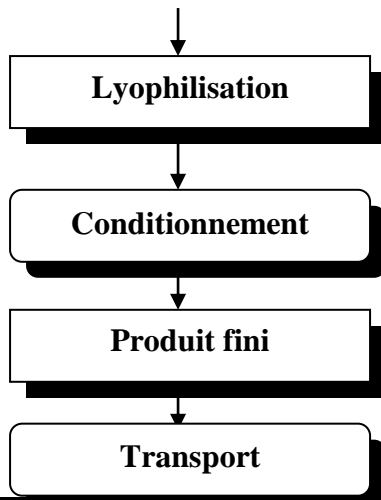
Fig.6 : La production de vaccins inactivés ou anatoxines[34]

2.2. Production des vaccins viraux vivants :

Le principe de la sélection de souches virales atténuées est d'isoler parmi une population virale initiale un clone de virulence atténuée.

Au besoin, une procédure de mutagènes à l'aide de différents agents mutagènes est parfois réalisée sur la population initiale afin d'augmenter le nombre de variants présents et de faciliter la sélection d'un variant approprié. La sélection de variants non pathogènes est réalisée par différentes techniques : passages multiples en cultures cellulaires, passages sur espèce animale différente de l'espèce cible. [32]





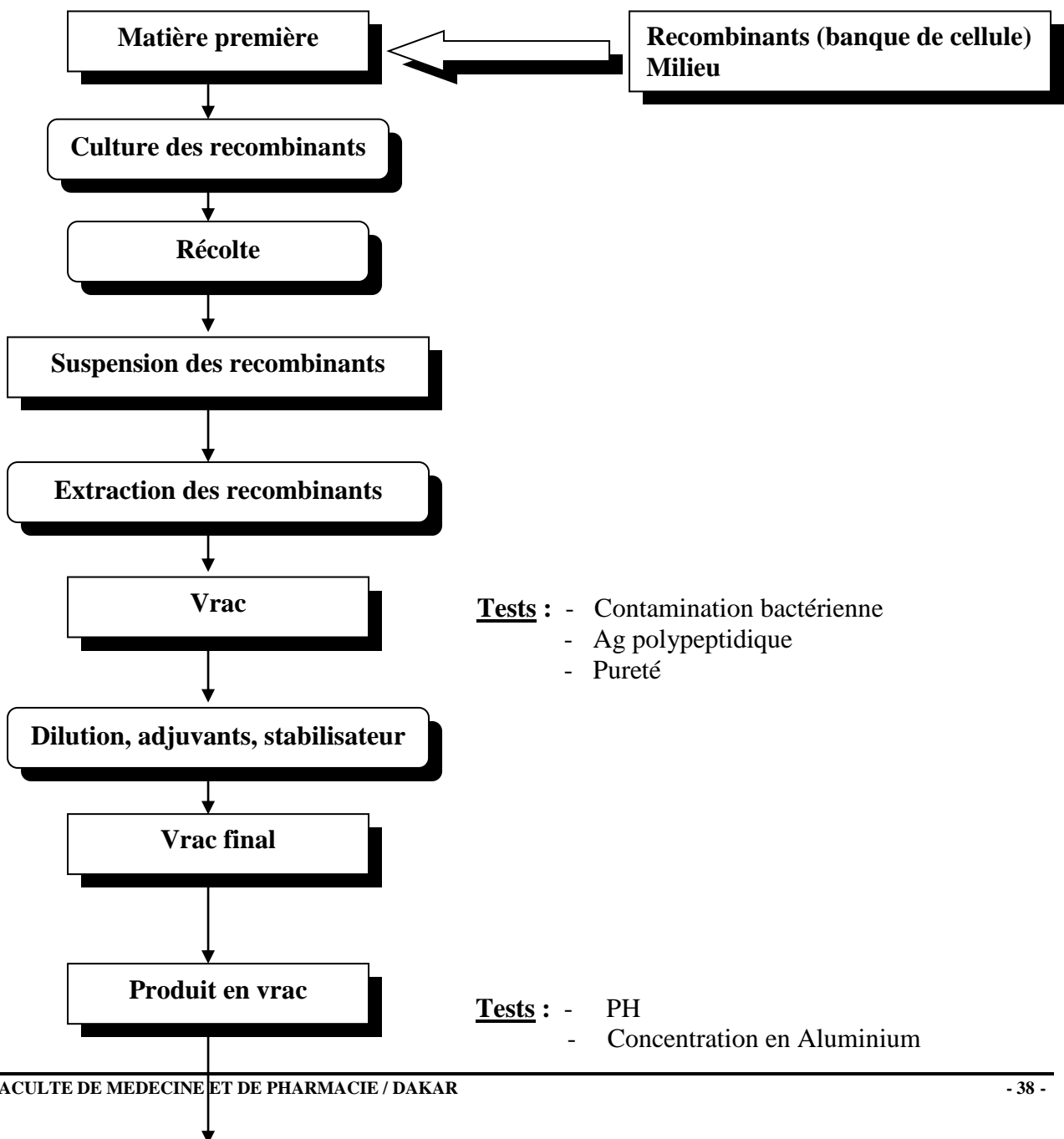
Tests : - Contamination bactérienne
 - Activité
 - Teneur en H₂O (HR.)

Etiquette conforme

Fig. 7 : La production des vaccins viraux vivants [34]

2.3. Production des vaccins recombinants :

Hépatite B, coqueluche acellulaire, d'autres vaccins sont en préparation. Ces vaccins utilisent des fragments de micro-organismes qui sont multipliés par recombinaison génétique. [74]



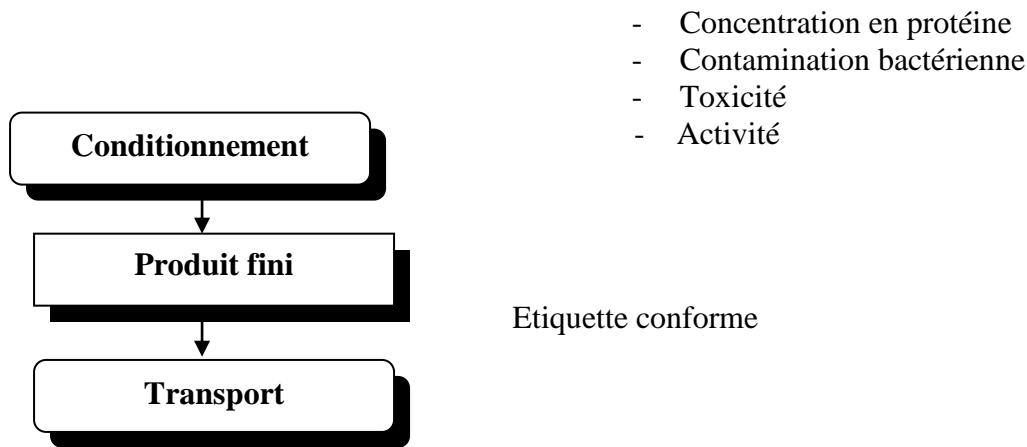


Fig. 8 : La production des vaccins préparés par la technique de l'ADN recombinant[34]

2.4. Adjuvants associés aux vaccins : [35, 66, 74]

Ils sont souvent nécessaire pour potentialiser la réaction immunitaire. Dans la production d'un vaccin inactivé efficace, les adjuvants immunologiques sont utilisés comme des composants critiques, à côté des antigènes, afin d'instruire et de contrôler l'induction sélective d'une réponse immunologique spécifique la plus appropriée pour obtenir la protection la plus longue avec le minimum d'effets secondaires.

De nombreux vaccins sont adsorbés sur hydroxyde ou phosphate d'aluminium. Selon le concept vaccinal, l'aluminium sert d'adjuvant de l'immunité, en maintenant l'antigène à proximité du site d'injection et en activant les cellules présentatrices favorisant la reconnaissance immune et la production d'interleukines.

Des conservateurs (comme le thiomérosol, un sel composé d'éthylmercure et de thiosalicylate) sont utiles pour maintenir la qualité biologique des vaccins et pour les rendre aptes à supporter des variations physiques (Ex : thermiques).

2.5. Maîtrise de la sécurité en production des vaccins : [2, 34]

D'une manière générale, les contrôles sur le produit fini constituent la meilleure garantie de sa qualité. En sécurité cependant, ces contrôles sont souvent limités par la sensibilité des méthodes utilisées pour déceler de faibles

concentrations d'agents adventices et leur utilisation en routine n'est donc pas recommandée. Heureusement, la sélection du matériel de départ combinée à l'élimination/inactivation en cours de production suffit, dans la plupart des cas, à réduire au maximum les risques de contamination (bactérie, virus ou agents transmissibles non conventionnels, levures, mycoplasmes).

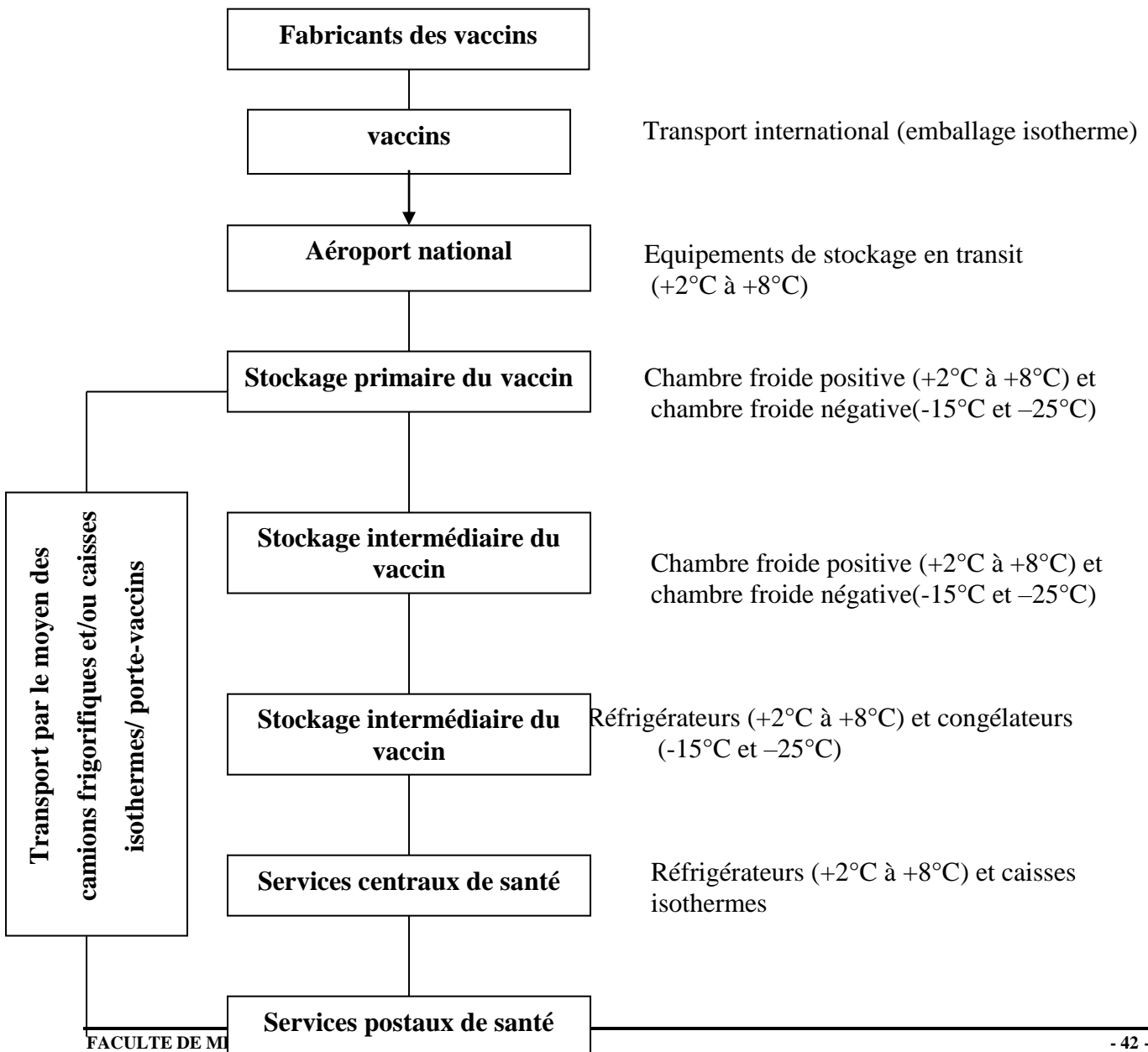
La réduction de la contamination peut être obtenue soit par élimination des éléments indésirables dérivants du matériel biologique d'origine (filtration, précipitation saline, centrifugation...) ou inactivation de l'infectiosité des agents pathogènes et la toxicité de leurs toxines par des traitements chimiques (formaldéhyde ou à la β -propiolactone...) et /ou physiques (chaleur, ultrasons, irritations...). Toute la difficulté tient au fait que les principes actifs d'origine biologique présentent des caractéristiques physico-chimiques proches de celles des contaminants potentiels, d'où la difficulté de les éliminer/inactiver spécifiquement. Pour pallier ces inconvénients, les procédés de préparations des vaccins font souvent intervenir une combinaison d'étapes d'élimination et d'inactivation.

CHAPITRE II : CONSERVATION DES VACCINS :

1. IMPORTANCE DE LA CHAINE DU FROID :

Les vaccins sont des produits biologiques sensibles à des variations de température et à la lumière, ils perdent leur efficacité une fois exposés à des variations de température. Afin de maintenir leur qualité, tous les vaccins doivent être, sans interruption, stockés à une température appropriée depuis le lieu de production jusqu'au moment d'utilisation. [24]

Le système utilisé pour préserver l'efficacité des vaccins s'appelle : « la chaîne du froid ». Il se compose d'une série de liens de stockage et de transport, qui sont conçus pour que la température de conservation soit respectée tout au long du circuit de distribution. Un système typique de chaîne du froid pour les vaccins est montré ci-dessous.[50]



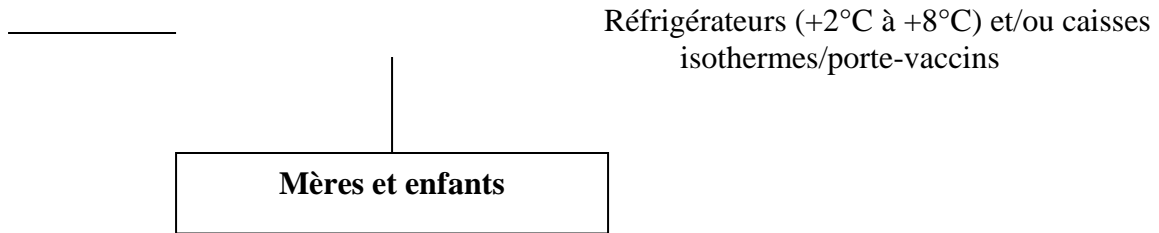


Fig. 9. a : Maillons de la chaîne du froid concernant le secteur public [67]

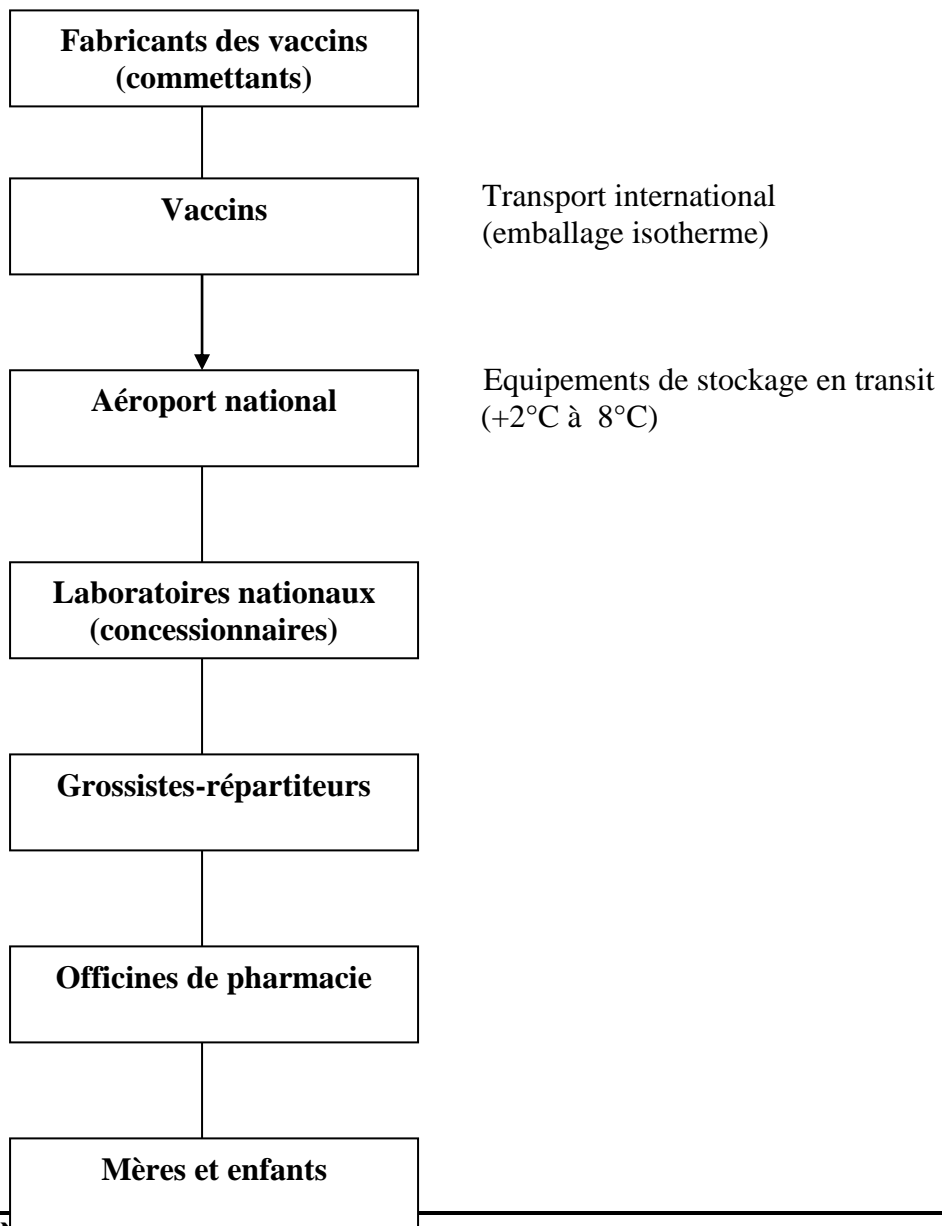


Fig. 9. b : Maillons de la chaîne du froid concernant le secteur privé [67]

Les différents vaccins exigent différentes conditions de stockage, et ce qui est valable pour un vaccin peut être dangereux pour d'autres, ainsi il est essentiel de savoir les conditions de stockage précises pour chaque vaccin.

L'équipement recommandé pour le stockage (chambres froides, réfrigérateurs, congélateurs) et le transport (boîtes froides, porteurs vaccinaux) doit être conforme à un ensemble de normes recommandées par OMS et UNICEF.

1.1. La structure de la chaîne du froid :

La chaîne du froid est composée de moyens de conservation et de moyens de transport.

❖ Les moyens de conservation :

- Les chambres froides ;
- Les armoires frigorifiques ;
- Les congélateurs ;
- Les réfrigérateurs électriques ;
- Les réfrigérateurs mixtes (électrique et/ou à gaz) ;
- Les caisses isothermes et porte-vaccins.

❖ Les moyens de transport :

- Les camions frigorifiques ;
- Les caisses isothermes ;

- Les porte-vaccins.

1.1.1. Les chambres froides : [44]

Elles permettent la conservation et le stockage de grandes quantités de vaccins à l'échelon central ou régional. Il en existe deux types :

- Chambre froide négative (-15°C à -25°C) : conservation du VPO.
- Chambre froide positive (0°C à $+8^{\circ}\text{C}$) : conservation des vaccins : BCG, DTC, VAR et VAT.

1.1.2. L'armoire frigorifique : [44]

C'est un appareil de réfrigération avec un volume de stockage variant entre 800 et 1000 litres fonctionnant à l'électricité.

Elle est utilisée au niveau du SIAAP pour conservation entre 0°C et $+8^{\circ}\text{C}$.

La température est contrôlée par un thermomètre à cadran puis enregistrée sur le relevé quotidien de température.

1.1.3. Le congélateur : [44]

C'est un appareil de congélation à ouverture frontale, de capacité variable entre 100 et 500 litres. Il est utilisé pour congeler les accumulateurs du froid et pour conserver le VPO. Sa température est contrôlée par un thermomètre, elle peut atteindre -20°C .

1.1.4. Le réfrigérateur : [44]

Appareil de volume variable, entre 40 et 200 litres, fonctionnant à l'électricité ou mixte (électrique et /ou à gaz). Sa température doit être maintenue entre 0°C et $+8^{\circ}\text{C}$, elle est contrôlée par un thermomètre quatre fois par jour.

Les réfrigérateurs sont utilisés pour la conservation des vaccins au niveau des centres de santé et des dispensaires.

1.1.5. La caisse isotherme : [44]

On utilise des caisses isothermes pour :

- Livrer les vaccins du dépôt central aux provinces ;
- Livrer les vaccins du SIAAP aux formations sanitaires ;
- Transporter de grandes quantités de vaccins destinées aux équipes mobiles de vaccination ;
- Conserver les vaccins en cas de panne de courant électrique ou de rupture de gaz.

On utilise des accumulateurs du froid congelés pour garder le vaccins au froid, à l'intérieur de la caisse.

Le contrôle de la température peut se faire par thermomètre ou par méthodes chimiques.

1.1.6. Le porte-vaccin : [44]

Le porte-vaccin est utilisé pour :

- Prendre livraison de petites quantités de vaccins ;
- Transporter de petites quantités de vaccin en voiture, par vélomoteur ou à pied jusqu'aux lieux de vaccination ;
- Transporter les vaccins nécessaires pour une seule journée de travail.

Il n'est efficace que rempli d'accumulateurs de froid congelés.

1.1.7. L'accumulateur du froid : [44]

Les accumulateurs du froid sont utilisés :

- Pour garder les vaccins au froid dans les caisses isothermes et dans les porte-vaccins.
- Comme réserve de froid dans un appareil frigorifique.

1.2. Le contrôle de la chaîne du froid : [45]

La température, à laquelle les vaccins doivent être conservés, doit être contrôlée régulièrement de façon à :

- Noter toute mauvaise manipulation des vaccins.
- Vérifier que le matériel est en bon état de marche.

Les outils utilisés pour contrôler le fonctionnement de la chaîne du froid peuvent être divisés en deux groupes :

- Les indicateurs ou cartes de contrôle de température qui accompagnent les vaccins depuis le dépôt central jusqu'aux centres périphériques (au moins une carte par lot envoyé aux centres périphériques). Ces indicateurs détectent tout dépassement de la température et sa durée, permettant ainsi aux vaccinateurs de juger de l'état des vaccins.
- Les outils de type thermomètres donnent un renseignement sur l'état instantané de la température du vaccin sans prendre en compte son « histoire »

1.2.1. Les cartes de contrôle de température :

Les pastilles A, B, C et D sont activées (virent en bleu) lorsque :

	Vaccins exposés à une température de	Pendant le nombre de jours
Pastille A	+12°C	3 j
	+21°C	2 j
Pastille B	+12°C	8 j
	+21°C	4 j
Pastille C	+12°C	14 j
	+21°C	11 j
Pastille D	+34°C	2 heures

Toutefois, la pastille D peut être seule à être activée, cela signifie qu'il y a eu uniquement rupture de la chaîne du froid pendant deux heures ; les vaccins peuvent être utilisés normalement.

Selon le type de pastille activée il faut agir de la manière suivante avec les vaccins :

- A, B, C, D toutes blanches : tous les vaccins sont utilisables.
- A seule bleue : utiliser le vaccin antipoliomyélitique dans les trois mois. Les autres vaccins ne posent pas de problèmes.
- A et B bleues : le vaccin antipoliomyélitique ne sera utilisé qu'après un contrôle, le vaccin antirougeoleux peut être utilisé dans les trois mois, alors que les autres vaccins ne posent pas de problèmes.

- A, B et C bleues : les vaccins antipoliomyélique et antirougeoleux ne sont utilisés qu'après un contrôle. Le DTC et le BCG à utiliser avant trois mois, les autres ne posent pas de problèmes.
- A, B, C et D toutes bleues : il faut vérifier tous les vaccins avant de les utiliser.


Il est important qu'à chaque échelon de la chaîne du froid un responsable note à l'arrivée du vaccin l'état de la carte de contrôle. Ceci permet d'identifier les points faibles de la chaîne.


Contrôle de la chaîne du froid

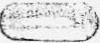
Date d'entrée	Indice	Lieu	Date de sortie	Indica


3M INDEX/INDICE / دليل 10°C 34°C

MonitorMark™
Indicator


A


B


C


D

Si voyant A entièrement bleu Si voyant B entièrement bleu Si voyant C entièrement bleu Si les voyants A&B&C&D sont entièrement bleus

Polio	Utiliser dans les 3 mois	VÉRIFIER LE VACCIN AVANT UTILISATION
Rougeole	Utiliser dans les 3 mois	
DTC & BCG	Ces vaccins peuvent être utilisés	
Tétanos & D T		

SUPPLIER

FOURNISSEUR

Name: _____

Nom: _____

Date of dispatch: _____

Date d'expédition: _____

Vaccine: _____

Vaccin: _____

Fig. 10 : Carte de contrôle de température [45]

1.2.2. Le contrôle instantané : [35]

En parallèle, des outils permettent de suivre ponctuellement les éléments de la chaîne du froid :

- Un indicateur d’alerte de congélation (pour le DTC, DT et antitétanique) ;
- Fiche de contrôle de basse température fixée à chaque accumulateur de froid pour avertir en cas de risque de congélation du vaccin DTC, DT ou antitétanique ;
- Thermomètre à cristaux liquides à placer dans les réfrigérateurs.

2. PASTILLES DE CONTROLE DES VACCINS :

2.1. L’utilisation d’une nouvelle technologie : [66, 68]

Les nouveautés et les améliorations dans le domaine des technologies et des méthodes d’administration de vaccins peuvent également contribuer à accroître la couverture vaccinale en réduisant le nombre de contacts nécessaires, en abaissant les coûts d’administration et en s’affranchissant des contraintes liées à la chaîne du froid. Par exemple, la pastille de contrôle des flacons de vaccin révolutionne la distribution de vaccins en permettant à un plus grand nombre d’enfants vivant dans des régions isolées d’en bénéficier et en réduisant les quantités de vaccin gaspillées. Grâce à cette invention, on sait avec certitude si un vaccin a été abîmé par la chaleur pendant le transport ou le stockage et donc cesser de jeter les flacons de PVO en fin de séance, ou à cause d’une défaillance de la chaîne du froid.

2.2. Les pastilles de contrôle des vaccins : [24]

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. 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. 9).

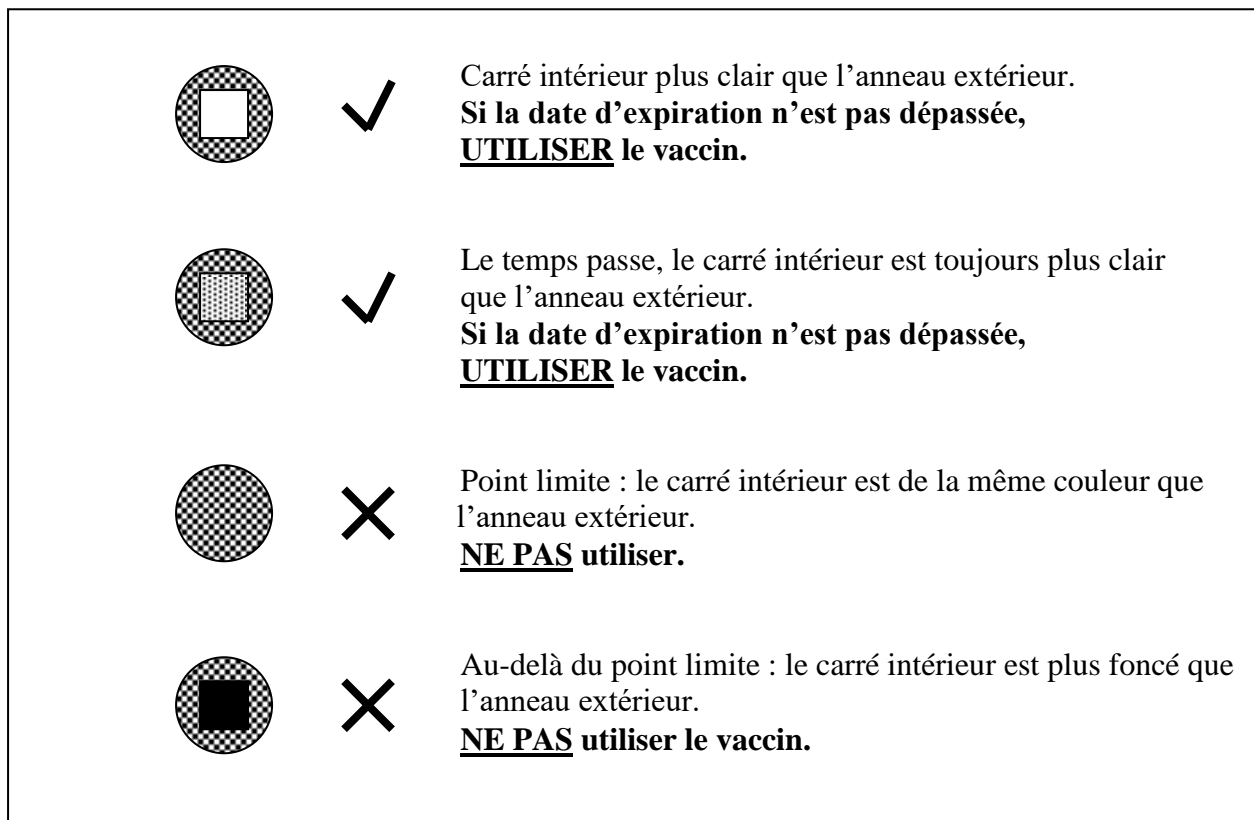


Fig. 11 : Pastille de contrôle des vaccins avec les quatre stades de l’exposition^[24]

3. THERMOSTABILITE : [34, 76]

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 et décider si le vaccin doit être détruit, envoyé pour analyse ou utilisé.

Afin de 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. 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.

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 (**Y₀**) interviennent également.

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

$$Y_t = Y_0 - Bt$$

En général, on peut dire que la stabilité des vaccins varie beaucoup. On peut les classer en fonction de leur résistance au stockage à des températures élevées. Les anatoxines diphtériques et tétaniques ainsi que les vaccins contre l'hépatite B étant les plus thermostables, le vaccin antirougeoleux lyophilisé et le BCG occupant une position intermédiaire et le vaccin antipoliomyélitique oral étant le plus fragile.

Les tableaux 4a et 4b présentent un résumé des informations concernant la stabilité des vaccins couramment utilisés dans les programmes nationaux de vaccination et les autres vaccins viraux et bactériens.

Tableau IV a : Stabilité des vaccins couramment utilisés dans les programmes de vaccination [24]

Vaccins ¹	Température 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 associés²	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 B²	Stable pendant 2 à 4 ans.	Stable pendant des mois.	Stable pendant des semaines.	A 45°C : stable pendant des jours.
Vaccin antirougeoleux³	Stable pendant 2 ans.	Garde une activité (jusqu'à 50%) pendant au moins un mois.	Garde une activité satisfaisante pendant au moins une semaine mais pourrait perdre 20 à 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 antiamaril³	Vaccines 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 antioquelucheux²	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.
BCG³	Stable pendant 1 ans.	Stabilité variée : 20 à 30% de baisse de la viabilité en 3 mois d'exposition.	Stabilité variée : 20% de baisse de la viabilité en 3 à 14 jours d'exposition.	Instable. A 70°C : 50% de baisse en 30 mn d'exposition.
Vaccin antipoliomyélitique oral³	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, antiamaril 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 antiamaril 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 IV b : Stabilité des autres vaccins viraux et bactériens. [24]

Vaccins	Température de stockage (°C)			
	0 - 8	22 - 25	35 - 37	Plus de 37
Vaccin antipoliomyélitique 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.
Vaccins 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 en traîne 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 nombres 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.

CHAPITRE III : CONTROLE ANALYTIQUE DES VACCINS :

1. LABORATOIRE NATIONAL DE CONTROLE DES MEDICAMENTS :

Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) est une division rattachée à la Direction du Médicament et de la Pharmacie (DMP), établissement public de l'état créé dans l'organigramme de fin de décembre 1994 mais sa naissance effective date d'avril 1996 à la nomination d'un directeur. Ce laboratoire est chargé du contrôle technique des médicaments et travaille en collaboration avec la division de la pharmacie.

La fonction principale du LNCM, telle que définie par le décret N° 2-72-273 du 1^{er} rebia II 1394 (24 avril 1974), est d'effectuer les analyses et essais que nécessite le contrôle des médicaments, des spécialités pharmaceutiques et objets de pansement et de tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine et vétérinaire, ainsi que des produits parapharmaceutiques.

La division du LNCM comprend :

- Le service de physico-chimie ;
- Le service de l'assurance-qualité ;
- Le service des essais biologiques.

Tous les services travaillent en étroite collaboration technique et scientifique. [42, 63, 69]

2. REGLEMENTATION PHARMACEUTIQUE :[1, 9, 54, 58, 59, 60, 62, 65]

2.1. Autorisation de Débit de Spécialité Pharmaceutique (ADSP) :

L'Autorisation de Débit de Spécialité Pharmaceutique (ADSP) garantit que tous les médicaments et les spécialités pharmaceutiques commercialisés ont été évalués par une autorité compétente.

Pour obtenir une ADSP, une demande doit être déposée auprès de la direction du médicament et de pharmacie (DMP), accompagnée d'un dossier documentant le produit : le dossier d'AMM. L'évaluation de la demande est effectuée suivant une procédure appelée « procédure d'enregistrement ».

Le formulaire de la demande, le dossier et la documentation qui les accompagne sont déposés au bureau des enregistrements à la division de la pharmacie. Ce dossier subit une vérification préliminaire puis l'établissement d'une fiche de dépôt. Des services compétents de la DMP vérifient par la suite la conformité de l'ensemble des éléments . En parallèle, le dossier technique est étudié à la division du LNCM. Un dossier complet pourra être programmé à l'examen par la commission technique des visas.

Cette commission peut émettre soit :

- Un avis favorable, et dans ce cas un accord de principe est établi. Cet accord se transformera en ADSP après analyse effectuée à la division du LNCM.
- Un ajournement qui oblige le demandeur à apporter les compléments nécessaires. Le dossier, avec compléments, sera programmé pour la commission suivante.
- Un refus peut être émis par la commission. Le demandeur peut introduire un recours. Si ce recours donne un deuxième avis défavorable lors de la prochaine réunion, le refus devient définitif.

2.2. Libération du lot de vaccin : [42, 54, 63, 65]

La mise en circulation de lots est un point essentiel dans le contrôle des vaccins et sérums, dont la composition est par définition variable et non définie chimiquement en raison de la nature biologique des matières premières, des processus de fabrication et des méthodes d'épreuve. C'est pourquoi une surveillance des vaccins et sérums après leur homologation suppose une mise en circulation lot par lot, chacun pouvant être considéré comme unique.

Les vaccins et sérums ayant déjà une ADSP sont libérés lot par lot par l'autorité nationale de contrôle. Elle doit déclarer la conformité du lot avec les spécifications approuvées dans le dossier d'ADSP et figurant dans les référentiels qualité correspondant à la spécialité (monographie de la pharmacopée européenne, les BPF et/ou rapport technique de l'OMS).

Pour cela, l'autorité nationale de contrôle doit s'acquitter des tâches ci-après :

- Assurer le contrôle technique des échantillons de produit ;
- Examiner attentivement le protocole récapitulatif de production et de contrôle (PC) fourni par le fabricant pour chaque lot . Le PC est un résumé du dossier de lot. Il décrit l'historique des lots de semences, précise les étapes et les contrôles tout au long de la production et ce jusqu'au produit fini, réparti et conditionné. Il est élaboré selon le modèle donné à l'annexe II ;
- Vérifier que l'étiquetage, l'emballage et la notice sont bien conformes aux conditions prévues dans l'enregistrement ;
- Etre en possession du certificat de libération établi par l'Autorité Nationale de Réglementation (ANR) du pays producteur et l'examiner.(voir l'annexe III)

Lorsque les pièces du PC et les résultats du contrôle sont validés, un certificat de libération lot par lot, à l'instar des pays les plus avancés, est délivré, qui permettra la mise sur le marché du lot. En cas de non conformité, le lot ne pourra être commercialisé.

3. CONTROLE ANALYTIQUE DES VACCINS :

3.1. Processus de contrôle : [23, 51, 59]

L'objectif du LNCM est de contrôler les échantillons des vaccins , tout en justifiant le cheminement analytique du processus (choix des méthodes d'essais, choix du matériel scientifique et du personnel...) afin de démontrer que les actions mises en œuvre et les décisions prises sont totalement maîtrisées et qu'elles répondent aux exigences de la qualité.

L'analyse du processus de contrôle des vaccins, a mis en évidence un cheminement logique en 6 étapes principales, schématisé par un logigramme et accompagné d'explications générales se rapportant à chaque étape.

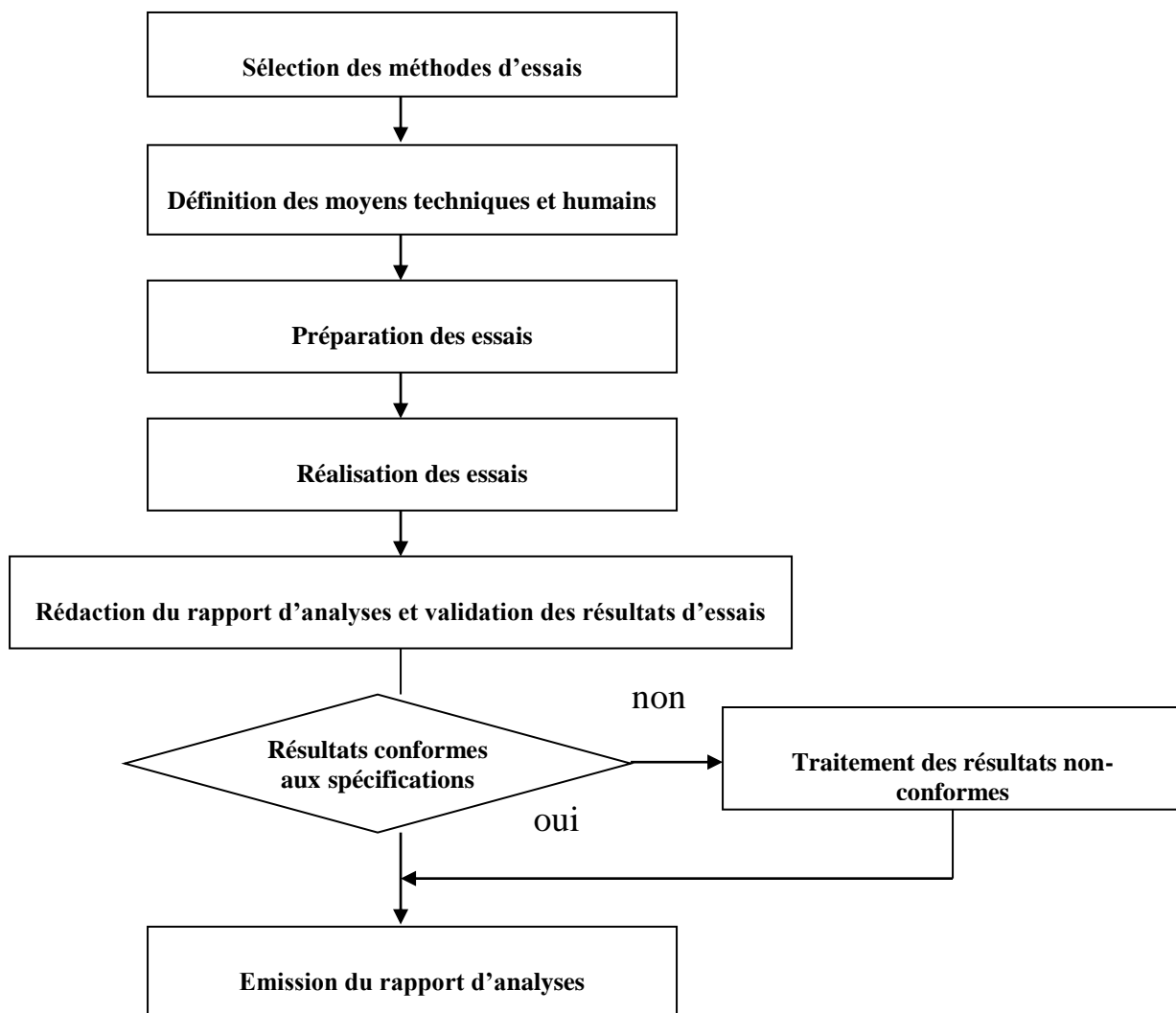


Fig. 12 : Le logigramme du processus de contrôle d'un vaccin
(source LNCM)

3.1.1. Sélection des méthodes d'essais :

L'unité des vaccins et sérums choisit des méthodes préexistantes publiées, et dans la mesure du possible, validées sur le produit fini, à partir des documents suivants :

- Les dossiers d'AMM du vaccin concerné ;
- La pharmacopée européenne ;
- Les recommandations de l'OMS (les séries de Rapport Techniques de l'OMS (SRT)).

Quelques monographies de la pharmacopée européenne concernant les vaccins humains et leur équivalent dans les rapports techniques de l'OMS sont reportés dans le tableau 5.

En général, ces méthodes d'essais doivent être validées ou leur validation doit être prouvée par l'utilisation (entre autre) de produits de référence aux caractéristiques connues.

3.1.2. Définition des moyens techniques et humains :

L'unité est constitué d'un personnel d'encadrement composé du responsable du bureau vaccins, qui propose ses conclusions sur les essais réalisés, de responsables d'essais qui pilotent les essais et assurent les décisions à prendre au cours du processus, d'un personnel technique expérimenté et qualifié pour mener la réalisation des essais.

Toute personne exerçant des fonctions au sein du LNCM est soumise aux dispositions concernant le secret et la discrétion professionnelle.

Le matériel est dans la mesure du possible, identique à celui spécifié dans la méthode d'essai. Au niveau du matériel déjà disponible à l'unité, le responsable des essais vérifie son bon état de fonctionnement et son aptitude pour l'emploi qui lui est destiné.

3.1.3. Préparation des essais :

L'analyste prépare le matériel (installation et mise en route de l'appareillage d'analyse et de mesure), les réactifs et échantillons (préparation des milieux de culture, des dilutions...) en vue de la réalisation des essais.

L'utilisation et le fonctionnement de l'équipement de mesure et d'analyse sont spécifiés dans des procédures et instructions opératoires, ces documents qualité sont rangés dans des classeurs placés à proximité de chaque poste de travail.

3.1.4. Réalisation des essais :

Les essais sont réalisés selon les méthodes préconisées et toutes les données brutes qui s'y rapportent aux essais sont conservées au fur et à mesure par l'opérateur, qui les inclura dans son rapport d'analyses final.

Toutes les données brutes recueillies au cours des essais sont datées et visées par l'agent technique opérateur des essais.

3.1.5. Rédaction du rapport d'analyses et validation des résultats d'essais :

L'opérateur des essais rédige le rapport récapitulatif de la totalité des essais réalisés sur l'échantillon, il y inclut tous les documents permettant d'effectuer la traçabilité de chaque essai (données brutes, formules de calculs, document de travail support écrit des méthodes d'essais employées).

La validation des résultats d'essais consiste à confirmer par examen et apport de preuves tangibles que les résultats obtenus satisfont aux critères de qualité de l'unité et aux référentiels en vigueur.

Les résultats non conformes sont toujours vérifiés et les décisions prises sont documentées.

3.1.6. Emission du rapport d'analyses :

Le rapport d'analyses (RA) rédigé par l'opérateur des essais et incluant tous les documents attestant de la réalisation des essais, est transmis pour correction au responsable des essais. Celui-ci rédige ses conclusions et établit un certificat de libération du lot.

3.2. La nature des contrôles : identité, activité, sécurité : [2, 15, 89]

Les contrôles pratiqués sont adaptés à la nature du vaccin considéré et sont en fonction des ressources disponibles en matière d'analyses au laboratoire. Les principaux caractères systématiquement vérifiés sont :

3.2.1. Identité :

Un principe actif biologique diffère des principes actifs issus de la chimie par une plus grande masse moléculaire et une structure globale plus complexe. Il s'agit souvent de mélanges de plusieurs espèces moléculaires, pas toujours bien identifiées. Dans la plupart des cas, les essais d'activité font office d'identité.

3.2.2. Activité/stabilité :

Le contrôle d'activité d'un vaccin est le reflet de son pouvoir immunogène qui, en toute rigueur, ne pourrait être vérifié que par une inoculation d'épreuve de l'agent pathogène chez des sujets vaccinés. Les contrôles d'activité peuvent mettre en œuvre des essais in vitro pour les vaccins viraux vivants ou des mesures de charge antigénique pour les vaccins inactivés, mais également des essais in vivo de vérification du pouvoir protecteur ou immunogène sur l'animal pour les vaccins viraux et bactériens (tableau 6).

Les vaccins vivants atténués étant souvent thermolabiles, on doit également s'assurer qu'ils ne perdent pas leur efficacité pendant le stockage, en mesurant la perte d'activité en conditions de dégradation accélérée (essai de stabilité).

Tableau V : Liste non exhaustive des monographies européennes et des normes OMS concernant les vaccins à usage humain

vaccin	Pharmacopée Européenne (*)		OMS		
	N°	Année	Norme	N° SRT	Année
Vaccins pour usage humain	153	1998			
Vaccin diphtérique et tétanique adsorbé pour adultes et adolescent	647	1997	8-10	800	1990
Vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé	445	1997	8-10	800	1990
Vaccin grippal inactivé (antigène de surface)	869	1997	17	814	1991
Vaccin grippal à virions entiers	159	1997	17	814	1991
Vaccin Haemophilus type b conjugué	1219	1999	46	814	1991
Vaccin inactivé de l'Hépatite A	1107	1998	49	858	1995
Vaccin méningococcique polysidique	250	1997	23	658	1981
Vaccin ourlien vivant	538	1999	47	840	1994
Vaccin pneumococcique polysidique	966	1997			
Vaccin poliomyélitique inactivé	214	2000	2	745	1987
Vaccin poliomyélitique oral	215	1997	7	800	1990
Vaccin rabique pour usage humain préparé sue culture cellulaire	216	2000		840	1994
Vaccin rougeoleux vivant	213	1999	47	840	1994
Vaccin rougeoleux, ourlien et rubéoleux vivant	1057	1999	47	840	1994
Vaccin rubéoleux vivant	162	1999	47	840	1994
Vaccin tétanique adsorbé	452	1997	8-10	800	1990
Vaccin typhoïdique	156	1997	15	361	1967
Vaccin typhoïdique cryodésséché	157	1997			
Vaccin typhoïdique polysidique	1160	1997	48	840	1994
Vaccin typhoïdique vivant, oral, souche Ty21a	1055	1997	34	700	1984
Vaccin varicelleux vivant	648	1997		848	1994
Vaccin amaril vivant	537	2000	3	594	1976
Vaccin BCG cryodésséché	163	1997	11	771	1988
Vaccin cholérique	154	1997	4	413	1969
Vaccin cholérique cryodésséché	155	1997	4	530	1973
Vaccin coquelucheux à germes entiers	160, 161	1997	8-10	800	1990
Vaccin coquelucheux acellulaire	1356	1999		878	1998
Vaccin de l'Hépatite B (ADNr)	1056	1997	45	786	1989
Vaccin diphtérique adsorbé	443	1997	8-10	800	1990
Vaccin grippal inactivé à virion fragmenté	158	1997	17	814	1991

(SRT : Série de rapports techniques ; (*) : Pharmacopée Européenne 1997 et Addendum 2000)

3.2.3. Sécurité :

La sécurité des vaccins est garantie par des contrôles de pureté du principe actif au regard de contaminants microbiens (bactéries, champignons, levures, virus...), prions, protéines et ADN cellulaire. Des essais de stérilité bactérienne et fongique (pharmacopée européenne 2.6.1., Addendum 2000), de recherche des agents viraux étrangers (pharmacopée européenne 2.6.16., Addendum 2000), dosages des endotoxines bactériennes (pharmacopée européenne 2.6.14., Addendum 2000) et des substances pyrogènes (pharmacopée européenne 2.6.8., 1997) sont entrepris systématiquement. Pour les vaccins inactivés, on ne doit déceler aucune particule résiduelle infectieuse ou toxique pour l'homme.

Comme pour tous les autres médicaments, les vaccins peuvent être soumis à des essais pharmacotechniques caractéristiques de la forme pharmaceutique, l'étude des excipients et des conservateurs, la recherche d'impuretés, de substances apparentées ou de produits de dégradation. Ainsi, des contrôles physico-chimiques sont pratiqués, soit en routine, soit par sondage, et donnant des informations sur les caractéristiques particulières d'une protéine pour certains vaccins. Il peut s'agir aussi de la détermination de l'osmolarité du produit, du pH, de l'humidité résiduelle dans le cas des produits lyophilisés ou de la recherche de molécules comme le conservateur, l'agent d'inactivation, l'aluminium dans les vaccins adsorbés.

Dans le présent chapitre on va voir les différents contrôles et essais exigés par la pharmacopée européenne, document de référence pour l'autorité nationale de contrôle de notre pays, pour le lot final des vaccins entrant dans le Programme National d'Immunsation (PNI).

Tableau VI : Méthodes de contrôle d'activité des vaccins préconisées par la pharmacopée Européen.[2]

Type de vaccin		Méthodes in vivo		Méthodes in vitro	
		Challenge test	Immunogénicité	Antigénicité	Titre viral/ Numération bactérienne
Vivant atténué	Bactérien	BCG			X
	Viral	Polio Rougeole Oreillons Rubéole Varicelle Fièvre jaune			X X X X X X
Inactivé	Bactérien	Diphtérie Tétanos Coqueluche à germes entiers Coqueluche acellulaire Typhoïde Vi Méningocoque Pneumocoque Haemophilus influenzae b	X X X	X X X X X	X X X
	Viral	Grippe Polio Rage Hépatite A Hépatite B	X	X X	X X X X

3.3. Contrôle analytique des vaccins :

3.3.1. Vaccin BCG (Intradermique) :

3.3.1.1. Vaccin :

3.3.1.1.1. Nom international : [70]

Vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin).

3.3.1.1.2. Composition et conservation : [83, 88, 89]

➤ Composition :

⌘ Lyophilisât :

p. dose

- Germes reviviscibles (particules cultivables de bacilles vivants atténués).....3 200 000 U à 800 000 U à
- Excipients : Dextron, glucose anhydre, triton WR 1339, albumine humaine.

⌘ Solvant : Eau pour préparation injectable (EPPT).....0, 1 ml.

➤ Conservation : [31]

Le vaccin est sensible à la lumière et à la chaleur. Il doit être conservé entre 0° et +8°C à l'abri de la lumière.

3.3.1.2. Contrôle :

3.3.1.2.1. Identification : [70]

Le vaccin BCG est identifié par examen microscopique des bacilles en frottis colorés (coloration de Ziehl), permettant de démontrer leur caractère acido-résistant, et par l'aspect caractéristique des colonies en culture sur milieu solide.

3.3.1.2.2. Recherche des Mycobactéries virulentes : [70]

- Utiliser 6 cobayes de 250 g à 400 g chacun, n'ayant pas subi de traitement susceptible de fausser l'essai.
- Injecter à chacun d'eux, par voie SC ou IM, une quantité de vaccin au moins équivalente à 50 doses humaines.

- Placer les animaux en observation pendant 42 jours au minimum, puis les sacrifier.
- Rechercher par autopsie des signes de tuberculose, sans tenir compte d'éventuelles réactions mineures au point d'injection.
- Examiner de même les animaux morts au cours de la période d'observation.

Le vaccin satisfait à l'essai si aucun des cobayes ne présente de signes de tuberculose et s'il ne meurt pas, pas plus d'un animal, pendant la période d'observation. Si 2 animaux meurent pendant cette période et si l'autopsie ne révèle aucun signe de tuberculose, l'essai est répété sur 6 autres cobayes.

Le vaccin satisfait à l'essai s'il ne meurt pas plus d'un de ces cobayes dans les 42 jours suivant l'injection et si l'autopsie ne révèle aucun signe de tuberculose.

3.3.1.2.3. Contamination bactérienne et fongique : [72]

Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité. (Voir 3.3.11. Essai de stérilité).

3.3.1.2.4. Réactivité dermique excessive : [70]

- Utiliser 6 cobayes sains de 250 g au maximum chacun, de couleur blanche ou claire, n'ayant pas subi de traitement susceptible de fausser l'essai.
 - Injecter à chacun d'eux, selon un plan aléatoire, par voie ID, 0,1 ml du vaccin reconstitué et 0,1 ml de ses 2 dilutions au 1/10 successives, ainsi que des doses équivalentes du vaccin de référence.
 - Observer pendant 4 semaines le développement des lésions aux points d'injection.

Le vaccin satisfait à l'essai si la réaction qu'il produit n'est pas sensiblement différente de celle produite par le vaccin de référence.

3.3.1.2.5. Nombre d'unités viables :[70]

La détermination du nombre d'unités viables contenues dans le vaccin reconstitué est faite par dénombrement des colonies sur milieu solide.

Le résultat obtenu se situe entre les nombres minimum et maximum indiqués sur l'étiquette (entre 800 000 et 3 200 000 unités).

Déterminer en parallèle le nombre d'unités viables contenues dans un vaccin de comparaison.

3.3.1.2.6. Stabilité thermique :[70]

- Maintenir des échantillons du vaccin cryodesséché à 37°C pendant 4 semaines.
- Déterminer le nombre d'unités viables contenues dans le vaccin après chauffage et dans le vaccin non chauffé, comme il est décrit ci-dessus.

Le nombre d'unités viables contenues dans le vaccin après chauffage n'est pas inférieur à 20 % de celui dans le vaccin non chauffé.

3.3.1.2.7. Teneur en eau :[36, 70, 71]

La teneur en eau est déterminée par semi-microdosage.

L'appareil est constitué par une fiole de titrage de 60 ml environ, munie de:

- deux électrodes de platine;
- d'un tube d'administration pour azote;
- d'un bouchon s'adsorbant à l'extrémité d'une burette;
- et d'un tube d'admission d'air protégé par un agent de dessiccation.

La prise d'essai est introduite par un tube latéral muni d'un bouchon rodé. Pendant le titrage, l'agitation est assurée à l'aide d'un agitateur magnétique ou par barbotage d'azote sec.

Le terme de la réaction est déterminé par Ampérométrie. Un circuit approprié constitué par un potentiomètre de 2000 Ω environ relié à une pile de 1,5 V permet d'appliquer un potentiel variable.

Ce potentiel est ajusté de façon à laisser passer un courant initial faible par les électrodes de platine connectés en série à un microampèremètre.

L'aiguille du microampèremètre dévie à chaque addition de réactif, puis revient immédiatement à sa position initiale. Le terme de la réaction est indiqué par une déviation persistant pendant 30 s au moins.

Utiliser le réactif iodosulfureux après avoir déterminé l'équivalent en eau. Les solutions et réactifs utilisés doivent être maintenus anhydres et préservés de l'humidité atmosphérique pendant le dosage ou. une quelconque manipulation. Le réactif iodosulfureux est conservé à l'abri de la lumière, de préférence dans une bouteille munie d'une burette automatique.

Dans la fiole de titrage, introduire 20 ml environ de méthanol anhydre ou d'EPPI (solvant prescrit dans la monographie).

Ajouter le réactif iodosulfureux jusqu'au virage ampérométrique.

Introduire rapidement dans la fiole la prise d'essai, agiter pendant 1 min, puis titrer par le réactif iodosulfureux jusqu'au virage ampérométrique.

La teneur en eau ne doit pas être supérieure à 3,0 %.

3.3.2. Vaccin Poliomyélitique Oral (VPO) :

3.3.2.1 Vaccin :

3.3.2.1.1. Nom international : [70]

Vaccin poliomyélitique oral.

3.3.2.1.2. Composition et conservation : [83, 88]

➤ Composition : p. dose

- Virus Polio type 1..... ≥ 300 000 DICC₅₀
- Virus Polio type 2..... ≥ 100 000 DICC₅₀
- Virus Polio type 3..... ≥ 300 000 DICC₅₀

- Excipients:

- √ Albumine humaine5 mg.
- √ Rouge de phénolqsp.....indication colorée.
- √ Solution molaire tamponnée de chlorure de magnésium.

➤ Conservation :

Le vaccin antipoliomyélitique est très fragile et sensible à la chaleur. Il doit être conservé à -20°C et peut être utilisé à cette condition jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage (2 ans).

3.3.2.2. Contrôle :

3.3.2.2.1. Identification :[47, 70]

A l'aide d'anticorps spécifiques, il est démontré que le vaccin à examiner contient les trois types du virus poliomyélitique indiqués sur l'étiquette. En effet, la neutralisation des virus par les AC spécifiques empêche leur effet cytopathogène sur des cultures cellulaires sensibles.

3.3.2.2.2. Stabilité thermique :

Maintenir des échantillons du vaccin à 37°C pendant 48 h. Déterminer la concentration totale, en virus du vaccin après chauffage, comme il est décrit ci-dessous. Déterminer en parallèle la concentration en virus d'un échantillon de vaccin non chauffé.

L'estimation de la différence entre concentration totale en virus du vaccin non chauffé et celle du vaccin après chauffage n'est pas supérieure à 0,5 log₁₀ unités virales infectieuses (DICC₅₀) par dose humaine unitaire.

3.3.2.2.3. Contamination bactérienne et fongique :

Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité. (Voir 3.3.11. Essai de stérilité)

3.3.2.2.4. Concentration en virus : [70]

Titrer le virus infectieux, au moins en triple, par la méthode décrite ci-dessous. Utiliser une préparation de référence appropriée de virus pour valider chaque titrage.

Le vaccin contient plusieurs types du virus poliomyélitique, chacun d'eux fait l'objet d'un titrage séparé, les autres types présents étant neutralisés au moyen d'un immunosérum spécifique approprié (ou, de préférence, un anticorps monoclonal).

Il s'agit d'un vaccin trivalent; le titre moyen estimé d'une dose humaine unitaire de vaccin n'est pas inférieur à:

- √ $1 \times 10^{6,0}$ unités virales infectieuses (DICC₅₀) pour le type 1.
- √ $1 \times 10^{5,0}$ unités virales infectieuses (DICC₅₀) pour le type 2.
- √ et à $1 \times 10^{5,5}$ unités virales infectieuses (DICC₅₀) pour le type 3.

□ Méthode :

- Dans des groupes de 8 à 12 cupules à fond plat d'une plaque de microtitrage, introduire 0,1 ml des différentes dilutions de la suspension virale choisie, puis un volume approprié d'une suspension cellulaire de la lignée Hep-2 (Cincinnati).
- Placer les plaques en incubation à une température appropriée.
- Examiner les cultures entre les 7^{ème} et 9^{ème} jours.

3.3.3. Vaccin Diphtérique, Tétanique et Coquelucheux adsorbé

(DTCoq) :

3.3.3.1. Vaccin : [83, 88, 89]

3.3.3.1.1. Nom international : [70]

Vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé.

Le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé est une préparation d'anatoxine diphtérique et d'anatoxine tétanique adsorbées sur un support minéral à laquelle une suspension de *Bordetella pertussis* inactivée a été ajoutée.

3.3.3.1.2. Composition et conservation :

➤ Composition : p. seringue

- Anatoxine diphtérique purifiée.....1 dose vaccinante*
- Anatoxine tétanique purifiée.....1 dose vaccinante**
- *Bordetella pertussis*.....> 4 UI.
- Excipient:

√ Hydroxyde d'aluminium exprimé en aluminium.....≤ 1,25 mg.

√ Mercurothiolate sodique (conservateur)≤ 0,05 mg.

√ Solution de NaCl à 0,9%qsp.....0,5 ml.

➤ Conservation :

Conservation entre +2° et +8°C. Tout risque de congélation doit être formellement évité.

En l'absence d'indicateur (*freeze-watch*) et en cas de doute procéder au test de floculation (voir Annexe IV).

*: Correspond à au moins 30 unités internationales c.à.d le pouvoir protecteur du vaccin est mesuré en parallèle avec l'étalon international de l'OMS ou avec l'étalon calibré par rapport à l'étalon international.

** : Correspond à au moins 60 unités internationales c.à.d le pouvoir protecteur du vaccin est mesuré en parallèle avec l'étalon international de l'OMS ou avec l'étalon calibré par rapport à l'étalon international.

3.3.3.2. Contrôle :

3.3.3.2.1. Identification : [70]

A. Dissoudre dans le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé une quantité suffisante de citrate de sodium pour obtenir une solution à 100 g/l. Faire incuber à 37°C pendant 16h environ et centrifuger jusqu'à obtention d'un liquide surnageant limpide, garder le culot de centrifugation pour l'identification **C**. Le liquide surnageant limpide réagit avec une antitoxine diphtérique appropriée en donnant un précipité.

B. Le liquide surnageant obtenu dans l'identification **A** réagit avec une antitoxine tétanique appropriée en donnant un précipité.

C. Le composant coquelucheux est identifié par agglutination, à l'aide des immunosérums spécifiques de *B. pertussis*, des bactéries remises en suspension à partir du culot de centrifugation obtenu dans l'identification **A** (D'autres méthodes appropriées peuvent être employées pour séparer les bactéries de l'adsorbant). L'identification peut également être faite suite à un essai d'activité.

3.3.3.2.2. Toxicité spécifique : [70]

□ Composants diphtérique et tétanique :

Utiliser 5 cobayes en bonne santé, pesant de 250 g à 350 g et n'ayant pas été traités auparavant par une substance susceptible de fausser l'essai. Injecter à chacun d'eux par voie SC une quantité équivalant à 5 fois la dose humaine unitaire indiquée sur l'étiquette.

Si, dans les 42 jours qui suivent l'injection, un des animaux présente des symptômes ou meurt de toxémie diphtérique ou tétanique, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

Si plus d'un animal meurt de causes non spécifiques, répéter l'essai une seule fois, si plus d'un animal meurt dans le second essai, le vaccin ne satisfait pas à l'essai.

□ **Composant coquelucheux :**

Utiliser au moins 10 souris en bonne santé, pesant de 14 g à 16 g réparties en deux groupes identiques pour le vaccin et pour la solution saline de contrôle. Les souris doivent être de même sexe ou mâles et femelles répartis également entre les groupes. Les animaux doivent avoir accès à la nourriture et à l'eau pendant 2h au moins avant l'injection et durant l'essai. Injecter à chaque souris du groupe à vacciner, par voie intrapéritonéale et sous un volume de 0,5 ml, une quantité de vaccin équivalent à au moins la moitié de la dose humaine unitaire. Injecter à chaque souris du groupe des témoins 0,5 ml d'une solution stérile de chlorure de sodium à 9 g/l, contenant de préférence la même quantité de conservateur antimicrobien que celle injectée avec le vaccin.

Peser les souris immédiatement avant l'injection puis 72 h et 7 jours après l'injection.

Le vaccin satisfait à l'essai, si:

- Après 72 h, la masse totale du groupe de souris vaccinées n'est pas inférieure à ce qu'elle était avant l'injection;
- Après 7 jours, le gain pondéral moyen par souris vaccinée n'est pas inférieur à 60% de celui des souris témoins;
- Au maximum 5% du nombre total de souris vaccinées meurent durant l'essai.

3.3.3.2.3. Dosage de l'aluminium :

Le vaccin DTCoq utilise l'hydroxyde d'aluminium comme adsorbant.

Le test est détaillé au paragraphe « 3.3.5.2.2. Dosage d'aluminium dans vaccin contre l'hépatite B ».

3.3.3.2.4. Conservateur antimicrobien : Dosage de Mercuriothiolate sodique :

C'est un conservateur antimicrobien ajouté aux vaccins inactivés. Cette addition est obligatoire lorsque la préparation est conditionnée dans les récipients multidoses. Dans le cas où il est utilisé, la teneur ne doit pas être inférieure à la teneur minimale qui s'est avérée efficace et elle n'est pas supérieure à 115% de sa teneur indiquée sur l'étiquette (0,05 mg).

➤ Principe :

Après minéralisation nitrique à chaud, les ions mercuriques sont réduits par le chlorure stanneux à l'état de mercure métallique. Celui-ci est volatile à la température ambiante, passe dans une cellule traversée par un faisceau issu d'une lampe à vapeur de mercure.

L'énergie transmise est proportionnelle à la quantité de mercure extraite de l'échantillon.

➤ Réactifs :

Etalon de mercure 1 µg/ml dans l'acide nitrique HNO₃.

KMNO₄ (permanganate de potassium) 50 g/l.

KNO₃ (nitrate de potassium) 5,6 g/l: 388 ml HNO₃ concentré/1 H₂O.

H₂SO₄ (acide sulfurique) 9N: 250 ml H₂SO₄ concentré/1 H₂O.

Chlorure stanneux à 100 g/l dans l'acide chlorhydrique (HCL) à 40%.

Les réactifs doivent être exempts de traces de mercure.

Standard à presque 10 mg/100 ml de merthiolate.

➤ Mode opératoire :

- **Minéralisation :**

	Blanc	Etalon ¹	Standard ²	Essai
Solution standard de merthiolate			20	
Prise d'essai (en µl)	5			20
HNO ₃ 14 N (en ml)				
Porter à 100°C pendant 2 h. Refroidir sous un courant d'eau froide. Transvaser le minéralisât dans une bouteille spéciale.				

- **Dosage :**

	Blanc	Etalon ¹	Standard ²	Essai
Etalon µl/m		1		
Eau potable (ml)	90	90	90	90
KMNO ₄ 50 g/l	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes	2 gouttes
HNO ₃ 5,6N (ml)	5	5	5	5
H ₂ SO ₄ 9N (ml)	5	5	5	5
Agiter ,ajouter rapidement Chlorure stanneux (ml)	5	5	5	5
Agiter violemment, mettre immédiatement l'aérateur en place sur la bouteille				

¹ Passer trois étalons. Ils doivent se situer entre 0,9 et 1,1 µg de mercure. Dans le cas contraire, réétalonner l'appareil.

² Vérifier que la valeur du standard se trouve dans les valeurs limites définies. Il sert à vérifier la responsabilité inter-essais.

- Lire directement la quantité de mercure sur l'échelle.

→ X g dans 20 µl

- Calculs:

$$\frac{X}{1000} \text{ (mg)} \cdot \frac{10000}{20} \text{ (ml)} \cdot 2 = X \cdot 10 \text{ mg de mercurothiolate / 100 ml}$$

Le merthiolate contient la moitié de son poids en mercure, d'où le coefficient multiplicateur 2.

3.3.3.2.5. Stérilité :

Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité (voir 3.3.11. Essai de stérilité.).

3.3.3.2.6. Formaldéhyde libre : [70]

- Comme nous l'avons vu précédemment, le formol (formaldéhyde) est un moyen chimique d'inactivation de la préparation. Sa teneur résiduelle sera donc dosée dans le produit fini.
- Préparer une dilution au 1/10 du vaccin à examiner.
- A 1 ml de la dilution, ajouter 4 ml d'eau et 5 ml de réactif à l'acétylacétone.
- Une solution témoin est préparée simultanément dans les mêmes conditions en remplaçant la dilution du vaccin à examiner par 1 ml d'une solution de formaldéhyde contenant 20 µg de formaldéhyde (CH₂O) par ml.
- Maintenir le tube dans un bain-marie à 40°C pendant 40 min.
- Examiner les solutions dans l'axe vertical des tubes, la solution à examiner n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin.

3.3.3.2.7. Activité : [70]

❖ Composant diphtérique :

La monographie du vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé exige l'évaluation de l'activité du composant diphtérique par un des titrages décrit ci-après.

La limite inférieure de confiance ($p=0,95$) de l'activité mesurée ne doit pas être inférieure à 30 UI. par dose humaine unitaire.

L'activité du vaccin diphtérique adsorbé est évaluée par détermination de :

- la dose nécessaire pour protéger les cobayes contre les effets d'une dose de toxine diphtérique provoquant, lorsqu'elle est administrée par voie ID, une lésion cutanée.
- ou la dose nécessaire pour protéger les cobayes contre l'effet d'une dose létale de toxine diphtérique lorsqu'elle est administrée par voie SC.

Cette dose est comparée à celle d'une préparation de référence étalonnée en unités internationales nécessaires pour assurer la même protection.

L'unité internationale (UI) correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international (EI), celui-ci est constitué par l'anatoxine diphtérique adsorbée sur hydroxyde d'aluminium.

La correspondance entre l'UI et l'EI est indiqué par l'OMS.

➤ Epreuve intradermique :

▣ Choix et répartition des animaux d'expérience :

- Utiliser des cobayes blancs en bonne santé, provenant d'un élevage homogène et dont la taille est suffisante pour le nombre de sites prescrit pour l'épreuve, la différence masse corporelles entre l'animal le plus lourd et l'animal le plus léger ne doit pas dépasser 100 g.

- Répartir les animaux en au moins 6 groupes égaux.
- S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, ajouter, pour vérifier son activité, 5 cobayes comme témoins non vaccinés. Les cobayes doivent être du même sexe, sinon les mâles et les femelles doivent être répartis également entre les groupes.

▫ Choix de la toxine d'épreuve :

Choisir une toxine d'épreuve contenant de 67 à 133 Ir/100 dans 1 Lf et 25 000 à 50 000 fois la dose minimale de réaction pour cobayes par Lf.

S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

▫ Préparation de la solution de la toxine d'épreuve :

- A partir de cette toxine, préparer immédiatement avant l'emploi dans un diluant approprié, une solution de toxine d'épreuve contenant 0,0512 Lf environ dans 0,2 ml.
- Préparer ensuite une série de 5 dilutions au 1/4 contenant respectivement 0,0128 Lf ; 0,0032 Lf; 0,0008 Lf; 0,0002 Lf et 0,00005 Lf environ dans 0,2 ml.

▫ Détermination de l'activité du vaccin :

- Préparer dans une solution de chlorure de sodium à 9 g/l, des dilutions du vaccin à examiner et de la préparation de référence de façon à ce que chaque groupe constitue une série de dilutions de raison de 2,5 au plus. Les dilutions intermédiaires, injectées par voie SC à raison de 1 ml par cobaye devant donner un score intradermique de 3 environ lors de l'épreuve.
- Répartir les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de cobaye. Injecter par voie SC à chaque cobaye 1 ml de la dilution attribuée à son groupe.

- Après 28 jours, raser les deux flancs de chaque cobaye et inoculer par voie ID à chaque cobaye vacciné 0,2 ml de chacune des 6 dilutions de la toxine d'épreuve dans des sites différents choisis pour minimiser l'interférence entre les sites adjacents.

▢ **Détermination de l'activité de la toxine d'épreuve :**

- Injecter aux animaux de contrôle non vaccinés des dilutions de la toxine d'épreuve contenant respectivement 80, 40, 20, 10 et 5×10^{-6} Lf.

▢ **Lecture et interprétation des résultats :**

- Examiner tous les sites d'injection, 48 h après l'injection de la toxine d'épreuve.
- Noter ceux qui présentent un érythème diphtérique spécifique.
- Le nombre de sites exempts d'érythème représente le score intradermique.
- Inscrire dans un tableau les scores ID pour tous les animaux ayant reçu la même dilution du vaccin. Les données sont utilisées, après une transformation appropriée telle que $(\text{score})^2$ ou $\arcsin((\text{score}/6)^2)$ pour calculer l'activité relative de chaque préparation à examiner par une analyse quantitative avec un modèle à une seule pente.

➤ **Epreuve létale :**

▢ **Choix et répartition des animaux d'expérience :**

- Utiliser des cobayes en bonne santé provenant d'un élevage homogène, pesant chacun de 250 g à 350 g . Les-répartir en au moins 6 groupes égaux.
- S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, on ajoute, pour vérifier son activité, 4 groupes de 5 cobayes témoins non vaccinés.

▢ **Choix de la toxine d'épreuve :**

- Choisir une toxine diphtérique contenant au minimum 100 DL₅₀/ml.
- S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

▮ Préparation de la solution de toxine d'épreuve :

- A partir de cette toxine, préparer immédiatement avant l'emploi, dans un diluant approprié, une solution de toxine d'épreuve contenant 100 DL₅₀ environ par ml.
- Si nécessaire préparer dans le même milieu des dilutions aux 1/32; 1/100 et 1/320.

▮ Détermination de l'activité du vaccin :

- Dans une solution de chlorure de sodium à 9 g/l, préparer des dilutions du vaccin à examiner et des dilutions de la préparation de référence de façon à ce que chaque groupe constitue une série de dilutions de raison 2,5 au plus. Les dilutions intermédiaires, injectées par voie SC à raison de 1,0 ml par cobaye devant protéger 50% environ des animaux des effets létaux provoqués par l'inoculation par voie SC de la quantité de toxine diphtérique prescrite pour cet essai.
- Répartir les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de cobayes.
- Injecter par voie SC à chaque cobaye 1 ml de la dilution attribuée à son groupe.
- Après 28 jours, inoculer par voie SC à chaque animal 1 ml de la solution de toxine d'épreuve (100 DL₅₀).

▮ Détermination de l'activité de la toxine d'épreuve :

Si nécessaire, administrer la solution de toxine d'épreuve et ses 3 dilutions à 4 groupes de 5 cobayes. Inoculer par voie SC à chaque cobaye dans chaque groupe 1 ml de la solution de toxine d'épreuve destinée à son groupe.

▮ Lecture et interprétation des résultats :

4 jours après l'injection de la toxine d'épreuve, noter le nombre de cobayes survivants. Calculer l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux survivants dans chaque groupe de cobayes vaccinés.

❖ Composant tétanique :

L'activité est évaluée par un des titrages prescrits ci-après.

Si l'essai est effectué sur cobayes, le vaccin satisfait à l'essai si la limite inférieure de confiance ($P= 0,95$) de l'activité mesurée n'est pas inférieure à 40 UI par dose humaine unitaire. Cependant, si l'essai est effectué sur souris, la limite inférieure de confiance de l'activité mesurée n'est pas inférieure à 60 UI par dose humaine unitaire.

L'activité du vaccin tétanique adsorbé est évaluée par détermination de la dose nécessaire pour protéger les cobayes ou les souris contre les effets paralysants d'une dose de toxine tétanique administrée par voie SC. Cette dose est comparée à celle d'une préparation de référence étalonnée en UI, nécessaire pour assurer la même protection.

Dans les territoires où l'usage de la méthode paralysante n'est pas obligatoire, l'essai par la DL₅₀ peut être utilisé. Dans ce cas, le nombre d'animaux et la méthode sont identiques à ceux qui sont décrits pour l'essai par la méthode paralysante. La seule différence réside dans le fait que la fin de l'essai est marquée par la mort et non par la paralysie de l'animal.

L'UI correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'EI, celui-ci est constitué par de l'anatoxine tétanique adsorbée sur l'hydroxyde d'aluminium.

La correspondance entre l'UI et l'EI est indiqué par l'OMS.

➤ Essai sur cobayes :

▣ Choix et répartition des animaux d'expérience :

- Utiliser des cobayes en bonne santé, provenant d'un élevage homogène, pesant chacun 250 g à 350 g. Répartir les animaux en au moins 6 groupes égaux.
- S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, ajouter pour vérifier son activité 4 groupes de 5 cobayes comme témoins non vaccinés.

▮ Choix de la toxine d'épreuve :

Choisir une toxine tétanique contenant au minimum 50 fois la dose paralysante 50% par ml. S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler, l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

▮ Préparation de la solution de toxine d'épreuve :

- A partir de cette toxine, préparer immédiatement avant l'emploi, dans un diluant approprié une solution de toxine d'épreuve contenant environ 50 doses paralysantes 50% par ml.
- Si nécessaire, préparer dans le même diluant des solutions 1/16, 1/50 et 1/60.

▮ Détermination de l'activité du vaccin :

- Préparer dans une solution de NaCl 9g/1, des dilutions du vaccin à examiner et des dilutions de la préparation de référence de façon à ce que chaque groupe de dilution constitue une série de raison 2,5 au plus. Les dilutions intermédiaires injectées par voie SC à raison de 1ml par cobaye, devant protéger 50% environ des animaux des effets paralysants provoqués par l'inoculation, par voie SC, de la quantité de toxine tétanique prescrite pour cet essai.
- Répartir les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de cobayes et injecter par voie SC à chaque cobaye 1 ml de la dilution attribuée à son groupe.
- Après 28 jours, inoculer par voie SC à chaque animal 1 ml de solution de toxine d'épreuve contenant 50 doses paralysantes 50%.

▮ Détermination de l'activité de la solution de la toxine d'épreuve :

- Si nécessaire, administrer la solution de toxine d'épreuve et ses dilutions à raison d'une pour chacun des 4 groupes de 5 cobayes.
- Inoculer par voie SC à chaque cobaye dans chaque groupe 1 ml de la solution de toxine d'épreuve destinée à son groupe.

▮ Lecture et interprétation des résultats :

- Examiner les cobayes 2 fois par jour, puis retirer ceux qui présentent des signes spécifiques de paralysie tétanique et pratiquer une euthanasie sur ces animaux.
- 5 jours après l'injection de la toxine d'épreuve, noter le nombre de cobayes exempts de paralysie.
- Calculer l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux éprouvés exempts de paralysie dans chaque groupe d'animaux vaccinés.

➤ **Essai sur souris :**

▮ Choix et répartition des animaux d'expérience :

- Utiliser des souris en bonne santé provenant d'un élevage homogène, pesant chacune de 14 g à 20 g.
- Répartir les souris en au moins 6 groupes égaux.
- S'il n'a pas été démontré que la toxine d'épreuve est stable ou si elle n'est pas standardisée de manière adéquate, ajouter pour vérifier son activité, 4 groupes de 6 souris comme témoins non vaccinés.

▮ Choix de la toxine d'épreuve :

- Choisir une toxine tétanique contenant au minimum 100 fois la dose paralysante 50% par ml.
- S'il a été démontré que la toxine d'épreuve est stable, il n'est pas nécessaire de contrôler l'activité de la solution de toxine d'épreuve lors de chaque titrage.

▮ Préparation de la solution de toxine d'épreuve :

- A partir de cette toxine, préparer immédiatement avant l'emploi dans un diluant approprié, une solution de toxine d'épreuve contenant environ 50 doses paralysantes 50% dans 0,5 ml.
- Si nécessaire, préparer dans le même diluant des dilutions aux 1/16, 1/50 et 1/160.

▮ Détermination de l'activité du vaccin :

- Préparer, dans une solution de NaCl 9g/l, des dilutions du vaccin à examiner et des dilutions de la préparation de référence de façon que chaque groupe constitue une série de dilutions de raison 2,5 au plus.
- Les dilutions intermédiaires, injectées par voie SC à raison de 0,5ml par souris, devant protéger 50% environ des animaux des effets paralysants provoqués par l'inoculation par voie SC de la quantité de toxine tétanique prescrite pour cet essai.
- Répartir les dilutions à raison d'une dilution pour chaque groupe de souris et injecter par voie SC à chaque souris 0,5 ml de la dilution attribuée à son groupe.
- Après 28 jours, inoculer par voie SC à chaque animal 0,5 ml de la solution de toxine d'épreuve contenant 50 doses paralysantes 50%.

▮ Détermination de l'activité de la solution de toxine d'épreuve :

Si nécessaire, administrer la solution de toxine d'épreuve et ses 3 dilutions à raison d'une pour chacun des 4 groupes de 6 souris. Inoculer par voie SC à chaque souris dans chaque groupe 0,5 ml de la solution de toxine d'épreuve destinée à son groupe.

▮ Lecture et interprétation des résultats :

- Examiner les souris 2 fois par jour.
- Retirer celles qui présentent des signes spécifiques de paralysie tétanique et pratiquer une euthanasie sur ces animaux.
- 4 jours après l'inoculation de la toxine d'épreuve, noter le nombre de souris exemptes de paralysie.
- Calculer l'activité du vaccin à examiner par rapport à celle de la préparation de référence sur la base de la proportion d'animaux éprouvés exempts de paralysie dans chaque groupe d'animaux vaccinés.

❖ **Composants coquelucheux :**

Après titrage du composant coquelucheux, l'activité mesurée ne doit pas être inférieure à 4 UI par dose humaine unitaire et la limite inférieure de confiance (P=0,95) de l'activité mesurée ne doit pas être inférieure à 2 UI par dose humaine unitaire.

L'activité du vaccin coquelucheux est évaluée par détermination de la dose protégeant les souris contre les effets d'une dose létale d'une souche de *B. pertussis*, administrée par voie intracérébrale.

La dose protectrice est comparée à celle d'une préparation de référence de vaccin coquelucheux étalonnée en unités internationales qui assure la même protection.

L'unité internationale correspond à l'activité d'une quantité donnée de l'étalon international; celui-ci est constitué du vaccin coquelucheux desséché. La correspondance entre l'UI et l'EI est indiqué par l'OMS.

▮ **Choix et répartition des animaux d'expérience :**

- Utiliser des souris saines, âgées de moins de 5 semaines, d'une souche appropriée, provenant d'un groupe homogène. L'écart de masse entre l'animal le plus lourd et l'animal le plus léger ne dépasse pas 5 g.
- Répartir les souris en 6 groupes d'au moins 16 animaux et 4 groupes de 10. Les souris doivent être de même sexe ou bien mâles et femelles réparties également entre les groupes.

▮ **Choix de la souche d'épreuve et préparation de la suspension d'épreuve :**

- Choisir une souche appropriée de *B. pertussis* entraînant la mort des souris dans les 14 jours qui suivent l'injection effectuée par voie intracérébrale.
- Si plus de 20% des souris meurent dans les premières 48h, après l'injection, la souche de *B. pertussis* ne convient pas.
- Effectuer une subculture et préparer une suspension bactérienne contenant 10g/l d'hydrolysat de caséine et 6g/l de NaCl ou dans une autre solution appropriée.

- Déterminer l'opacité de la suspension. Préparer une série de dilutions avec la même solution et les répartir à raison d'une dilution par groupe de 10 souris.
- Injecter par voie intracérébrale à chaque souris une dose (0,02ml ou 0,03ml) de la dilution attribuée à son groupe.
- Après 14 jours, compter le nombre des survivants dans chaque groupe et calculer la DL₅₀. A partir de cette valeur déterminer l'opacité théorique de la suspension qui contient 100 DL₅₀ dans chaque dose d'épreuve.
- Pour l'essai d'activité du vaccin à examiner, effectuer une nouvelle subculture de la même souche de *B. pertussis*.
- Récolter les bactéries et préparer une suspension d'opacité correspondant à 100 DL₅₀ environ par dose d'épreuve. Puis 3 dilutions de cette suspension.

▮ Détermination de l'activité du vaccin :

- Préparer une série de 3 dilutions du vaccin à examiner et une série de 3 dilutions analogues de la préparation de référence de façon que, dans chaque série, la dilution médiane corresponde à celle qui devrait protéger 50% environ des animaux contre l'effet léthal de la dose d'épreuve de la suspension de *B. pertussis*.
- Il convient, par exemple, d'utiliser des doses d'injection de 0,5 ml d'une concentration de 1/8, 1/40 et 1/200 de la dose humaine pour vaccin à examiner et d'une concentration de 0,5 UI; 0,1 UI et 0,02 UI pour la préparation de référence.
- Répartir les 6 dilutions à raison d'une dilution par groupe d'au moins 16 souris et injecter par voie intrapéritoniale à chaque souris la dose de la dilution attribuée à son groupe.
- Après 14 à 17 jours, inoculer, par voie intracérébrale à chaque animal, une dose de la suspension d'épreuve.
- Répartir la suspension d'épreuve et ses 3 dilutions sur les 4 groupes de 10 souris.
- Inoculer par voie intracérébrale à chaque souris la dose de la suspension attribuée à son groupe.

- Ne pas tenir compte des morts au cours des 48h suivant l'administration de la dose d'épreuve.
- Après 14 jours, noter le nombre de souris survivants dans chacun des groupes.
- Calculer l'activité des vaccins à examiner par rapport à l'activité de la préparation de référence sur la base du nombre d'animaux survivants dans chaque groupe d'au moins 16 souris.

3.3.4. Vaccin Antirougeoleux Vivant (VAR) :

3.3.4.1. Vaccin : [70, 71, 88]

3.3.4.1.1. Nom international : [72]

Vaccin rougeoleux vivant.

3.3.4.1.2. Composition et conservation :

➤ Composition :

- Lyophilisat : p. flacon
 de virus vivant hyperatténué de la rougeole souche Schwarz ≥ 1000 DICC₅₀.
 Excipient : albumine humaine.

- Solvant : p. seringue
 Eau pour préparation injectable0,5 ml.

➤ Conservation :

Vaccin thermosensible donc à conserver entre 0° et +8°C, à l'abri de la lumière; le solvant est également conservé au réfrigérateur.

3.3.4.2. Contrôle :

3.3.4.2.1. Identification : [70, 72]

Cette épreuve est effectuée par une neutralisation de l'effet cytopathogène sur cellule sensible (on pourra par exemple, utiliser les cellules Vero).

Lorsque le vaccin, reconstitué d'après les indications de l'étiquette, est mélangé à des anticorps spécifiques du virus rougeoleux, il n'infecte plus des cultures cellulaires sensibles.

3.3.4.2.2. Stabilité thermique : [72]

Maintenir des échantillons du lot final de vaccin cryodésséché à l'état sec à 37°C pendant 7 jours. Selon les modalités décrites ci-dessous, déterminer la concentration en virus du vaccin après chauffage et effectuer en parallèle le titrage d'un échantillon de vaccin non chauffé maintenu à $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

La concentration en virus du vaccin après chauffage ne doit pas être inférieure de plus de $1,0 \log_{10}$ de la valeur obtenue avec le vaccin non chauffé.

3.3.4.2.3. Concentration en virus : [70, 72]

Le virus infectieux est titré au moins en triple, en utilisant au moins 5 cultures cellulaires pour chaque étape de dilution $0,5 \log_{10}$ ou par une méthode de précision équivalente.

Utiliser une préparation de référence de virus appropriée pour valider chaque titrage.

La concentration estimée en virus n'est pas inférieure à celle indiquée sur l'étiquette. La concentration minimale en virus indiquée sur l'étiquette n'est pas inférieure à 1×10^3 DIC₅₀ par dose humaine.

L'essai n'est pas valable si l'intervalle de confiance ($P=0,95$) du logarithme de la concentration en virus est $> \pm 0,3$.

3.3.4.2.4. Contamination bactérienne et fongique : [72]

Le vaccin reconstitué satisfait à l'essai de stérilité (voir 3.3.11. essai de stérilité).

3.3.4.2.5. Teneur en sérum-albumine bovine : [72]

La teneur en sérum-albumine bovine est déterminée par une méthode immunochimique appropriée.

La teneur ne doit pas être supérieure à 50 ng par dose humaine unitaire.

3.3.4.2.6. Teneur en eau : [70]

La teneur en eau est déterminée par semi-microdosage.

La méthode est détaillée précédemment dans la paragraphe « teneur en eau du vaccin BCG».

La teneur en eau ne doit pas être supérieur à 3%.

3.3.4.2.7. Toxicité anormale : [70]

- Injecter par voie intrapéritoniale à 5 souris saines, pesant chacune de 17 g à 22 g, une dose humaine reconstituée sans dépasser 1 ml par animal. .
- Observer les animaux pendant 7 jours.
- Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne manifeste de symptômes de maladie et si plus d'un animal meurt, le produit examiné doit être rejeté.
- Si l'un des animaux meurt ou manifeste des symptômes de maladie, répéter l'essai.
- Le produit satisfait à l'essai si aucun des animaux du 2^{ème} groupe ne meurt ou ne manifeste de symptôme de maladie au cours de la période d'observation prescrite.
- Effectuer également un essai sur 2 cobayes en bonne santé pesant chacun de 250 g à 350 g en injectant par voie intrapéritoniale à chacun d'entre eux une dose humaine sans toutefois dépasser 5 ml par animal.
- Observer les animaux pendant 7 jours.
- Le résultat est satisfaisant si aucun des animaux ne manifeste de symptômes de maladie.
- Si plus d'un animal meurt, le produit examiné doit être rejeté. Si l'un des animaux meurt ou manifeste des symptômes de maladie, répéter l'essai. .
- Le produit satisfait à l'essai si aucun des animaux du 2^{ème} groupe ne meurt ou ne manifeste de symptômes au cours de la période d'observation prescrite.

3.3.5. Vaccin de l’Hépatite B (HB) :

3.3.5.1. Vaccin :

3.3.5.1.1. Nom international : [83, 88]

Vaccin de l’hépatite B (ADNr).

Le vaccin de l’hépatite B (ADNr) est une préparation de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ag HBs), adsorbé sur un support minéral tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium.

L'antigène est obtenu par la méthode dite de l'ADN recombinant.

3.3.5.1.2. Composition et conservation :

➤ Composition : p. dose vaccinante
(forme pédiatrique)

- Ag protéique HBs (Ag HBs)*10 µg.
- L'excipient: L'hydroxyde d’Al, NaCl, Formaldéhyde, conservateur (mercurothiolate sodique).
- Eau distillée.....qsp..... 0,5 ml.

➤ Conservation : [39]

Le vaccin doit être conservé dans un réfrigérateur entre 0° et +8°C et ne doit jamais être congelé.

En l’absence d’indicateur (freeze-watch), il n’est pas recommandé d’utiliser le test de floculation qui ne permet pas, dans ce cas, d’évaluer si le vaccin a été congelé ou non.

3.3.5.2. Contrôle : [46, 49, 72]

3.3.5.2.1. Identification :

La détermination de l’activité ou, dans les cas appropriés le profil électrophorétique, servent à identifier le vaccin.

3.3.5.2.2. Dosage de l'Aluminium : [70]

Ce test est également utilisé pour le dosage de l'aluminium dans le vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé qui utilise l'hydroxyde d'aluminium comme adsorbant.

→ **Essai** :

- Homogénéiser la préparation à examiner ;
- Prélever une quantité présumée contenant 5 mg à 6 mg ;
- Introduire la prise d'essai dans un matras à minéralisation de 50 ml.
- Ajouter : 1 ml d'acide sulfurique ;
0,1 ml d'acide nitrique ;
quelques billes de verre.
- Chauffer la solution jusqu'à dégagement de vapeurs blanches épaisses.
- S'il se produit une carbonisation, ajouter quelques gouttes d'acide nitrique et maintenir l'ébullition jusqu'à décoloration.
- Laisser refroidir pendant quelques minutes, ajouter avec précaution 10 ml d'eau et porter à ébullition jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.
- Laisser refroidir, ajouter 0,05 ml de solution de méthylorange et neutraliser avec la solution concentrée d'hydroxyde de sodium (6,5 ml à 7 ml).
- Dissoudre par l'acide sulfurique dilué et ajouté goutte à goutte, le précipité qui va se former.
- Introduire la solution dans une fiole conique de 250 ml et rincer le matras avec 25 ml d'eau.
- Ajouter 25 ml d'édédate de sodium 0,02 M (solution de EDTA), 10 ml de solution tampon acétate pH 4,4 et quelques billes de verre.

- Faire bouillir doucement pendant 3 min.
- Ajouter 0,1 ml de solution de pyridylazonaphtol et titrer la solution chaude par le sulfate de cuivre 0,02 M jusqu'au virage au brun-pourpre.
- Effectuer un essai à blanc en émettant le vaccin à examiner.

1 ml d'édédiate de sodium 0,02 M correspond à 0,5396 mg d'aluminium.

Le vaccin doit contenir au maximum 1,25 mg d'aluminium par dose humaine unitaire.

3.3.5.2.3. Formaldéhyde libre :

Le dosage du formaldéhyde libre est détaillé précédemment, au niveau du contrôle du vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé (Voir 3.3.3.2.6. Formaldéhyde libre).

3.3.5.2.4. Conservateurs antimicrobiens :

Il s'agit du mercurothiolate sodique.

L'essai est déjà décrit au niveau du contrôle du vaccin diphtérique, tétanique et coquelucheux adsorbé «3.3.3.2.4. Conservateurs antimicrobiens: dosage de mercurothiolate sodique».

3.3.5.2.5. Activité : [70]

Le titrage de l'activité du vaccin de l'hépatite B (ADNr) est effectué soit in vivo, par comparaison de la capacité respective du vaccin et d'une préparation de référence à induire la formation d'AC spécifiques dirigés contre l'Ag de surface de l'hépatite B (HBs Ag) chez la souris ou le cobaye, soit in vitro, par une méthode immunochimique de détermination de la teneur en Ag.

➤ **Essai in vivo :**

▮ **Choix et répartitions des animaux d'expérience :**

- Utiliser des souris saines provenant d'un même élevage, âgées de 5 semaines environ. La souche de souris choisie doit donner une courbe dose-réponse à l'Ag présentant une pente significative.
- On peut également utiliser des cobayes sains de 300-350 g (de 7 semaines) provenant d'un même élevage.
- Les animaux sont répartis en 7 groupes.

▮ **Détermination de l'activité du vaccin à examiner :**

- Préparer au moins 3 dilutions du vaccin à examiner avec une solution de Chlorure de sodium à 9 g/l, contenant l'adjuvant à base d'Aluminium utilisé dans le vaccin, ou avec un autre diluant approprié.
- Préparer de la même manière des dilutions équivalentes de la préparation de référence.
- Affecter une dilution différente à chaque groupe d'animaux et injecter à chaque animal, par voie intrapéritonéale, 1 ml au maximum de la dilution affectée à son groupe.
- Un groupe de témoins non vaccinés reçoit une injection intrapéritonéale du même volume de diluant.
- Après un délai approprié (par exemple 4 à 6 semaines), anesthésier et saigner les animaux, en recueillant séparément les sérums.
- Effectuer sur chaque sérum un dosage des AC spécifiques dirigés contre l'HBs Ag par une méthode immunochimique appropriée.

▮ Calculs :

- Effectuer le calcul statistique spécifique habituel pour les dosages fondé sur une réponse qualitative.
- A partir de la distribution des niveaux de réaction mesurés sur tous les sérums du groupe d'animaux non vaccinés, déterminer le niveau de réaction maximal pouvant être attendu chez un animal non vacciné pour le titrage en question. Toute réponse supérieure à ce seuil chez un animal vacciné constitue par définition une séroconversion.
- Effectuer une transformation appropriée du pourcentage d'animaux de chaque groupe présentant une séroconversion, analyser les données log dose-réponse selon un modèle en lignes parallèles.
- Déterminer l'activité relative de la préparation à examiner par rapport à la préparation de référence.

▮ Conditions de validité :

L'essai n'est valable que si :

- Pour la préparation à examiner et la préparation de référence, la DL₅₀ se situe entre la plus faible et la plus forte dose administrée aux animaux.
- La limite de confiance de l'activité relative se situe entre 33 et 300% de l'activité estimée.

➤ **Essai in vitro :**

Effectuer une détermination immunochimique de la teneur en Ag, les critères d'acceptabilité étant validés par rapport à l'essai in vivo.

3.3.5.2.6. Stérilité :

Le vaccin satisfait à l'essai de stérilité.(voir 3.3.11. Essai de stérilité).

3.3.5.2.7. Pyrogène :

Le vaccin satisfait à l'essai des pyrogènes.

Injecter à chaque lapin l'équivalent d'une dose humaine.

L'essai sera détaillé après.(voir 3.3.9. Pyrogène).

Après avoir présenté les essais recommandés par la monographie de chaque vaccin, il semble nécessaire d'ajouter un certain nombre de contrôles qui sont obligatoires pour les formes pharmaceutiques injectables.

Tant que les vaccins sont pour la plupart des préparations injectables ils doivent répondre à un certain nombre d'exigences.

Les principaux contrôles concernent:

- La limpidité pour les solutions,
- Le pH qui doit être aussi voisin que possible de la neutralité,
- La pression osmotique qui doit se rapprocher de celle du plasma,
- La recherche des substances pyrogènes (ce test figure dans la monographie du vaccin contre l'hépatite B),
- Et enfin la stérilité (ce test figure dans toutes les monographies déjà présentées mais sera détaillé par la suite).

En général, les vaccins se distinguent des autres médicaments par le fait qu'ils sont obtenus à partir d'organismes vivants, qui peuvent aller de microorganismes normaux ou modifiés génétiquement à des tissus d'origine humaine, et qu'ils possèdent fréquemment une structure moléculaire non définie.

Grâce à ceci, les vaccins en plus de l'ADSP (Autorisation de Débit des Spécialités Pharmaceutiques), l'autorité nationale de contrôle exige un certificat de «libération de lot» lot par lot pour leur mise en circulation. [54, 60, 63, 65]

3.3.6. Limpidité/contrôle optique : [39]

Seul est exigé actuellement, un examen visuel dans les meilleures conditions d'observation. Ceci signifie que la solution à examiner doit être éclairée de telle sorte qu'il y ait une différence de brillance suffisante d'une part entre les particules en suspension et la solution et d'autre part entre les particules et le fond sur lequel sont observés les ampoules ou flacons.

Le contrôle optique d'une préparation injectable comprend : le contrôle de son aspect, de sa coloration et le contrôle de sa limpidité.

Très souvent, dans les solutions injectables, l'apparition d'une coloration anormale est facile à détecter par un examen visuel du récipient sur fond blanc. Pour les solutions colorées les changements de couleurs sont détectés par comparaison avec un témoin et éventuellement avec une gamme étalon approprié ou même à l'aide d'un électrophotomètre.

Dans le cas des récipients en verre, l'emploi du verre incolore rend plus facile le contrôle.

Le contrôle de la limpidité ne concerne évidemment que les solutions injectables. D'après la pharmacopée, les solutions pour usage parentéral, examinées dans les conditions appropriées de visibilité, sont limpides et pratiquement exemptes de particules.

La limpidité est assurée par filtration clarifiante sur une membrane filtrante. Certaines d'entre elles cèdent elles-mêmes quelques particules (fibres surtout). Elles doivent donc être suivies d'une plaque ou membrane qui n'en cède pas: verre fritté ou membrane d'ester de cellulose (antivoltigeur).

L'examen visuel doit se faire sur toutes les ampoules ou flacons de chaque lot en cours de la production.

Divers types de visionneuses sont alors utilisables: dans un type très classique l'échantillon observé à travers une loupe se détache sur un fond de verre dépoli derrière lequel se trouve l'éclairage, dans un autre le faisceau lumineux pénètre par le fond de l'échantillon qui est observé latéralement sur un fond noir...

Des appareils ont été mis au point pour détecter les particules dans les ampoules. Ces appareils ont le défaut de ne détecter que les particules en suspension, c. à. d celles qui peuvent être mises en mouvement par agitation des ampoules.

En plus de ce contrôle obligatoire réalisé sur 100% des récipients d'un lot de fabrication, il est conseillé de faire un examen plus approfondi sur quelques échantillons prélevés au hasard. Ceci pour mieux apprécier la qualité de la fabrication et l'améliorer dans la mesure du possible.

3.3.7. Neutralité : [39, 70]

Le pH joue un rôle important dans la fabrication des préparations injectables du fait qu'il conditionne:

- La tolérance par l'organisme et en particulier celles des hématies,
- La stabilité du produit donc sa conservation,
- Et parfois son activité.

Le pH du sang, de la lymphe et du liquide céphalorachidien donc des liquides de l'organisme est de l'ordre de 7,35 - 7,40.

Le pH des vaccins doit être proche de la neutralité. Mais il arrive souvent qu'un pH voisin de 7 ne soit pas compatible avec la stabilité du principe actif.

La tolérance et la stabilité d'un produit varient avec le pH et ces deux facteurs ne sont pas optimisés au même pH.

Si la stabilité de la substance active exige un pH non physiologique, elle peut être produite sous forme de poudre stérile à dissoudre au moment de l'emploi, dans de l'eau pour préparation injectable ou avec une solution isotonique neutre.

Si l'optimum de la stabilité du principe actif est observé dans une zone de pH étroite voisine de la neutralité, il y a intérêt à ajuster le pH avec une solution tampon.

Pour le choix d'un mélange tampon, il faut tenir compte de son pouvoir tampon. Les mélanges de phosphate monosodique et disodique sont les plus utilisés pour les préparations injectables. Ils permettent de tamponner à des pH de 5,4 à 8 selon la proportion des deux sels. Leur pouvoir tampon atteint son maximum à pH = 6,8 donc au voisinage de la neutralité.

La méthode de détermination du pH est la potentiométrie. Elle est effectuée par la mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongeant dans la solution à examiner, l'une des électrodes est sensible aux ions hydrogènes (le plus souvent, une électrode de verre) et l'autre est une électrode de comparaison (par exemple une électrode au calomel saturé).

L'appareil de mesure est un voltmètre habituellement gradué en unité pH. Sa résistance d'entrée doit être au moins 100 fois supérieure à celles des électrodes utilisées et sa sensibilité doit être au minimum de 0,05 unité pH soit au minimum 0,003 V.

Les contrôles qui doivent être effectués :

- Mesure de pH qui peut être changé avec les opérations pharmaceutiques (filtration, stérilisation) au cours de la conservation.
- Mesure du pouvoir tampon.

3.3.8. Isotonie et osmolarité : [39, 70]

Les préparations injectables, qui doivent entrer en contact avec les liquides tissulaires, doivent avoir dans la mesure de possible la même pression osmotique que les liquides physiologiques. Ceci est particulièrement important pour les solutions intraveineuses qui devront avoir une pression osmotique voisine de celle du plasma sanguin.

→ **Détermination de l'osmolarité** :

En pratique, l'osmolalité est une façon globale de mesurer la contribution des

différents solutés, présents dans une solution, à la pression osmotique de cette solution.

Une valeur approximative est acceptable de l'osmolalité ϵ_m d'une solution aqueuse est donnée par :

$$\epsilon_m = v m \Phi$$

v : Coefficient d'ionisation, $v = 1$ si le soluté n'est pas ionisé. Sinon, il correspond au nombre total d'ions préexistants ou éventuellement formés par solvolysse à partir d'une molécule du soluté.

m : Molalité de la solution (nombre de moles de soluté par kilogramme de solvant).

Φ : Coefficient osmotique molal. Il dépend de la valeur de m et permet de tenir compte des interactions entre ions de charge opposée au sein d'une solution, Φ est difficilement mesurable lorsque la complexité des solutions augmente.

L'unité d'osmolalité est l'osmole par kilogramme (osmol/Kg) mais très généralement son sous-multiple, la milliosmole par kilogramme (mosmol/Kg) qui est utilisé.

La difficulté de la mesure directe de la pression osmotique a conduit les expérimentaux à l'évaluer indirectement. On préfère déterminer l'abaissement du point de congélation de la solution à examiner par rapport à celui de l'eau distillée. Cette baisse est proportionnelle à la pression osmotique, elle varie avec le nombre de particules dissoutes (ions et molécules).

D'après la loi de Raoult, on a :

$$\Delta t = - K_i C/M$$

Δt : Abaissement du point de congélation.

K : Constante qui ne dépend que du solvant.

C : Concentration en grammes pour 100 g de solvant.

M : Poids moléculaire de substance dissoute.

i : Coefficient de dissociation.

La relation entre osmolalité et abaissement de point de congélation Δt est:

$$\varepsilon_m = (\Delta t/1,86) 1000 \text{ mosmol/Kg}$$

Il existe des appareils qui permettent la détermination directe de l'abaissement cryoscopique: Ce sont les osmomètres.

L'osmomètre comprend :

- Un système de refroidissement du récipient de mesure;
- Un système de mesure de la température constitué d'une résistance sensible aux variations de la température (thermistance), muni d'un dispositif approprié de mesure du courant ou de la différence de potentiel. Il peut être étalonné en abaissement de température ou directement en osmolalité.

L'appareil est généralement muni d'un dispositif permettant l'agitation du prélèvement.

→ **Mode opératoire** :

Préparer la solution de référence selon les indications du tableau VII :

Tableau VII : Solution de référence pour étalonnage de l'osmomètre

Masse en grammes de chlorure de sodium par kilogramme d'eau	Osmolalité réelle (mosmol/kg)	Osmolalité idéale (mosmol/kg)	Coefficient osmotique	Abaissement cryoscopique
3,087	100	105,67	0,9463	0,186
6,260	200	214,20	0,9337	0,372
9,463	300	323,83	0,9264	0,558
12,684	400	434,07	0,9215	0,744
15,916	500	544,66	0,9180	0,930
19,147	600	655,24	0,9157	1,116
22,380	700	765,86	0,9140	1,302

Déterminer le zéro de l'appareil avec de l'eau distillée. Etalonner l'appareil à l'aide des solutions de référence, en introduisant 50 à 250 µl d'échantillon dans la cellule de mesure en déclenchant le système de réfrigération.

Généralement, la mise en marche de l'agitateur est programmée à une température inférieure à l'abaissement cryoscopique prévu afin d'arrêter la surfusion. Un système approprié indique la réalisation de l'équilibre. Avant chaque mesure, rincer la cellule de mesure avec la solution à examiner.

Les mêmes opérations sont réalisées avec la préparation à examiner. L'osmolalité est calculée à partir de l'abaissement cryoscopique mesuré (par l'expression déjà citée).

La valeur doit être comprise entre deux valeurs de la gamme d'étalonnage.

Les vaccins doivent être isotoniques, c'est à dire doivent avoir la même osmolalité qu'une solution à 9‰ de NaCl. Cette osmolalité est de 279 milliosmoles par kg. La valeur de l'abaissement du point de congélation est de $-0,52^{\circ}\text{C}$.

L'isotonisant le plus classique est le chlorure de sodium.

En cas d'incompatibilités, on peut avoir recours à un autre sel ou un sucre comme le glucose. Ceci explique l'intérêt de la présence du chlorure de sodium ou de glucose dans la composition de certaines préparations injectables telles que les vaccins.

3.3.9. Pyrogènes : [39, 70]

Les préparations injectables doivent être apyrogènes c'est à dire ne pas renfermer de substances susceptibles de provoquer, après injection, une brusque élévation de température.

Les substances pyrogènes peuvent être:

- Des substances naturelles d'origine minérale (Cu, Zn...),
- Des substances chimiques de synthèse,

- Des substances d'origine biologique le plus souvent des endotoxines.

Les pyrogènes bactériens sont le plus souvent des endotoxines des bactéries Gram-.

L'essai des pyrogènes est prescrit pour les volumes injectables de plus de 15 ml. Au dessous de 15 ml, l'essai est exigé seulement dans le cas où l'étiquette porte la mention «apyrogène». Il n'est pas exigé lorsque la recherche des endotoxines bactériennes est prescrite ou autorisée.

L'absence de substances pyrogènes dans les solutions aqueuses injectables se vérifie en injectant un certain volume de ces préparations à des lapins dont on suit l'évolution de la température rectale. Cet essai est décrit avec précision pour éviter dans la mesure du possible les erreurs d'interprétation.

3.3.9.1. Choix des animaux :

L'animal utilisé est le lapin qui a la propriété d'avoir la même sensibilité aux pyrogènes que l'homme, mais il a l'inconvénient d'être sensible aussi à toute variation de température, ainsi qu'au stress ce qui rend l'essai délicat.

On choisit des animaux mâles ou femelles pesant au moins 1,5 kg et ne dépassant pas 3 kg. Ils sont placés en cages individuelles et y sont maintenus pendant une semaine au moins à un régime complet et uniforme.

Dans ces conditions ils ne doivent subir aucune perte de poids.

Pendant cette période, on contrôle la température normale de la pièce. La température normale du lapin est voisine de 39°C. On vérifie que les animaux présentent une sensibilité normale à l'égard des pyrogènes en leur injectant une quantité connue d'une solution pyrogénique convenable ou d'une solution reconnue pyrogène dans une expérience antérieure récente. Les lapins, qui ne réagissent pas, ne sont pas retenus pour l'essai.

3.3.9.2. Matériel :

Il comprend :

- Des thermomètres adaptés aux lapins ou des sondes thermoélectriques convenables d'une précision de 0,1 °C. Ce dispositif est introduit dans le rectum du lapin à une profondeur de 5 cm environ; cette profondeur doit rester constante pendant toute la période de l'essai.
- Des seringues et aiguilles apyrogènes soigneusement lavées, rincées avec de l'eau apyrogène et maintenues au four à air chaud pendant 30 min à 250° ou 1 h à 200°C.
- Des dispositifs de fixation: les lapins sont placés dans des boites munies d'un dispositif qui maintient l'animal par la nuque à l'aide d'un collier spécial non serré. Ce dispositif, laissant libre le reste du corps du lapin, lui permet de garder une position normale.

Les animaux ne sont pas immobilisés par des courroies analogues susceptibles de présenter un facteur de stress. Ils sont placés dans les boites au moins 1 h avant le 1^{er} enregistrement de la température et y restent jusqu'à ce que l'essai soit achevé.

3.3.9.3. Technique de l'essai :

Au cours des quatre heures qui précèdent l'essai et pendant la durée de celui-ci, les lapins sont maintenus dans une pièce où les conditions atmosphériques restent sensiblement constantes.

Les liquides à étudier sont chauffés à 38,5°C, la quantité à injecter varie selon le produit.

L'injection se fait lentement dans la veine marginale de l'oreille.

La "température initiale" de chaque lapin est la moyenne des deux dernières

températures déterminées dans les 40 min précédant l'injection. La "température maximale" est la température la plus élevée pendant les 3 heures suivant l'injection.

La réponse de l'animal est la différence entre la température maximale et la température initiale.

L'essai est d'abord réalisé sur un groupe de 3 lapins. S'il est douteux on recommence sur un 2^{ème} groupe de 3 lapins, puis un 3^{ème} et 4^{ème} éventuellement. Les limites sont données dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Essai des pyrogènes : interprétation des résultats^[70]

Membre de lapin	La substance satisfait à l'essai si la somme des réponses n'excède pas :	La substance ne satisfait pas à l'essai si la somme des réponses est supérieure à :
3	1,15°C	2,65°C
6	2,80°C	4,30°C
9	4,45°C	5,95°C
12	6,60°C	6,60°C

3.3.10. Recherches des endotoxines bactériennes :^[72]

Les endotoxines bactériennes répondent à une définition plus précise que celles des pyrogènes. Ce sont des lipopolysaccharides de la paroi des bactéries Gram-.

L'essai des endotoxines bactériennes est connu sous le nom de «limulus test» ou l'essai LAL. Le réactif utilisé est un lysat d'amoebocytes d'un carpe en fer à cheval: le limule (*Limulus polyphemus*).

L'essai des endotoxines bactériennes est destiné à la détection ou la quantification des endotoxines produites par des bactéries Gram-, au moyen d'un lysat d'amoebocytes de limule. Il peut être réalisé par 3 techniques :

- **Gélification** : formation d'un gel en présence d'endotoxines.
- **Turbidimétrie** : développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène.
- **Colorimétrie** : développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique.

Six méthodes sont décrites dans la pharmacopée européenne :

Méthode A : Gélification : Essai limite.

Méthode B : Gélification : Essai semi-quantitatif.

Méthode C : Turbidimétrie cinétique.

Méthode D : Colorimétrie cinétique.

Méthode E : Colorimétrie en point final.

Méthode F : Turbidimétrie en point final.

L'essai est effectué par l'une des six méthodes décrites. En cas de doute, la décision finale est prise sur la base du résultat obtenu par la méthode A.

L'essai est effectué dans des conditions permettant d'éviter toute contamination par des endotoxines.

▮ Appareillage :

La verrerie et les éléments d'appareillage résistant à la chaleur sont dépyrogénés dans un four à air chaud, par une méthode validée. La durée et la température minimale de chauffage sont généralement de 30 min à 250°C. Le plus souvent on utilise du matériel à usage unique exempt d'endotoxines.

Si du matériel en plastique est utilisé (par ex : des plaques de microtitrage ou des pointes de pipette pour distributeurs automatiques), l'absence de contamination par des endotoxines et l'absence d'interférence de ce matériel dans l'essai doivent être établies.

Note : Dans le présent chapitre, le terme "tube" est employé pour désigner tout type de récipients, par exemple les puits de plaques de microtitrage.

▮ Préparation de la solution mère étalon d'endotoxine :

- Une solution mère étalon d'endotoxine est préparée à partir d'une préparation de référence d'endotoxine étalonnée par rapport à l'étalon international.
- La teneur en endotoxine est exprimée en U.I. La correspondance entre l' U.I et l'E.I est indiquée par l'OMS.

Note : Une U.I d'endotoxine équivaut à une unité d'endotoxine (U.E).

- Pour la préparation et la conservation de la solution mère d'étalon d'endotoxine, suivre les instructions figurant sur la notice et l'étiquette.

▮ Préparation d'une gamme étalon d'endotoxine :

- Après avoir énergiquement agité la solution mère d'étalon d'endotoxine, préparer des séries de dilutions appropriées avec de l'eau pour essai des endotoxines bactériennes (eau EEB). Les séries de dilutions doivent encadrer la sensibilité du lysat utilisé.
- Utiliser ces solutions dès que possible pour éviter une éventuelle perte d'activité par adsorption des endotoxines aux parois.

▮ Préparation des solutions à examiner :

- Préparer les solutions à examiner en dissolvant ou en diluant le produit à examiner avec de l'eau EEB.
- Pour la dissolution ou la dilution de certaines substances ou préparations, l'emploi d'autres solutions aqueuses peut être plus approprié.
- Si nécessaire ajuster le pH de la solution à examiner ou de la dilution utilisée, de telle sorte que le mélange de cette solution et de lysat ait un pH compris dans l'intervalle spécifié par le fabricant du lysat. Cet intervalle est généralement compris entre 6 et 8.

- Les tampons utilisés pour ajuster le pH doivent être exempts d'endotoxines détectables et de tous facteurs d'interférence.

▮ Détermination de la dilution maximale significative :

La Dilution Maximale Significative (DMS) est la dilution maximale d'un échantillon à laquelle la limite en endotoxine peut être déterminée. Elle est calculée à l'aide de l'expression :

$$\text{DMS} = \frac{\text{Limite en endotoxine} \times \text{Concentration de la solution à examiner}}{\lambda}$$

- Limite en endotoxine: La limite en endotoxine d'une substance administrée par voie parentérale définie sur une base posologique est égale à: K/M, avec :

K = Dose seuil d'endotoxine ayant un effet pyrogène par kilogramme de masse corporelle et par heure.

M = Dose maximale recommandée pour le produit, par kg de masse corporelle et par heure.

La limite en endotoxines du produit administré par voie parentérale est spécifiée en UI /ml; en UI/mg; ou en UI/Unité d'activité biologique, dans les monographies.

- Concentration de la solution à examiner :
 - En mg/ml si la limite en endotoxine est spécifiée par rapport de la masse (UI/mg).
 - En Unité/ml si la limite en endotoxine est spécifiée à l'unité d'activité biologique (UI/Unité).
 - En ml/ml si la limite en endotoxine est spécifiée au volume (UI/ml).
- λ : sensibilité déclarée du lysat (UI/ml). C'est la concentration la plus faible d' endotoxine que le lysat peut détecter.

→ **Technique de gélification :**

La technique de gélification permet la détection ou la quantification des endotoxines grâce à la propriété de gélification que possède le lysat en présence d'endotoxines.

Afin d'assurer la fidélité et la validité de l'essai, des contrôles préliminaires sont effectués au préalable comme la confirmation de la sensibilité déclarée du lysat et la vérification de l'absence de facteurs d'interférence dans le produit à contrôler.

*▮ **Contrôles préliminaires :***

➤ **Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat :**

- Avant d'entamer l'utilisation d'un lot de lysat, confirmer la sensibilité déclarée λ de la solution de lysat, exprimée en UI/ml. Ce contrôle est effectué chaque fois qu'un nouveau lot de lysat est utilisé ou quand des modifications susceptibles d'affecter le résultat de l'essai sont apportées aux conditions expérimentales.
- Préparer en 4 exemplaires une gamme étalon contenant au minimum 4 concentrations respectivement équivalentes à 2λ ; λ ; $0,5\lambda$ et $0,25\lambda$ en diluant la solution mère étalon d'endotoxine avec de l'eau EEB.
- Mélanger chacune des dilutions étalons avec un volume identique de la solution du lysat (ex: 0,1 ml).
- Si le lysat utilisé est lyophilisé en ampoules ou en flacons unitaires, ajouter directement le diluant dans le flacon ou l'ampoule.
- Incuber le mélange réactionnel pendant une durée donnée, selon les recommandations du fabricant de lysat (généralement à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 60 ± 2 min), en évitant toute vibration.
- Au terme de l'incubation faire sortir un à un chacun des tubes de l'incubateur et le retourner en le faisant pivoter d'un seul mouvement de 180° environ.

- S'il s'est formé un gel solide qui reste en place lors de l'inversion du tube, enregistrer le résultat comme (+). Dans le cas contraire, le résultat est (-).
- L'essai n'est valable que si au moins la dernière dilution de chaque série montre un résultat (-).
- Le point final est le dernier résultat (+) obtenu dans la série de dilution étalon examinée par ordre de concentrations décroissantes.
- La concentration endotoxine au point final est déterminée par la formule suivante : $\sum e / f$
- Calculer la moyenne des logarithmes des concentrations des points finaux à l'aide de l'expression :

Moyenne géométrique de la concentration au point final = antilog₁₀ $\sum e / f$

$\sum e$: Somme des concentrations au point final, en valeurs logarithmiques, obtenues dans les séries de dilution utilisées,

f : Nombre d'exemplaire.

La valeur ainsi obtenue est la sensibilité mesurée de la solution de lysat en UI/ml. Si cette valeur est comprise entre $0,5 \lambda$ et 2λ (bornes incluses), la sensibilité déclarée est confirmée et utilisée pour les essais réalisés avec ce même lysat.

➤ **Recherche de facteurs d'interférence :**

- Préparer les solutions A, B, C et D comme indiqué dans le tableau suivant. Pour la préparation des solutions A et B utiliser des solutions à examiner d'une dilution inférieure à la DMS, ne contenant pas d'endotoxines détectables. Opérer comme décrit dans (confirmation de la sensibilité déclarée).
- Déterminer la moyenne géométrique de la concentration au point final pour les solutions B et C.

- La recherche de facteurs d'interférence est effectuée sur chaque nouveau produit à contrôler.

Solution	Concentration en endotoxine / solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines	Diluant	Facteur de dilution	Concentration initiale en endotoxine	Nombre d'exemplaire
A	Néant/Solution à examiner	-	-	-	4
B	2 λ / Solution à examiner	solution à examiner	1	2 λ	4
			2	1 λ	4
			4	0,5 λ	4
			8	0,25 λ	4
C	2 λ / Eau EEB	Eau EEB	1	2 λ	2
			2	1 λ	2
			4	0,5 λ	2
			8	0,25 λ	2
D	Néant / Eau EEB	-	-	-	2

Solution A : Solution de la préparation à examiner ne contenant pas d'endotoxines détectables.
 Solution B : Contrôle d'interférence.
 Solution C : Témoin pour la sensibilité déclarée du lysat.
 Solution D : Témoin (-) (Eau EEB).

L'essai n'est valable que si aucune des solutions A et D ne donnent de réactions (+) et si le résultat obtenu avec la solution C confirme la sensibilité déclarée du lysat.

Si la sensibilité du lysat déterminée avec la solution B est comprise entre 0,5 λ et 2 λ (bornes incluses), la solution à examiner ne contient pas de facteurs d'interférence dans les conditions expérimentales utilisées. Dans le cas contraire, il y a interférence de la solution dans l'essai.

Si la préparation à examiner contient des facteurs d'interférences à une dilution inférieure à la DMS, répéter la recherche de ces facteurs à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS.

L'emploi d'un lysat plus sensible permet une dilution plus poussée de la préparation à examiner, et peut ainsi contribuer à l'élimination d'éventuelles interférences.

Les facteurs d'interférence peuvent être éliminés par un traitement approprié tel que la filtration, la neutralisation, la dialyse ou le chauffage.

Pour vérifier que le traitement choisi permet d'éliminer l'interférence constatée sans entraîner de déperdition en endotoxine, répéter la recherche de ces facteurs sur la préparation à examiner additionnée d'endotoxine et soumise au traitement choisi.

*▮ **Essai proprement dit :***

➤ **Mode opératoire :**

- Préparer les solutions A, B ,C et D comme indiqué dans le tableau ci-dessus et effectuer l'essai selon le mode opératoire décrit sous contrôle préliminaire, « Confirmation de la sensibilité déclarée du lysat ».
- Préparer la solution A et la solution B (Témoin + produit) en utilisant une dilution inférieure ou égale à la DMS.
- Les solutions B et C (témoins positifs) contiennent l'étalon d'endotoxine à une concentration équivalente à deux fois la sensibilité déclarée du lysat. La solution D (témoin négatif) est constituée d'eau EEB.

Solution	Concentration en endotoxine / Solution à laquelle sont ajoutées les endotoxines	Nombre d'exemplaire
A	Néant / Solution à examiner	2
B	2λ / Solution à examiner	2
C	2λ / Eau EEB	2
D	Néant / Eau EEB	2

- Procéder comme décrit sous «Recherche de facteurs d'interférence» pour l'addition du lysat et pour l'incubation.

➤ **Interprétation :**

- L'essai n'est valable que si les résultats des témoins positifs (solution B et C) sont positifs et si les deux résultats du témoin négatif (solution D) sont négatifs.
- La préparation à examiner satisfait à l'essai si les deux résultats obtenus avec la solution A sont négatifs.
- Lorsque les deux résultats obtenus avec la solution A sont positifs :
 - Si la préparation à examiner a été diluée à la DMS, elle ne satisfait pas à l'essai,
 - Si la dilution de la préparation à examiner est inférieure à la DMS, répéter l'essai à une dilution plus élevée mais ne dépassant pas la DMS.
- Si l'un des résultats obtenus avec la solution A est positif et l'autre est négatif répéter l'essai. La préparation à examiner satisfait à l'essai si les deux résultats obtenus avec la solution A lors de la répétition sont négatifs.

3.3.11. Essai de stérilité : [72]

L'essai de stérilité s'applique aux substances, préparations et produits qui, selon la pharmacopée, doivent être, stériles. C'est la seule méthode analytique pour vérifier cette stérilité. Mais un résultat favorable signifie seulement qu'aucun microorganisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné, dans les conditions de l'essai.

3.3.11.1. Précautions concernant la contamination microbienne :

L'essai de stérilité est réalisé dans des conditions aseptiques, par exemple sous hotte à flux laminaire de classe A situé dans une salle propre de classe B ou, dans un isolateur. Les précautions prises pour éviter une contamination microbienne ne doivent pas affecter les micro-organismes recherchés.

3.3.11.2. Milieu de culture :

- Milieu liquide au tioglycolate est principalement destiné à la recherche des bactéries anaérobies, mais il permet également la détection des bactéries aérobies.

- Milieu à 1 'hydrolysât de caséine et de soja est principalement destiné à la recherche des bactéries aérobies, mais il permet également la détection des levures et moisissures.

3.3.11.3. Essai proprement dit :

L'essai peut être réalisé soit par la technique de filtration sur membrane; soit par ensemencement direct du milieu nutritif avec le produit à examiner.

L'essai comprend dans tous les cas des témoins négatifs appropriés constitués de préparations dont la stérilité est établie.

La technique de filtration sur membrane est utilisée chaque fois que la nature du produit le permet (préparations aqueuses filtrables, préparations alcooliques ou huileuses, préparations solubles dans des solvants aqueux ou huileux ou miscibles à de tels solvants à condition que ceux-ci n'exercent pas d'effets antimicrobiens dans les conditions de l'essai).

❖ Filtration sur membrane :

- Utiliser des membranes d'une porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm, dont l'efficacité de rétention des microorganismes a été établie.
- Des membranes de nitrate de cellulose, par exemple, sont utilisées pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques, des membranes d'acétate de cellulose, par exemple, pour les solutions fortement alcooliques.
- L'appareil de filtration et la membrane sont stérilisés par des moyens appropriés. L'appareil doit permettre l'introduction et la filtration de la solution à examiner dans des conditions aseptiques; il doit également être compatible avec un transfert aseptique de la membrane dans le milieu de culture ou compatible avec une incubation directe dans l'appareil après addition du milieu de culture.
- Pour les préparations sous forme de solutions aqueuses, introduire dans l'appareil, menu d'une membrane, une quantité d'un diluant stérile approprié (par exemple une solution neutre de peptone de viande ou de caséine à 1 g/l, de pH 7,1 ± 0,2). Ensuite, filtrer.

- Transvaser dans un ou plusieurs appareils ainsi préparés, le contenu total du récipient à examiner.
- La quantité du produit à examiner utilisée dans l'essai de stérilité est, selon la pharmacopée, le contenu total du récipient pour les préparations à un volume < à 1 ml et la moitié du contenu du récipient pour un volume \geq 1 ml.
- Filtrer immédiatement puis transférer la membrane entière ou la moitié d'elles dans les milieux de culture.
- Incuber pendant au moins 14 jours, à 30-35°C pour l'essai principalement destiné à la recherche des bactéries et à 20-25°C pour l'essai principalement destiné à la recherche des levures et moisissures.
- Pour les produits conditionnés sous forme de poudres solubles, on utilise pour l'essai le contenu total des récipients contenant moins de 50 mg.
- Après dissolution dans un solvant approprié (par exemple une solution neutre de peptone de viande ou de caséine à 1 g/l), procéder comme décrit précédemment pour les solutions aqueuses.

❖ **Ensemencement direct du milieu de culture :**

- Ensemencer directement le milieu de culture avec la quantité de préparation adéquate, de façon que le volume du produit ne dépasse pas 10% du volume du milieu.
- Incuber les milieux ensemencés pendant 14 j au minimum, à 30-35°C pour les bactéries aérobies et anérobies, et à 20-25°C pour les levures et les moisissures.
- Examiner les cultures à plusieurs reprises au cours de la période incubation.

❖ **Observation et interprétation des résultats :**

- A plusieurs reprises au cours de l'incubation, puis en fin d'incubation, examiner les milieux pour détecter des signes macroscopiques de prolifération microbienne.

- Si le produit à examiner induit une turbidité du milieu rend difficile la détection visuelle d'une éventuelle croissance microbienne, 14 jours après la mise en incubation, transférer des volumes appropriés du milieu dans de nouveaux récipients contenant le même milieu, récemment préparé.
- Poursuivre l'incubation du milieu initial et des milieux transférés jusqu'à un temps d'incubation total de 14 + 7 jours au moins à compter de l'ensemencement initial.
- S'il n'est pas observé de signes de croissance microbienne, le produit à examiner satisfait à l'essai.
- Si une croissance microbienne est observée, le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai à moins qu'il ne puisse être clairement démontré que l'essai est non valable pour des raisons indépendantes du produit.

L'essai ne peut être déclaré non valable que si l'une, au moins, des conditions suivantes est réalisée :

- Les résultats des contrôles microbiologiques des équipements servant aux essais de stérilité font apparaître une anomalie;
- L'examen de la procédure expérimentale utilisée pour effectuer l'essai en question fait apparaître une anomalie;
- Une croissance microbienne est observée pour les témoins négatifs;
- Après identification des microorganismes isolés au terme de l'essai, il apparaît que la croissance de cette (ces) espèce (s) est sans aucun doute possible imputable au matériel ou à la technique utilisée, pour la réalisation de l'essai de stérilité.

Si l'essai est déclaré non valable, il est répété sur le même nombre d'unités que l'essai initial.

S'il n'est pas observé de signes de croissance microbienne lors de la répétition de l'essai, le produit à examiner satisfait à l'essai. Si une croissance microbienne est observée lors de la répétition de l'essai, le produit à examiner ne satisfait pas à l'essai.

Les vaccins ont changé le cours de l'histoire et du développement humain, et ils continuent de le faire. Les nouveaux vaccins et les nouvelles technologies de vaccination, ajoutés aux vaccins utilisés avec succès depuis de longues années, ont déclenché une véritable révolution de santé publique. Les découvertes récentes permettent d'entretenir de grands espoirs.

Depuis un siècle, l'espérance de vie humaine a considérablement augmentée, en partie grâce aux vaccinations contre les maladies infectieuses. Pourtant, au moins 17 millions d'individus en meurent encore chaque année, la moitié étant des enfants. Ces maladies restent la première cause de mortalité chez l'homme. Résoudre ce problème constitue tout l'enjeu de la vaccinologie. Cette dernière est la science des vaccins avec une démarche transversale et réaliste. Elle concerne donc le laboratoire de recherche (divers domaines de la biologie, l'informatique), l'industrie pharmaceutique (production, contrôle et coût), mais aussi la politique (volontés nationales et internationales) et le droit (législatif et exécutif).

La vaccination reste le moyen le plus facile et le plus rentable de s'assurer que le droit à la survie et à la santé de tous les enfants est respecté.

La vaccination est l'une des mesures sanitaires pouvant contribuer le plus au développement économique et à la dépaupérisation. Associée à d'autres mesures sanitaires peu onéreuses, la vaccination peut contribuer à rompre ce cercle vicieux de malnutrition, du mauvais état de santé, etc.... En prévenant l'apparition des maladies infectieuses – qui sont le principal facteur des écarts d'espérance de vie entre les riches et les pauvres – et en allongeant l'espérance de vie, la vaccination peut aider à réduire les inégalités en matière de santé.

Les vaccins se distinguent des autres médicaments par le fait qu'ils sont obtenus à partir d'organismes vivants et qu'ils possèdent fréquemment une structure moléculaire complexe. Ils posent donc des problèmes de qualité particuliers en raison

de la nature biologique des matériels de départ, du procédé de fabrication, des épreuves nécessaires pour les caractériser.

Assurer la qualité, l'innocuité et l'efficacité d'un vaccin est en priorité de la responsabilité du fabricant, mais c'est à l'autorité nationale de contrôle, qu'il incombe d'établir les procédures destinées à garantir que les produits sont conformes aux normes établies. L'autorité nationale de contrôle procède, de manière indépendante, à une expertise technique du lot de vaccin et à l'examen.

des pièces technico-réglementaires approuvées dans le dossier d'AMM. Ainsi, il est procédé de manière systématique à l'examen du protocole analytique décrit dans le dossier d'AMM, ainsi qu'à l'étude des éléments du dossier de chaque lot de vaccin transmis par l'importateur ou le fabricant. Il s'agit de s'assurer de l'adéquation entre les deux documents, de la validation des méthodes de contrôles (analytique, biologique, microbiologique) et de la présence de procédures suffisamment détaillées pour être reproduites.

Vu que la totalité des vaccins sont importés, notre pays a mis en place une unité de contrôle des vaccins et sérums au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments. Unité qui permet d'effectuer des essais et dosages sur des échantillons des vaccins sous leur forme finale afin de s'assurer de leur qualité qui pourrait être affectée par toute interruption de la chaîne du froid au cours de l'importation.

Les contrôles de qualité effectués par le LNCM concernent essentiellement la vérification de l'identité, l'évaluation de l'activité du principe actif ainsi que la sécurité microbiologique du produit. Ces contrôles sont réalisés en respectant les normes de la qualité, qu'il s'agisse des normes de qualité spécifiques des activités de l'unité (procédures et instructions opératoires, formulaires, rapports, protocoles analytiques et d'enregistrement qui attestent de l'exécution des activités et mémorisent les résultats

obtenus)ou normes scientifiques (Pharmacopée européenne, United States Pharmacopoeia (USP), British Pharmacopoeia (BP)...), afin d'apporter la preuve de la qualité de ses prestations donc de la validité et de la fiabilité de ses résultats d'analyse pour être crédible au niveau international.

En conclusion, les progrès de la vaccinologie ont été extrêmement rapides ces dernières années et le potentiel des vaccins pour l'amélioration des soins de santé à l'échelle mondiale est immense. Parallèlement aux progrès technologiques et à la mondialisation des programmes et des échanges, la mise au point de procédés capables de garantir la qualité des vaccins et des produits biologiques en général a été entreprise.

ANNEXE I^[41]SIX ETAPES POUR FABRIQUER FACILEMENT UN VACCIN COMESTIBLE

- ❑ Choisir un gène qui a déjà été cloné et qui code pour un antigène connu pour induire une immunité protectrice lorsqu'il est administré par voie orale.
- ❑ Introduire le gène dans le plasmide d'une bactérie telle qu'*Escherichia coli*.
- ❑ Introduire le plasmide d'*E.coli* dans une bactérie naturelle trouvée dans la terre, *Agrobacterium tumefaciens*, qui produit couramment des tumeurs végétales.
- ❑ Choisir une plante, comme un bananier, dont la plupart des enfants aiment le fruit. L'infecter avec *A.tumefaciens* et croiser les doigts dans l'espoir que dans les jours ou les semaines qui suivent cette bactérie introduira son propre ADN plasmidique avec l'ADN de votre antigène dans le germe de la plante.
- ❑ Prendre les pousses des plantes transfectées les plus vigoureuses qui produisent une quantité maximum de l'antigène désiré et les planter près des lieux de l'utilisation du vaccin.
- ❑ Récolter vos légumes ou fruits transgéniques et les préparer – en purée, séchés, en poudre, etc – en vue de leur consommation.

ANNEXE II [52]

**PROTOCOLE RECAPITULATIF POUR LA PRODUCTION
ET LE CONTROLE DU VACCIN ANTIROUGEOLEUX VIVANT¹**

La section concernant le produit final devra être accompagnée d'un modèle de l'étiquette, d'un exemplaire de la notice jointe au récipient du vaccin, et d'un certificat délivré par l'autorité nationale de contrôle du pays de fabrication du vaccin, attestant que le produit répond aux normes nationales et aux normes publiées par l'OMS.

MATIERES PREMIERES (A.4.1)

Souche de virus rougeoleux (A.4.1.1) _____

Cultures cellulaires (A.4.1.2)

Donner tous renseignements sur la source et la méthode de préparation des cultures cellulaires.

Cultures cellulaires d'embryons d'oiseaux (A.4.1.3)

Donner tous renseignements sur l'origine de l'élevage en colonie fermée, exempt d'agents pathogènes spécifiques.

Types d'épreuves de recherche

des infections _____ Résultats _____

Certifié satisfaisant Date _____

Signature du chef du laboratoire _____

¹ D'après les normes relatives aux vaccins antirougeoleux, antiourlien et antirubéolique et au vaccin associé (vivants) (Normes N°47 pour les substances biologiques). In: Comité OMS d'experts de la standardisation biologique. Quarante-troisième rapport. Genève, Organisation mondiale de la santé, 1994, Annexe 3 (OMS, série de rapport technique, N°840).

Cellules diploïdes humaines (A.4.1.4)

Donner tous renseignements sur la source de la banque de cellules de travail du fabricant (BCTF).

Autres cellules (A.1.5) _____

Sérums utilisé dans le lieu de culture cellulaire (A.4.1.6)

Epreuves de stérilité

	Bactéries	Champignons	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____	_____
Résultats	_____	_____	_____

Epreuves de recherche des agents contaminants

Méthodes	_____
Date de l'inoculation	_____
Résultats	_____

Trypsine utilisée pour la préparation des cultures cellulaires (A.4.1.7)

Epreuves de stérilité

	Bactéries	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____
Résultats	_____	_____

Epreuves de recherche des agents contaminants (y compris les parovirus porcins)

Méthodes	_____
Date de l'inoculation	_____
Résultats	_____

PRODUCTION DU LOT DE SEMENCE DE TRAVAIL (A.4.2)

Renseignement sommaires

Nom et adresse du fabricant _____

Souche de virus _____

N° de référence du lot de virus de semence utilisé pour préparer le vaccin antirougeoleux original, immunogène et sans danger pour l’homme _____

N° de référence du lot-mère de semence _____

Nombre de passage entre les deux virus de semence ci-dessus _____

Lot de semence de travail

Date de la préparation _____

Nombre de récipients préparés _____

N° de référence _____

Conditions de stockage _____

Historique de la souche de vaccin

Exposer brièvement comment vous avez obtenu la souche de vaccin, donner son historique jusqu’à la production du lot-mère de semence, et spécifier les critères d’acceptabilité pour la production du virus.

Certification du lot de semence de travail

Nom (dactylographié) et signature du chef du laboratoire de production _____

Certificat émis par le chef du laboratoire de contrôle du fabricant assumant la responsabilité globale de la production et du contrôle du lot de semence de travail :

Je, soussigné, certifie que le lot de semence de travail de virus vaccin rougeoleux N° — satisfait aux dispositions de la partie A, sections 2 à 4.4.5, des nombres relatives au vaccin antirougeoleux vivant dans les normes N° 47 pour les substances biologiques (normes relatives aux vaccins antirougeoleux, antiourlien et antirubéolique et au vaccin associé (vivant)).

Signature _____

Nom (dactylographié) _____

Date _____

CULTURES CELLULAIRES TEMOINS (A.4.3)

Donner tout renseignement concernant les cultures cellulaires témoins correspondant à chaque récolte unique ; utiliser des feuilles supplémentaires si nécessaire.

Substrat cellulaire utilisé pour la production
du virus _____

N° de référence des cultures cellulaires
témoins _____

Proportion des cultures cellulaires
utilisées comme cultures témoins _____

Durée d’observation des cellules
témoins _____

Epreuves de recherche des virus hémadsorbants (A.4.3.1)

Type d’érythrocytes _____

Dates de l’épreuve _____

Résultats _____

Epreuves de recherche d'agents contaminants non-hémadsorbants

(A.4.3.2)

Substrat cellulaire utilisé pour la propagation du virus

Types de cellules _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Cellules simiennes

Types de cellules _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Cellules humaines

Types de cellules _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Epreuves supplémentaires en cas d'utilisation de culture de cellules

de poulet pour la production (A.4.3.3)

- *Epreuve de recherche des adénovirus aviaires*

Méthode _____

Date _____

Résultats _____

- *Epreuve de recherche des virus de leucose aviaire*

Méthode _____

Date _____

Résultats _____

Epreuves supplémentaires en cas d'utilisation de cellules diploïdes humaines pour la production (A.4.3.4)

▪ *Epreuve d'identité*

Méthode _____
 Date _____
 Résultats _____

PRODUCTION ET RECOLTE DU VIRUS VACCIN (A.4.4)

Cellules utilisées pour la production du vaccin (A.4.4.1)

Observation des cultures cellulaires avant l'inoculation

Méthodes _____
 Résultats _____
 Antibiotiques ajoutés _____

(le cas échéant) _____
 Concentration _____

Récoltes uniques (A.4.4.2)

Indiquer séparément les résultats des épreuves pour chaque récolte unique ; utiliser des feuilles supplémentaires si nécessaire.

Nombre de passages depuis le lot-mère de semence _____

N° de référence de la récolte unique _____

Epreuves de stérilité

	Bactéries	Champignons	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____	_____
Résultats	_____	_____	_____

Titrage du virus

Cellules utilisées pour le titrage _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Mélange de virus (A.4.4.3)

N° de référence du mélange de virus _____

Préciser les épreuves qui ont dû être refaites ou dont les résultats ont présenté une anomalie.

Epreuves de neurovirulence¹ (A.4.2.1) _____

Nombre de singes soumis à l'épreuve _____

Espèce _____

Volume injecté _____

Nombre de singes survivants sans
symptômes spécifiques _____

Résultats des épreuves sérologiques _____

**Résultats de l'examen
histopathologique (préciser vos
constatations)** _____

Epreuve de stérilité

	Bactéries	Champignons	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____	_____
Résultats	_____	_____	_____

Titrage du virus

Cellules utilisées pour le titrage _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Epreuves en cultures cellulaires du mélange de virus neutralisé

Espèce sur laquelle le sérum
neutralisant a été préparé, et substrat
cellulaire sur lequel le matériel
immunogène a été produit _____

Cellules utilisées pour la propagation du virus

Type de cellules _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Cellules simiennes

Type de cellules _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

Cellules humaines

Type de cellules _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

***Epreuves supplémentaires en cas d'utilisation de cultures de cellules
de poulet pour la production***

- Epreuve en œufs embryonnés inoculés par voie allantoïdienne

Nombre et âge des œufs inoculés _____

Date _____

Résultats _____

- Epreuve en œufs embryonnés inoculés dans le sac vitellin

Nombre et âge des œufs inoculés _____

Date _____

Résultats _____

Clarification du mélange de virus (A.4.4.4)

Date de la clarification résultats _____

Résultats de la clarification _____

Titrage du virus

Cellules utilisées pour le titrage _____

Date de l'inoculation _____

Résultats _____

- Epreuves de stérilité

	Bactéries	Champignons	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____	_____
Résultats	_____	_____	_____

Produit final en vrac (A.4.4.5)

N° de référence du produit final en vrac _____

Volume total du produit final en vrac _____

Additifs (diluant, stabilisant)

et concentration finale _____

Protéines sériques résiduelles d'origine animale

Date _____

Méthode _____

Résultats (indiquer la nature des protéines sériques présentes et leur quantité par dose destinée à l'homme) _____

▪ Epreuves de stérilité

	Bactéries	Champignons	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____	_____
Résultats	_____	_____	_____

REPARTITION ET RECIPIENTS (A.5)

Nom et adresse du fabricant	_____
Nom commercial du vaccin	_____
N° de référence du lot final	_____
Date limite d'utilisation	_____
Nombre de récipients contenus dans le lot	_____
Nombre de doses par récipient	_____
N° de lot du produit final en vrac	_____
Date de la répartition dans les récipients définitifs	_____

EPREUVES DE CONTROLE DU PRODUIT FINAL (A.6)

Epreuve d'identité (A.6.1)

Date	_____
Méthode	_____
Résultats	_____

Epreuves de stérilité (A.6.2)

	Bactéries	Champignons	Mycoplasmes
Date de l'inoculation	_____	_____	_____
Résultats	_____	_____	_____

Teneur en virus et thermostabilité (A.6.3)

Date de l'inoculation _____

Type de culture cellulaire _____

Echantillons témoins (non chauffés)	Echantillons incubés à 37°C pendant 7 jours
1 2 3	1 2 3

Quantité de virus dans chaque
récipient (en UFP ou DICC50) — — — — — — —

Titre viral moyen par dose destinée
à l'homme, et limites de confiance à 95% _____

Perte moyenne de titre après
exposition à la chaleur (en unité log10) _____

Préparation de référence

Identification _____

Titre théorique _____

Titre réel _____

Epreuves générales d'innocuité (A.6.4)

Epreuve sur la souris

Date de l'inoculation _____

Nombre de souris inoculés _____

Volume et voie d'inoculation _____

Période d'observation _____

Résultats (fournir tout
renseignement en cas de mort des animaux) _____

Epreuve sur le cobaye

Date de l'inoculation _____

Nombre de cobayes inoculés _____

Volume et voie d'inoculation _____

Période d'observation _____

Résultats (donner tout
renseignement en cas de mort des animaux) _____

Humidité résiduelle (A.6.5)

Date _____

Méthode _____

Taille de l'échantillon _____

Teneur en eau (%) _____

Inspection des récipients définitifs (A.6.6)

Date et résultat _____

Demande présentée à l'autorité nationale de contrôle pour la mise en circulation des lots

Nom (dactylographié) et signature
du chef du laboratoire de production _____

Date _____

Certificat émis par la personne assumant la responsabilité globale de la production et du contrôle du vaccin :

Je soussigné, certifie que le lot de vaccin antirougeoleux vivant N° satisfait aux normes nationales et/ou aux dispositions de la partie A des normes relatives au vaccin antirougeoleux dans les normes N° 47 pour les substances biologiques (normes relatives aux vaccins antirougeoleux, antiourlien, antirubéolique et au vaccin associé (vivant)).

Signature _____

Nom (dactylographié) _____

Date _____

ANNEXE III

CIRCULAIRE MINISTERIELLE (Source LNCM)

ROYAUME DU MAROC
 Ministère de la Santé
 Direction du Médicament
 et de la Pharmacie



الجمهورية المغربية
 وزارة الصحة
 المديرية العامة للصحة
 والأدوية والصيدلة

CIRCULAIRE N° 147...../DMP/00 DU 24 AOUT 1999,

*AUX PHARMACIENS RESPONSABLES
 DES ETABLISSEMENTS PHARMACEUTIQUES*

Objet : Certificat de libération des lots des vaccins et sérums mis sur le marché national.

Dans le cadre du renforcement du contrôle des médicaments et dans la perspective de l'implantation d'une cellule de contrôle des vaccins et sérums au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, et dans le but de renforcer la sécurité de ces produits, j'ai l'honneur de porter à votre connaissance qu'une nouvelle procédure a été instaurée, concernant la libération de chaque lot de vaccins et sérum préalablement à sa mise sur le marché national.

Pour ce faire, et en vue de l'obtention d'un certificat de libération de lot, les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de déposer au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments avant toute commercialisation d'un lot de ces médicaments les pièces suivantes :

- Une demande de libération de lot, adressée à Monsieur le Directeur du Médicament et de la Pharmacie.
- Un protocole de contrôle (suivi de la fabrication et du contrôle du lot).
- Un certificat de libération de lot du pays d'origine dûment signé par l'autorité de contrôle ou éventuellement le certificat de libération européen.
- Des échantillons pour le contrôle.
- Un exemplaire des objets de conditionnement imprimés si les échantillons sont présentés sans conditionnement secondaire.

Le certificat délivré attestera de la conformité du lot par rapport à l'un des référentiels en vigueur suivants :

- Le dossier d'AMM.
- Les recommandations de l'OMS.
- La pharmacopée européenne.
- Les Bonnes Pratiques de Fabrication.

J'attache du prix à l'application de cette circulaire qui prendra effet à partir du 1^{er} janvier 2000.

Le Ministre de la Santé

Signé : Dr. Abdelouahed EL FASSI

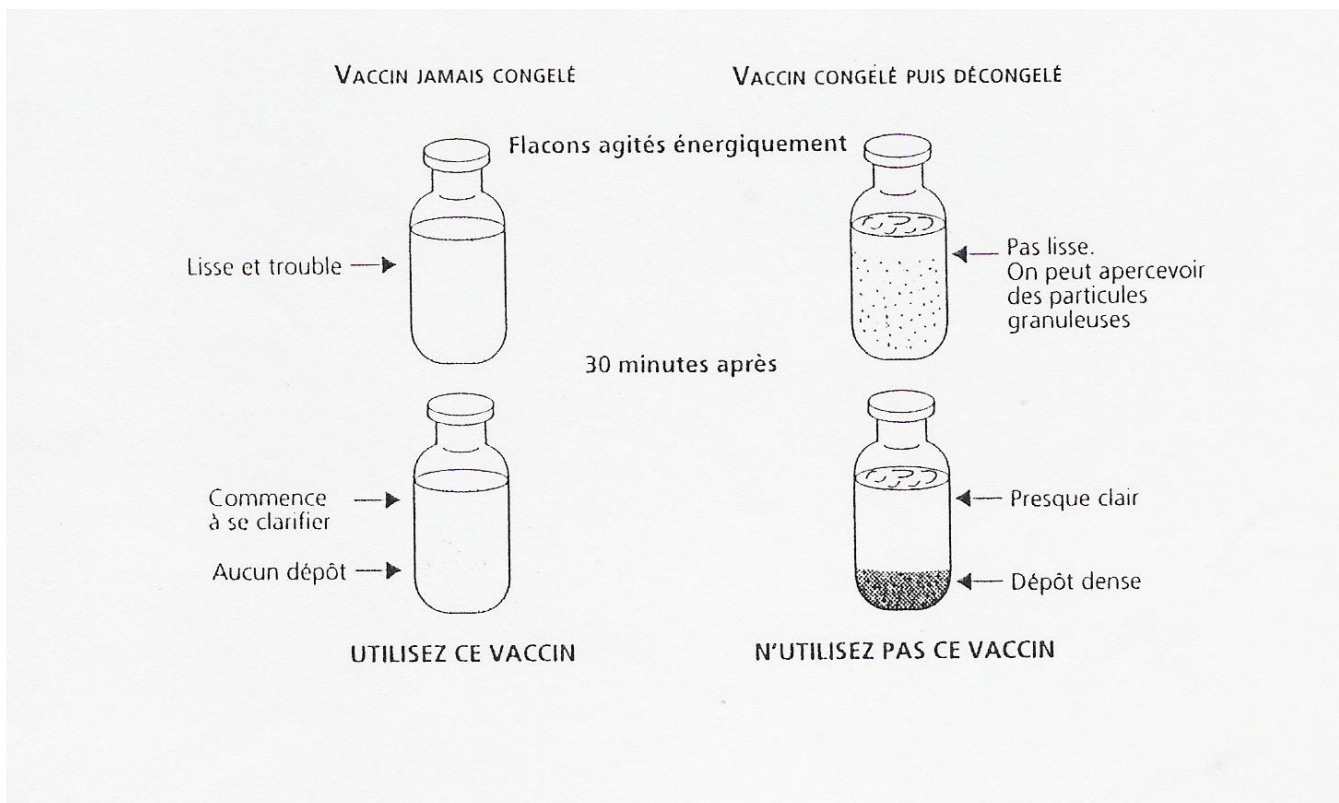
ANNEXE IV [44]

TEST DE FLOCCULATION

Méthode de vérifier que le vaccin surtout DTC n'a pas été altéré par la congélation (voir ci-dessous).

- ❑ Si c'est possible, comparer le vaccin «congelé puis décongelé» avec un vaccin de même fabricant qui n'a jamais été congelé.
- ❑ Agiter énergiquement les flacons de vaccin.
- ❑ Examiner le contenu avec soin.
- ❑ Laisser les vaccins reposer pendant 15 à 30 minutes afin que le dépôt puisse se former.

Moyen de vérifier si le vaccin DTC est utilisable



[1] AFNOR.

NF EN ISO 17025, Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'essais et d'étalonnage, Paris, mai 2000.

[2] ANDRE. M.

La qualité et la sécurité des vaccins: apport des méthodes génétiques et immunoenzymatiques.

Thèse de doctorat en science de la vie et de la santé, 2000, N° 25.00.15.

[3] APPIT.

Vaccinations. in E. PILLY Maladies infectieuses, édition 1997, pp 558-64.

[4] ARNTZEN. C.

Que peut-on espérer des vaccins végétaux.

CVI FORUM, Initiative pour les vaccins de l'enfance (IVE).

Août 1996, N° 12, p : 10-13.

[5] ASSOCIATION DES PROFESSEURS DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE ET TROPICALE.

Vaccinations : bases immunologiques, indications, efficacité, complications, 2003 disponible sur ce site : <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/>.

[6] BARBAID. A, SCHMITZ. JL, MOUGEOLLE. JM.

Réactions immunoallergiques cutanées dues aux vaccins.

Ann dermatol venerol, 1995, 122, p : 129-138.

[7] BENKIRANE. R.

Les manifestations post-vaccinales indésirables.

Espérance médicale, fév. 1999, Tome 6, 47, p : 86-88.

[8] BOUCHET. H.

La prophylaxie vaccinale au XIX siècle.

La revue du praticien, 2000, 50, p : 590-592.

[9] CEFIRA.

[10] CHAMPAGNE. P, PANTALEO. G.

La vaccination cellulaire.

Med/Hyg, 2000, 58, p : 989-991.

[11] CHINO. F.

Quality Assurance of Vaccines.

Vaccine Handbook. First edition, 1996. Edited by: Researcher's Associates.

The National Institute of Health. MARUZEN, TOKYO. P: 15-21.

[12] CLEMENT. R.

Immunité et vaccins : réalités d'aujourd'hui et perspectives de demain.

Porphyre, Octobre 1996, 25, p : 36-42.

[13] CLOT. J.

Immunité anti-infectieuse : mécanismes, facteurs spécifiques et non-spécifiques.

[14] COMITE TECHNIQUE DES VACCINATIONS.

Guide des vaccinations. Deuxième Edition 1999. Direction Générale de la Santé. Assurance Maladie et Comité Française d'Education pour la santé. Paris. 194 p.

[15] Contrôles des différents vaccins disponible sur ce site :

disc.vjf.inserm.fr : 2010/basis/elgis/fqmr/rapp/ddd/395.pdf le : 28/12/04.

[16] DEGORS. F.

Vaccins sous –unités protéiques : exemple de la vaccination conter le virus de l'hépatite B.

La revue du praticien, 1995, 45, p : 1488 – 1491.

[17] DELLEPIANE. N, GRIRRITHS. E, MILSTEIN. J.B.

Nouveaux problèmes posés par l'assurance de la qualité des vaccins.

[18] DESSON. JF, LEPREVOS. TM, et al.

péricardite aiguë bénigne après vaccination antigrippal.

La presse médicale, 1997, 26, p : 415.

[19] DOROZ.

*Guide pratique des médicaments, Edition : Maloine, 2001, p : 1499, 1500,
1502, 1520.*

[20] DRUCKER. J.

Les vaccins inactivés : caractéristiques et principes d'utilisation.

La revue du praticien, 1995, 45, p : 1497-1499.

[21] EICHER. W AND AL.

*Paralysis of the recurrent laryngeal nerve following a booster injection of
tetanus toxoid.*

Munch Meti Wochenstr, vol. 111, N° 34, p. 1692, 12/1992.

[22] ELOIT. M.

Vaccins traditionnels et vaccins recombinants.

INRA Prod. Aruim., 1998, 11 (1), 5-13.

[23] ELSA. I.

*L'assurance de la qualité dans un laboratoire officiel de contrôle des
médicaments.*

Thèse de doctorat en pharmacie, 1999.

[24] GALAZKA. A, MILSTIEN. J, ZAFFRAN. M.

Thermostabilité des vaccins.

Programme mondial des vaccins et vaccinations, OMS, Genève, 1998.

[25] GUERIN. N, AJJAN. N.

Vaccinations.

[26] Guide de vaccination 2003 disponible sur ce site :

<http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/vaccins2003/index.htm> Le : 10/10/04.

[27] GUINEBAULT. A.

Technique de conservation et de stérilisation.

L'enfant en milieu tropical, 1988, 162/163, p : 53-69.

[28] HANOUN. C.

La vaccination, PUF, 1999.

[29] HEINIS CONSULTANTS.

Le management de la qualité et l'assurance qualité dans un laboratoire, Paris, septembre, 2002, 68 p.

[30] HOWSON AND AL.

Adverse effects of pertussis and rubella vaccines.

Washington D. C. National Academy Press, 1997.

[31] HUCHON. G.

Tuberculoses et mycobacterioses non tuberculeuses.

Encycl. Méd. Chir. Maladies infectieuses, 8-038-C-10, 1997, p :2, 17.

[32] JENNER. E.

The Origin of the Vaccine Inoculation, DN Shury, London, 1801, p.2.

[33] KETANI. N.

Sérums et vaccins.

MEDIKA, le guide des médicaments au Maroc, Edition : Horizons internationales, 2001, p : 1557-1597 ; 1857.

[34] KONOBE. T.

Production of vaccine.

Vaccine Handbook, FIRST edition, 1996. Edited by: Researcher's Associates.

The National Institute of Health, MARUZEN, TOKYO, p: 11-14.

[35] LAGRANGE. P.

Vaccinations.

La revue du praticien, 2000, 50, p : 2275-2283.

[36] LAKHLILI. W.

Contrôle de qualité des vaccin.

Thèse de doctorat en pharmacie, 2002, N° 110.

[37] LAMDOUAR. BOUAZZAOUI. N.

De la pédiatrie, Edition : Nouvelles Rabat, 1983, p : 193-227.

[38] LAROUSSE MEDICAL.

Edition Larousse, 1995.

[39] LE HIR. A.

Abrégés : Pharmacie galénique ; bonnes pratiques de fabrication des médicaments.

Editions : Masson, 7^{ème} édition, 1997.

[40] MAURICE. J.

Associations vaccinales – des choix en pagaille.

CVI FORUM, (publication de IVE : l'initiative pour les vaccins de l'enfance),

Juillet 1998, N°16, p : 2-9.

[41] MAURICE. J.

Une pléthore de vaccins haute technologie génétiques, comestible, en sucre vitreux et autres.

CVI FORUM, Initiative pour les vaccins de l'enfance (IVE) : Juillet 1999, N°

18, p : 5-23.

[42] Médicament au Maroc disponible sur ce cite :

<http://www.ifrance.com/maropharma/MEDICAMENT.htm> Le : 22/11/04.

[43] MINISTERE DE LA SANTE.

La vaccination au Maroc : principes généraux.

Programme National d'Immunisation, 1998.

[44] MINISTERE DE LA SANTE.

Le guide National de Vaccination.

Programme National d'Immunisation, 1998.

[45] OMS.

Contrôle de la chaîne du froid.

Relev. Epid. Hebd, 1984, 59, 21, p : 157-160.

[46] OMS.

Normes relatives aux vaccins antihépatite B produits par des techniques de génie génétique. Annexe 2,

Série de rapports techniques, 1989, N°786.

[47] OMS.

Normes relatives aux vaccin antipoliomyélitique buccal. Annexe 7.

Série de rapports techniques, 1990, N°300.

[48] OMS.

Evaluation de la chaîne du froid.

Relev epid hebd, 1990, 65, 24, p : 181-188.

[49] OMS.

Directives relatives à l'assurance de la qualité des produits pharmaceutiques et biologiques obtenus par génie génétique. Annexe 3.

Série de rapports techniques, 1991, N° 814.

[50] OMS.

Bonnes pratiques de fabrication des produits biologiques. Annexe 1.

Série de rapports techniques, 1992, N° 822.

[51] OMS.

Directives à l'intention des autorités nationales sur l'assurance de la qualité des produits biologiques. Annexe 2,

Série de rapports techniques, 1992, N° 822.

[52] OMS.

Normes relatives aux vaccins antirougeoleux, antiourlien et antirubéolique au vaccin associé (vivants). Annexe 3,

Série de rapports techniques, 1994, N° 840.

[53] OMS.

Qualité des vaccins : Il ne peut y avoir de programme de qualité sans vaccin de qualité. Programme mondial des vaccins et vaccinations et initiative pour les vaccins de l'enfance, Mise à jour : octobre, 1995.

[54] OMS.

Réglementations et homologation des produits biologiques dans les pays se dotant d'autorités de réglementation. Annexe 1.

Série de rapports techniques, 1995, N° 858.

[55] OMS.

Bonnes pratiques de fabrication: Lignes directrices concernant la validation des procédés de fabrication. Annexe 6, Série de rapports techniques, 1996, N°863.

[56] OMS.

Déclaration de politique générale. Déclaration sur la qualité des vaccins. Programme mondial des vaccins et vaccinations, OMS, Genève, 1996.

[57] OMS.

Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunizations. Global programme for vaccines and immunization Vaccine Supply and Quality (VSQ). WHO. Geneva, 1997.

[58] OMS.

Procédures pour évaluer l'acceptabilité de principe des vaccins achetés par les institutions des Nation Unies. Programme mondial des vaccins et vaccination. Fourniture et assurance de la qualité des vaccins, OMS, Genève, 1997.

[59] OMS.

Assurance de la qualité des produits pharmaceutiques. Recueil de directives et autres documents : volume 1, Genève, OMS, 1998.

[60] OMS.

Déclaration politique générale. Assurer la qualité des vaccins produits localement et la viabilité de la production locale. Programme mondial des vaccins et vaccinations, OMS, Genève, 1998.

[61] OMS.

Guide pour l'élaboration d'un manuel des systèmes qualité pour laboratoire de contrôle.

Département des vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, 1998.

[62] OMS.

Guide pour l'inspection des fabricants de produits biologiques.

Programme mondial des vaccins et vaccinations, OMS, Genève, 1999.

[63] OMS.

Réglementation des vaccins : S'appuyer sur les autorités de réglementation pharmaceutique existantes.

Département des vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, 1999.

[64] OMS.

Mode d'emploi des pastilles du vaccin: Facilité de gestion du vaccin pour les vaccinations supplémentaires de la polio.

Département vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, 2000.

[65] OMS.

Manuel de formation : enregistrement, libération des lots, accès aux laboratoires.

Département vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, 2001.

[66] OMS.

Vaccins et produits biologiques.

Relevé épidémiologique hebdomadaire, sep 2002, N° 37, p : 305-311.

[67] OMS.

Chaîne de froid..

Département des vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, nov. 2002.

[68] OMS.

Le point sur les vaccins et la vaccination dans le monde.

Département des vaccins et produits biologiques, OMS, Genève, 2003, 85 p.

[69] ORGANISATION DU MINISTERE DE LA SANTE.

Décret n°2-94-985 du 17 Joumada II 1415 (21 novembre 1994) relatif aux attributions et à l'organisation du Ministère de la santé.

[70] PHARMACOPEE EUROPEENNE.

3^{ème} Edition, 1997.

- *Monographies N°: 0163,0215, 0445.*

- *Chapitre : (2.4.18), (2.5.12), (2.5.13), (2.6.8), (2.6.9), (2.7.6), (2.7.7), (2.7.8).*

[71] PHARMACOPEE EUROPEENNE.

3^{ème} Edition, Addendum 1998.

- *Chapitre: (2.7.1).*

[72] PHARMACOPEE EUROPEENNE.

3^{ème} Edition, Addendum 2000.

- *Monographies N°: A1645, 1056, 0213.*

- *Chapitre: (2.6.1), (2.6.14), (2.7.1), (2.7.15).*

[73] REINERT. Ph.

Vaccins sous-unités polysaccharidiques.

La revue du praticien, 1995, 45, p : 1484-1487.

[74] REY. M.

Abrèges : vaccination.

Editions : Masson, 1980.

[75] REY. M.

Du bon usage de vaccination.

La revue du praticien, 1986, 34, 31, p : 1641- 54.

[76] REY. M.

Calendrier des vaccinations.

Encycl. Méd. Chir. Thérapeutique, 25014 D¹⁰, 10, 1987, p : 1-3.

[77] ROLLAND. L, CRUZ CUBAS. A, SALMON-CERON. D.

Vaccins et vaccination.

Edition Paris : Ellipses, 2002, p : 128.

[78] ROUSSEY. M.

Vaccinations, mars 2000 disponible sur ce site : <http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pediatrie/vaccinations.htm>.

[79] RUF. V.

Vaccins : nouvelles perspectives.

Thèse de doctorat en pharmacie, 1987.

[80] RUTLEDGEL AND COL.

Neurologic complications of immunizations, J.Pediatr., vol. 109, (1986) p.917.

[81] SALIOU. P.

Les vaccins vivants.

La revue du praticien, 1995, N°45, p : 1492-1496.

[82] SCHOLTZ. M, DUCLOS. P.

La sécurité vaccinale : une priorité mondiale. Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Recueil d'article 2000, N°3, p : 53-54.

[83] SEDIM 1999.

Dictionnaire des spécialités pharmaceutiques au Maroc.

[84] TRON. F.

Les vaccins du futur.

La revue du praticien, 1995-45, p : 1514-1518.

[85] URS B. SCHAAD.

GENES ET DIALOGUES « Vacins et génie génétique ».

Gen Suisse, juillet 2004.

[86] Vaccination disponible sur ce site :

<http://www.who.int/vaccines/index.shtml>

Le : 06/09/04.

[87] VERCKEN. JB.

Vaccins et vaccination.

Revue de l'infirmière, oct. 1999, 53, p : 19-20, 22-23, 25, 32.

[88] VIDAL 1998.

Dictionnaire des spécialités pharmaceutiques en France.

[89] VIDAL 2002.

Dictionnaire des spécialités pharmaceutiques en France, Edition : Copyright by OVP 2002, p : 5.

[90] ZAAMOUN. N.

Les vaccins.

L'officinal, 1997, 4, p : 27-28.

[91] ZNIBER. MJ.

La vaccination de l'adulte.

L'officiel, mai-juin 2000, 18, p : 2-5.

Encycl. Chir. Thérapeutique, 25014D, 10, 1983, p : 1-3.

Les premières tentatives de vaccinations systématiques remontent aux années 1790 avec JENNER et son vaccin anti-variologique. Cent ans plus tard, PASTEUR donna naissance à la première génération de vaccin avec comme principes généraux l'inactivation ou l'atténuation des agents pathogènes.

L'utilisation des techniques de génétique permet d'envisager la création de très nombreux vaccins de bonne qualité dans un avenir proche.

Ces vaccins, s'ils ont fait les preuves de leur utilité, présentent des inconvénients qui limitent leur développement en particulier le problème de la « sécurité vaccinale », c. à. d le fait de veiller à la sécurité des vaccins dans tous ses

aspects, notamment au niveau de la qualité, de la conservation, de la manipulation, de l'administration des vaccins et de l'élimination des aiguilles.

Vue que la totalité des vaccins sont importés, notre pays a mis en place une unité de contrôle des vaccins et sérums au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM). En effet, la qualité pharmaceutique des vaccins est régie par un système réglementaire strict qui prévoit qu'un contrôle de chaque lot de vaccin avant sa commercialisation soit réalisé par la Direction de Médicament et de Pharmacie (DMP) en suppléant de ceux réalisés par les fabricants afin de s'assurer de leur qualité qui pourrait être affectée par toute interruption de la chaîne du froid au cours de l'importation.

Notre travail s'est intégré dans la démarche du LNCM et plus précisément du service des essais biologiques visant l'enregistrement et la libération de chaque lot de vaccin.

Mots-clés : Vaccins humains – Programme national d'Immunisation – Innocuité - Qualité – Contrôle.

The first systematic vaccinations' attempts dated back to the 1790's with JENNER's anti-variola vaccine. Hundred years later, PASTEUR invented the first generation of vaccines characterized by inactivity or softening of pathogenic agents.

Using the technics of genetics will enable to set up many high quality vaccines in the near futur.

Despite their proven usefulness, these vaccines have drawbacks that limit their development in perculiar «the vaccines safety», i.e. that is keeping an eye on

the safety of the vaccines in all aspects including quality, keeping, administering of vaccines and the destruction of needles.

As all vaccines are imported, our country set up a unit for the control of vaccines and serums inside the National Laboratory of Drugs Control.

In fact vaccines' pharmaceutical quality is governed by a strict regulated system providing that each batch of vaccines should be checked by the Direction of the Drug and Pharmacy before being sold following the controls by manufacturers to ensure that their quality is not jeopardized by any interruption of the refrigeration procedure during the importation.

Our research has integrated the process of National Laboratory of Drugs Control and most precisely that of biological testing services for the registration and the liberation of each batch of vaccines.

Key-words : Human vaccines – Program National Immunisation - Quality – Harmlessness – Control.