



CARACTERISTIQUES D'ACTIVITE ET DE STABILITE DES VACCINS ANTIVARIOLIQUES
UTILISES DANS LES PROGRAMMES D'ERADICATION DE LA VARIOLE
EN AFRIQUE DE L'OUEST ET DU CENTRE-OUEST

par

le Dr A. Bernstein¹ et le Dr M. Z. Bierly, jr¹

L'éradication virtuelle de la variole dans l'ouest et le centre-ouest de l'Afrique prouve que l'objectif visé par l'homme, depuis plus de 200 ans qu'il s'efforce de combattre la maladie, n'est pas impossible à atteindre. L'actuel programme quinquennal doit son succès à une surveillance méticuleuse, à une vaccination efficace et à l'emploi d'un vaccin résistant aux conditions du milieu tropical. L'objet du présent rapport est de fournir, sur les caractéristiques d'activité et de stabilité du vaccin, des renseignements fondés sur des titrages effectués au laboratoire et des épreuves d'activité chez l'homme.

Vaccin antivariolique

Le vaccin antivariolique de Wyeth (Dryvax[®]), utilisé dans le programme africain, est un produit constitué de lymphes lyophilisées de veau, provenant du 22^{ème} au 28^{ème} passage sur génisse du virus vaccinal, souche du New York City Department of Health; il contient de la peptone comme agent stabilisant. Sur les 180 millions de doses préparées par Wyeth, les 3/4 étaient à administrer par injecteur sans aiguille, le reste par aiguille bifide de Wyeth. Tous les lots de vaccin satisfaisaient aux normes de l'United States Public Health Service (USPHS) et de l'OMS.

Depuis avril 1971, le dénombrement des pustules formées sur membrane chorio-allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poulets (titrage MCA) peut remplacer le titrage par scarification sur lapin (SL), d'après les normes USPHS. En ce qui concerne l'activité du produit, ces normes stipulent que le titre sur MCA doit être au moins équivalent à celui du vaccin de référence, déterminé simultanément. L'OMS recommande un titre supérieur à $8,0 \log_{10}$ unités infectantes (pock forming units) par ml.

L'United States Reference Smallpox Vaccine Lot 2 (qui sera désigné ci-après comme vaccin de référence) produit par Wyeth est une préparation lyophilisée de lymphes de veau contenue dans des ampoules au boro-silicate, scellées sous vide et stockées à -70°C par l'organisme de réglementation depuis sa fabrication en 1958.

Titration MCA

L'activité du vaccin préparé par Wyeth pour être utilisé en Afrique a été éprouvée par titrages sur SL et MCA. Cette dernière méthode a été normalisée : on utilise des oeufs embryonnés incubés depuis 12 jours, qui sont inoculés avec 0,1 ml des dilutions $10^{-6,0}$ et $10^{-6,2}$ du vaccin produit et du vaccin de référence, à raison de 8 à 10 oeufs par dilution. Le titre visé pour le vaccin étant de $8,0$ à $8,5 \log_{10}$ unités infectantes par ml, il se forme 10 à 30 pustules par membrane.

¹ Wyeth Laboratories Inc., Marietta, Pa, Etats-Unis d'Amérique.

Le titre moyen du vaccin de référence, calculé d'après 399 titrages MCA effectués en cinq ans et demi, était de $8,3 \log_{10}$ U.inf./ml, avec un écart type de 0,13. Un titrage était considéré comme valable si le titre du vaccin de référence n'était pas inférieur à 8,0 ni supérieur à $8,6 \log_{10}$ U.inf./ml. Les lots de vaccin produit étaient considérés comme équivalents au vaccin de référence si leur titre n'était pas inférieur à $8,0 \log_{10}$ U.inf./ml.

Le vaccin réhydraté à administrer par injecteur sans aiguille est une dilution de 33 fois ($1,5 \log_{10}$) du vaccin à inoculer par aiguille bifide. Les titres de 77 lots de vaccin pour inoculation par injecteur sans aiguille s'échelonnaient de 6,5 à $7,1 \log_{10}$ U.inf./ml, et 82 % d'entre eux dépassaient $6,7 \log_{10}$ U.inf./ml. Les titres de 94 lots de vaccin à inoculer par aiguille bifide allaient de 8,0 à $8,6 \log_{10}$ U.inf./ml et 82 % d'entre eux étaient supérieurs à $8,2 \log_{10}$ U.inf./ml.

Lorsque nous avons commencé à employer la méthode de titrage MCA, nous avons observé que le titre dépendait de l'origine des oeufs, de l'âge de l'embryon et du volume de l'inoculum.

Le tableau 1 montre les titres MCA du vaccin de référence, obtenus avec des oeufs embryonnés de 12 jours provenant de différents groupes de poulets, l'inoculum étant de 0,1 ml. Les titres déterminés avec les oeufs de trois groupes du fournisseur A étaient inférieurs de 0,6 à $0,8 \log_{10}$ à ceux obtenus avec les oeufs d'un autre fournisseur ou avec les oeufs de l'élevage de Wyeth exempt de facteur induisant la résistance (Resistance inducing Factor ou RIF). On n'a pas tenté de déterminer si cette diminution de la sensibilité était liée à des facteurs génétiques ou écologiques tels que la composition de la nourriture et les conditions d'hygiène.

Pour vérifier l'influence de l'âge des embryons sur l'infektivité du vaccin de référence, on a utilisé des oeufs provenant d'un seul groupe de poulets. Cinq titrages ont été effectués à des moments différents sur des oeufs âgés de 10, 11, 12, 13 et 14 jours. Les résultats présentés dans la partie A du tableau 2 montrent que les titres obtenus avec des oeufs de 10 et de 11 jours étaient inférieurs de 1,0 et $0,5 \log_{10}$ respectivement aux titres obtenus sur des embryons de 12 jours, tandis qu'avec des embryons de 13 et 14 jours ils étaient supérieurs d'environ $0,2 \log_{10}$. Les oeufs utilisés dans cette étude ont été mis à incuber le jour même de la ponte afin d'éviter d'éventuelles variations liées à l'intervalle de 21 jours pendant lequel des oeufs fécondés peuvent être stockés.

La partie B du tableau 2 présente les résultats obtenus avec des oeufs embryonnés d'approvisionnement courant, âgés de 11, 12 et 13 jours. L'écart type du titre moyen du vaccin de référence, déterminé sur embryons de 11 jours, est légèrement supérieur au double de celui qui a été observé avec les embryons de 12 et de 13 jours, ce qui donne à penser que la sensibilité des embryons de 11 jours n'est pas aussi uniforme que celle des embryons plus âgés. La différence entre les titres obtenus sur embryons de 11 et de 13 jours n'est pas statistiquement significative en raison de l'importance de l'écart type dans le cas des embryons de 11 jours.

Dans une série de titrages portant sur le vaccin de référence et des lots de vaccin de production, on a utilisé des inoculums de 0,1 et de 0,2 ml. Les titres infectants observés avec l'inoculum le plus faible ont été constamment supérieurs de 0,1 à $0,3 \log_{10}$. Un rapport de Slonim et al.,³ signalant qu'un inoculum de 0,025 ml donnait des titres plus élevés que des inoculums de 0,1, 0,2 ou 0,4 ml, nous a incités à élargir notre étude.

Les résultats de quatre titrages indépendants, dans lesquels les inoculums ont été soigneusement mesurés et déposés au moyen de seringues à tuberculine de 1 ml, ont confirmé les observations de Slonim et al. (tableau 3). Dans une autre étude, on a titré des dilutions en série, de 2 en 2, du vaccin en utilisant des inoculums de 0,025, 0,1 et 0,2 ml. On a inoculé les dilutions appropriées de chaque série de manière à obtenir 10 à 30 pustules par membrane. Pour chaque échantillon étudié, le titre était plus élevé avec l'inoculum de 0,025 ml qu'avec

les inoculums de 0,1 ml ou 0,2 ml. On voit sur la figure 1 que la pente des courbes est la même pour tous les inoculums. Le titrage d'un vaccin lyophilisé stocké à 35°C pendant 30 jours a donné lieu aux mêmes observations.

Le tableau 4 met en évidence l'effet combiné du volume de l'inoculum et de l'âge des oeufs embryonnés sur le titre MCA du vaccin de référence. Le titre moyen a été le plus élevé avec des embryons de 13 jours et un inoculum de 0,1 ml, et le plus faible avec des embryons de 11 jours et un inoculum de 0,2 ml, la différence étant égale à 0,9 log₁₀. Dans ce cas encore, l'écart type du titre moyen obtenu avec des embryons de 11 jours était le double de celui qui correspondait aux embryons plus âgés.

L'origine des oeufs, l'âge des embryons et le volume de l'inoculum n'exercent peut-être pas, isolément, une grande influence sur la détermination de l'activité d'un vaccin mais combinés, ils peuvent conduire à une sous-estimation des titres. Cependant, grâce à l'emploi d'un vaccin de référence dans chaque titrage et à l'établissement de critères de validité des épreuves, fondés sur une méthode normalisée, il est possible de mieux évaluer les caractéristiques d'activité et de stabilité du vaccin antivariolique.

Etudes cliniques

Pour les produits biologiques, les résultats des titrages au laboratoire n'ont de signification que dans la mesure où ils ont été mis en corrélation avec l'activité chez l'homme. Celle-ci se traduit, dans le cas du vaccin antivariolique, par la protection contre la maladie, la formation d'anticorps neutralisants et le développement d'une réaction majeure au point d'inoculation.

Il nous a paru nécessaire d'établir la relation entre l'activité du vaccin de référence que nous avons utilisé et les effets chez l'homme. A cette fin, nous avons choisi de comparer la réaction cutanée chez de jeunes adultes revaccinés au rapport des titres obtenus par scarification sur lapin et au titre MCA de préparations non diluées et diluées du vaccin de référence.

Espmark¹ a montré que l'obtention d'une réaction majeure demandait moins de virus infectant chez les primovaccinés que chez les revaccinés et que chez ces derniers la concentration de virus nécessaire était inversement proportionnelle au temps écoulé depuis la dernière vaccination. L'administration de vaccin à de jeunes adultes déjà vaccinés était donc une épreuve rigoureuse de l'activité.

La population que nous avons étudiée était celle d'une maison de correction pour jeunes hommes de 15 à 22 ans. La vaccination antivariolique est imposée à tous les entrants, y compris ceux qui arrivent pour la deuxième ou la troisième fois. Certains des pensionnaires les plus âgés avaient fait leur service militaire et avaient été vaccinés contre la variole au moment de leur incorporation. Virtuellement tous les pensionnaires avaient reçu une primo-vaccination entre un et six ans. Pour la moitié environ de cette population, on a estimé que la dernière vaccination datait de 10 à 20 ans. En vue de contrôler cette variable, chaque individu a été soumis à deux vaccinations effectuées par un vaccinateur expérimenté (M. Z. Bierly, jr), l'une sur un bras avec la préparation à expertiser et la deuxième, comme témoin, sur l'autre bras avec le vaccin de référence non dilué. Les inoculations étaient faites avec une aiguille bifide de Wyeth à raison de 15 à 20 pressions tangentielles.

Le jour de la vaccination, on a préparé deux échantillons de vaccin de référence réhydraté qui ont reçu une désignation codée : le vaccin de référence non dilué d'une part et, d'autre part, une dilution du vaccin de référence ou une préparation non diluée de ce même vaccin. Les deux dernières préparations étaient dites vaccins à expertiser tandis que la première était le vaccin témoin. Le vaccinateur ignorait de quel vaccin il s'agissait au moment de la vaccination ou de l'examen des bras une semaine après. Les réactions ont été enregistrées comme majeures ou équivoques d'après la définition donnée par le Comité OMS d'experts de la Variole;² pour la mise en tableau, on a indiqué le nombre d'individus ayant manifesté des réactions majeures à chacune des préparations vaccinales codées. Comme on le voit dans le tableau 5, les

résultats sont également présentés sous forme de rapport entre le pourcentage d'individus ayant présenté une réaction majeure sur le bras ayant reçu le vaccin à expertiser (vaccin de référence dilué ou non dilué) et le pourcentage d'individus ayant eu une réaction majeure sur le bras inoculé avec le témoin (vaccin de référence non dilué).

La sensibilité des 18 groupes vaccinés sur une période de 15 mois a été similaire, comme le montre le pourcentage d'individus ayant présenté une réaction majeure au vaccin témoin (vaccin de référence non dilué). Chez 63 % de la population totale l'administration du vaccin témoin a déterminé une réaction majeure et, à l'exception d'un groupe de 20 individus ayant reçu une dilution au 1/100 du vaccin à expertiser, la réaction dans les autres groupes ne s'écartait pas plus de 8 % de celle de la population totale.

Pour 87 sujets vaccinés aux deux bras avec le vaccin de référence non dilué, la concordance des réactions majeures aux deux localisations était de 94 %; 53 sujets présentaient une réaction majeure sur un bras et 50, une réaction identique sur l'autre. Dans les quatre essais séparés comprenant le groupe à vaccin non dilué, la concordance a été de 82 %, 96 % et 100 % (à deux reprises). Chez les sujets ayant reçu le vaccin dilué à 1/2,5 ou 1/3,5 sur un bras et le vaccin témoin sur l'autre, la fréquence des réactions majeures était la même de deux côtés. Dans les groupes ayant reçu les dilutions 1/5 et 1/10 respectivement, le rapport moyen entre les réactions au vaccin à expertiser et les réactions au vaccin témoin se situait dans l'intervalle observé par le groupe vacciné aux deux bras avec la préparation témoin; cependant, dans chacun de ces groupes, un essai a donné les rapports 0,64 et 0,78 respectivement. Etant donné la diversité marquée des réactions obtenues avec le vaccin de référence dilué au 1/100, il a paru inutile de poursuivre des observations.

Des fractions des préparations étudiées et de la préparation témoin, sous forme d'échantillons codés, ont été soumises à des épreuves d'activité par les méthodes de scarification sur lapin et d'inoculation sur MCA. On trouve au tableau 6 les résultats de ces épreuves et les réactions obtenues chez des sujets revaccinés. Ces données montrent que, chez de jeunes adultes revaccinés par la technique de pressions multiples au moyen d'une aiguille bifide de Wyeth, un vaccin de titre $7,7 \log_{10}$ U.inf. par ml ou donnant un rapport de 0,5 à l'épreuve de scarification sur lapin provoque la même fréquence de réactions majeures que le lot de vaccin de référence ayant un titre MCA de $8,3 \log_{10}$ U.inf. par ml.

Etudes de la stabilité

L'une de nos premières études sur les caractéristiques de stabilité des vaccins lyophilisés consistait à évaluer deux types de vaccin, destinés à être administrés l'un par injecteur sans aiguille et l'autre par aiguille bifide. Des échantillons de 11 lots de vaccin stockés à 100°C, 70°C, 50°C, 37°C, 25°C, 5°C et -20°C ont été inoculés à divers intervalles dans des cultures primaires de cellules rénales de singe cercopithèque (RSC).

Il ressort de 22 titrages du vaccin de référence en cultures RSC que les limites de confiance à 95 % pour le titre d'un vaccin antivariolique ainsi déterminé sont de $\pm 0,4 \log_{10}$ DICT₅₀ par ml. Les résultats obtenus dans cette étude étant identiques pour les 11 lots de vaccin, ils sont combinés dans les figures 2 et 3. Une diminution significative du titre du vaccin ($0,5 \log_{10}$ DICT₅₀ par ml) apparaît après stockage d'une heure à 100°C, un jour à 70°C, deux semaines à 50°C, six mois à 37°C et 21 mois à 25°C.

Dans notre laboratoire, le titre infectant du vaccin antivariolique, déterminé sur système de culture cellulaire RSC et exprimé en \log_{10} DICT₅₀ par ml, est comparable au titre obtenu sur MCA. La figure 4 représente la corrélation entre les deux méthodes de titrage. Mais ce résultat n'est peut-être pas généralisable car nous n'avons pas obtenu la même concordance en titrant la préparation internationale de référence par les deux méthodes. Les différences observées dans les titres, figurant au tableau 7, sont peut-être liées aux souches de virus utilisées pour préparer les divers vaccins de référence. Les vaccins de référence US et Wyeth ont été obtenus à partir de la souche du NYC Board of Health tandis que la préparation internationale de référence l'a été à partir de la souche Lister.

Une deuxième étude a été entreprise pour déterminer les caractéristiques de stabilité de vaccin lyophilisé de Wyeth par la méthode MCA. Les courbes de la figure 5 représentent les variations moyennes du titre pour six lots de vaccin stockés à 37°C, 25°C et 5°C, par rapport au titre du vaccin stocké à -20°C, déterminé aux mêmes intervalles. Pour le vaccin stocké à 25°C, le titre a diminué progressivement de 0,3 à 0,4 log₁₀ U.inf. par ml. Après trois mois de stockage à 37°C, l'activité a baissé de 0,4 log₁₀ et après six mois le titre était inférieur de 0,5 log₁₀ à celui des vaccins témoins. Ces résultats concordent bien avec ceux qu'ont donnés les titrages sur système de cellules RSC, ce qui confirme la possibilité d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre méthode de titrage.

Pour étudier la stabilité à long terme des vaccins stockés entre 2° et 8°C, on a titré des échantillons de 27 lots de production stockés pendant des périodes allant de un an et demi à huit ans et demi. Les sept lots les plus anciens avaient été soumis, au moment de leur fabrication, à des épreuves d'activité par la méthode de scarification sur le lapin. Ils ont été titrés en oeufs embryonnés une première fois en 1968 (titres de 8,0 à 8,3 log₁₀ U.inf. par ml), puis trois ans après le titre MCA des 20 autres lots s'échelonnait, au moment de leur préparation, de 8,0 à 8,6 log₁₀ U.inf. par ml. La figure 6, qui représente le titre des 27 lots de vaccins en fonction du temps de stockage, montre que les vaccins lyophilisés peuvent être stockés jusqu'à 8 ans et demi entre 2° et 8°C sans perte importante d'activité.

Dans une autre étude, on a cherché à définir les caractéristiques de stabilité des vaccins réhydratés pour inoculation par aiguille bifide, en simulant les conditions d'emploi du produit dans le cabinet du médecin ou au centre de vaccination, endroits où le vaccin peut être exposé à la température ambiante pendant des périodes de temps variables, jusqu'à ce qu'il soit épuisé. Des échantillons de six lots de vaccins réhydratés ont été stockés à :

- A. 2-8°C seulement;
- B. 2-8°C avec expositions à 25°C; à raison de 1 heure deux fois par semaine pendant les deux premiers mois, et de 1 heure une fois par semaine pendant les deux derniers mois. L'exposition totale à 25°C a donc été de 24 heures en 16 semaines;
- C. 2-8°C avec expositions de 20 minutes à 25°C cinq jours par semaine. En 16 semaines, la durée totale de l'exposition à 25°C a donc été de 26 heures;
- D. -10 à -20°C seulement.

Tous les vaccins ont été titrés à intervalles de quatre semaines. Les titres des six lots étant presque identiques au moment de leur fabrication (8,3, 8,4, 8,3, 8,5, 8,4 et 8,5 log₁₀ U.inf./ml), les données ont été réunies, et c'est leurs valeurs moyennes qui sont présentées dans le tableau 8. Les vaccins stockés dans les quatre conditions expérimentales ci-dessus ont conservé pendant 16 semaines des titres d'activité équivalents à ceux du vaccin de référence. Des échantillons codés de certains de ces vaccins ont été administrés à l'aiguille bifide à de jeunes adultes déjà vaccinés. Un échantillon codé du vaccin de référence a été inoculé en même temps sur l'autre bras, comme précédemment. Le tableau 9 montre que le rapport des pourcentages de réactions majeures apparues après l'administration, respectivement du vaccin à expertiser (B) et du vaccin de référence (A) était compris entre 0,87 et 1,09 au cours des 17 semaines d'observation. Au bout de 15, 16 et 17 semaines, sa valeur était respectivement de 1,0, 1,0 et 0,94, ce qui confirme les titrages faits au laboratoire selon lesquels le vaccin antivariolique de Wyeth conserve une activité suffisante après réhydratation et stockage entre 2° et 8°C pendant quatre mois.

Dans le tableau 10 sont récapitulés les résultats des trois études sur les caractéristiques de stabilité des vaccins réhydratés destinés à l'administration par injecteur sans aiguille. Au cours de cette recherche, on a également évalué l'emploi d'un diluant sans agent de conservation, destiné à être utilisé en Afrique, ainsi que d'un diluant avec 0,25 % de phénol. Après stockage à 37°C pendant 32 heures, on n'a pas constaté de baisse du titre dans le vaccin réhydraté avec le diluant sans phénol. Par contre, le titre du vaccin réhydraté avec le diluant contenant du phénol avait diminué de 0,3 log₁₀.

Remarques et résumé

Nous avons montré que le titrage de l'activité des vaccins antivarioliques par la méthode MCA pouvait donner des valeurs plus faibles suivant l'origine des oeufs embryonnés, l'âge des embryons et le volume de l'inoculum. Une normalisation est donc souhaitable, à savoir utilisation d'embryons âgés de 12 à 13 jours, inoculum de 0,1 ou 0,05 ml et titrage simultané d'un vaccin de référence afin d'évaluer la sensibilité de l'opération.

Les normes de l'OMS et de l'USPHS relatives au vaccin antivariolique stipulent une activité trop élevée de deux à quatre au minimum. C'est ce qui ressort de nos observations, d'après lesquelles la fréquence des réactions majeures, chez les adultes jeunes revaccinés, est la même pour un vaccin de titre $7,7 \log_{10}$ U.inf./ml ou de titre $8,3 \log_{10}$ U.inf./ml. Le facteur représentant l'excès d'activité est certainement encore plus grand dans le cas des primovaccinations.

Le succès du programme d'éradication de la variole dans une partie de l'Afrique corrobore les résultats des études de stabilité d'après lesquelles les vaccins lyophilisés et reconstitués gardent une activité suffisante lorsqu'ils sont stockés et utilisés conformément aux directives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Espmark, J. A. (1965) Smallpox vaccination studies with several dilutions of vaccine. I. Primary vaccination and revaccination in human adults, Acta path. microbiol. scand., 63, 97-115
2. Organisation mondiale de la Santé : Comité OMS d'experts de l'Eradication de la Variole (1972) Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn. N° 493, pp. 16-18
3. Slonim, D., Maly, V. & Rosleroua, V. (1967) Relation of the PFU value to the volume of inoculum in the titration of vaccinia virus on the chorio-allantoic membrane of the chick embryo, J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 11, 32-39

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier MM. W. Gingrich, K. Innerest, S. Marshall, R. Gray, P. Linard, D. Hollinger, J. Wasér et le Dr J. H. Brown pour l'aide qu'ils leur ont apportée dans l'exécution de ces études.

TABLEAU 1. RESULTATS DES TITRAGES MCA DU U.S. REFERENCE SMALLPOX VACCINE
LOT 2 (VACCIN DE REFERENCE) SUR OEUF S EMBRYONNES PROVENANT DE DIFFERENTS
GROUPES DE POULETS

Origine des oeufs	Nombre de titrages	Titre moyen \log_{10} U.inf./ml
Fournisseur A		
Groupe We	7	7,7
Groupe Br	8	7,5
Groupe Wa	1	7,7
Fournisseur B	2	8,4
Elevage de Wyeth exempt de FIR	3	8,3

TABLEAU 2. INFLUENCE DE L'AGE DES OEUF S EMBRYONNES SUR LES TITRES MCA DU
VACCIN DE REFERENCE

A. Oeufs embryonnés mis à incuber le jour de la ponte

Différence des titres* par rapport à ceux donnés par des embryons de 12 jours						
Age de l'embryon	Titrage 1	Titrage 2	Titrage 3	Titrage 4	Titrage 5	Moyenne
10 jours	-1,0		-1,0		-1,1	-1,0
11 jours	-0,4	-0,3	-0,6	-0,6	-0,5	-0,5
12 jours	8,3*	8,3	8,2	8,3	8,2	
13 jours	+0,2	+0,3	+0,2	+0,3	+0,2	+0,2
14 jours	+0,3	+0,2	+0,2	+0,3	+0,2	+0,2

* \log_{10} U.inf./ml.

B. Oeufs embryonnés d'approvisionnement courant

Age de l'embryon	Nombre de titrages	Titre en \log_{10} U.inf./ml			
		Médiane	Intervalle	Ecart type	Limites de confiance à 95 %
11 jours	12	8,0	7,6-8,4	0,28	$\pm 0,5$
12 jours	125	8,4	8,1-8,6	0,11	$\pm 0,2$
13 jours	17	8,6	8,4-8,8	0,11	$\pm 0,2$

TABEAU 3. INFLUENCE DU VOLUME DE L'INOCULUM SUR LES RESULTATS DU TITRAGE MCA DU VACCIN DE REFERENCE*

Dilution du vaccin inoculée	Volume de l'inoculum (ml)			
	0,2	0,1	0,05	0,025
10 ^{-5,8}	** 7,9 (26) ^a	8,1 (20)	8,2 (13)	8,3 (8)
10 ^{-6,0}	7,9 (17)	8,2 (16)	8,3 (11)	8,5 (9)
10 ^{-6,2}	8,1 (15)	8,2 (11)	8,4 (7)	8,8 (10)

* Résultats combinés de 4 titrages.
 ** Titre infectant en log₁₀ U.inf./ml.
^a Nombre moyen de pustules par membrane.

TABEAU 4. INFLUENCE COMBINEE DU VOLUME DE L'INOCULUM ET DE L'AGE DES OEUFES EMBRYONNES SUR LES RESULTATS DU TITRAGE MCA DU VACCIN DE REFERENCE

Volume de l'inoculum		Age des oeufs embryonnés		
		11 jours	12 jours	13 jours
0,1 ml	Titre moyen en log ₁₀ U.inf./ml	8,2	8,4	8,7
	Nombre de titrages	4	93	6
	Ecart type	0,23	0,11	0,07
0,2 ml	Titre moyen en log ₁₀ U.inf./ml	7,8	8,2	8,5
	Nombre de titrages	14	15	3
	Ecart type	0,21	0,11	0,07

TABLEAU 5. REACTIONS A LA VACCINATION AVEC DES PREPARATIONS NON DILUEES ET DILUEES DU VACCIN DE REFERENCE ADMINISTREES PAR AIGUILLE BIFIDE DE WYETH, CHEZ DE JEUNES ADULTES REVACCINES

Dilution du vaccin de référence	Nombre d'essais	Nombre de sujets vaccinés	Nombre de réactions majeures sur les bras ayant reçu :		Rapport B/A	
			Vaccin témoin** A	Vaccin à expertiser B	Moyenne	Intervalle
Non dilué	4	87	53 (61 %) *	50	0,94	0,82-1,00
1/2,5	2	27	18 (67 %)	17	0,96	0,93-1,00
1/3,5	2	47	26 (55 %)	25	0,96	0,92-1,00
1/5,0	6	153	99 (65 %)	84	0,85	0,64-1,11
1/10	3	68	43 (65 %)	37	0,85	0,78-0,93
1/100	1	20	15 (75 %)	3	0,2	
Total	18	402	254 (63 %)			

* Pourcentage de sujets présentant des réactions majeures sur le bras qui a reçu le vaccin témoin.
** Vaccin de référence non dilué.

TABLEAU 6. CORRELATION ENTRE LES RESULTATS DES TITRAGES D'ACTIVITE DU VACCIN DE REFERENCE NON DILUE ET DILUE ET LES REACTIONS CUTANEEES CHEZ DE JEUNES ADULTES REVACCINES AU MOYEN DE L'AIGUILLE BIFIDE DE WYETH

Dilution du vaccin de référence	Titration MCA en \log_{10} U.inf./ml			Epreuve de scarification sur lapin		Apparition de réactions majeures	
	Nombre de titrages	Moyenne	Intervalle	Rapport au vaccin de référence*		Rapport	Vaccin à expertiser B
				Moyenne	Intervalle		Vaccin témoin A
Vaccin témoin A non dilué	18	8,3	8,1-8,6	0,93	0,82-1,05		
Vaccin à expertiser B non dilué	4	8,3	8,2-8,4	0,94	0,86-1,03		0,94
1/2,5	2	8,0	8,0-8,1	0,54	0,61-0,46		0,96
1/3,5	2	7,7	7,7-7,8	0,52	0,58-0,46		0,96
1/5,0	6	7,6	7,2-7,7	0,38	0,24-0,48		0,85
1/10	3	7,4	7,4, 7,4, 7,4	0,24	0,21-0,27		0,75
1/100	1	6,2		0,03			0,2

* Vaccin de référence, réhydraté au moment du titrage.

TABLEAU 7. TITRAGE DU VACCIN DE REFERENCE ET DE LA PREPARATION INTERNATIONALE DE REFERENCE SUR MCA ET SUR CULTURE CELLULAIRE RSC

Vaccin de référence	Titre MCA \log_{10} U.inf./ml	Titre CMK \log_{10} DICT ₅₀ /ml	Rapport des titres RSC/MCA
Préparation internationale de référence	8,3	7,4	-0,9
Vaccin de référence	8,4	8,8	+0,4
Vaccin de référence de Wyeth	7,9	8,2	+0,3

TABLEAU 8. ETUDE DE LA STABILITE DU VACCIN DRYVAX[®] RECONSTITUE

Durée de stockage (semaines)	Titrages MCA \log_{10} U.inf./ml				Vaccin de référence
	Conditions de stockage*				
	A	B	C	D	
0	8,4				8,2
4	8,4	8,3	8,4	8,5	8,3
8	8,4	8,2	8,3	8,4	8,3
12	8,2	8,2	8,2	8,4	8,3
16	8,2	8,1	8,2	8,4	8,2

* Conditions de stockage Dryvax[®] - Vaccin antivariolique lyophilisé

A 2-8°C seulement
 B 2-8°C et 2 expositions de 1 heure à 25°C par semaine
 C 2-8°C et expositions de 20 min à 25°C, 5 jours par semaine
 D Entre 10 et 20°C seulement.

TABLEAU 9. REACTIONS CUTANÉES CHEZ DE JEUNES ADULTES REVACCINÉS AU MOYEN DE L'AIGUILLE BIFIDE DE WYETH AVEC DU VACCIN DRYVAX[®] RECONSTITUÉE, STOCKÉE À 2-8°C*

Durée du stockage (semaines)	Titre MCA \log_{10} U.inf./ml	Nombre de sujets vaccinés	Pourcentage de réactions majeures				Rapport B/A
			Vaccin de référence A**		Vaccin à expertiser B		
			Nombre	%	Nombre	%	
0	8,4	86	62	(72)	59	(69)	0,96
4	8,1	60	37	(62)	34	(57)	0,92
8	8,1	33	22	(67)	24	(73)	1,09
10	8,1	29	24	(83)	22	(76)	0,92
12	8,2	49	39	(80)	34	(69)	0,87
13	7,9	73	46	(63)	41	(56)	0,89
15	8,0	21	13	(62)	13	(62)	1,00
16	8,0	36	23	(64)	23	(64)	1,00
17	8,2	30	20	(67)	19	(63)	0,94

* Conditions de stockage B (voir texte).

** Vaccin de référence - $8,4 \log_{10}$ U.inf./ml Dryvax[®] - Vaccin antivariolique lyophilisé.

TABEAU 10. CARACTERISTIQUES DE STABILITE DU VACCIN ANTIVARIOLIQUE RECONSTITUE,
DESTINE A ETRE ADMINISTRE PAR INJECTEUR SANS AIGUILLE

Stockage		Variations du titre (\log_{10} DICT ₅₀ /ml)* à partir du temps 0	
Température	Temps	Diluant sans phénol	Diluant avec 0,25 % de phénol
5°C	8 heures	0,0	-0,1
	24 heures	-0,1	-0,1
	32 heures	0,0	-0,1
25°C	8 heures	0,0	-0,1
	24 heures	0,0	-0,2
	32 heures	-0,1	-0,2
37°C	8 heures	0,0	-0,2
	24 heures	0,0	-0,3
	32 heures	0,0	-0,3
18 heures à 37°C plus 6 heures à 25°C		0,0	-0,3

* Résultats combinés de trois études au moyen de cultures de cellules rénales de singe cercopithèque.

FIGURE 1. RESULTATS DU TITRAGE MCA AVEC
DES INOCULUMS DE 0,2, 0,1 ET 0,0025 ml

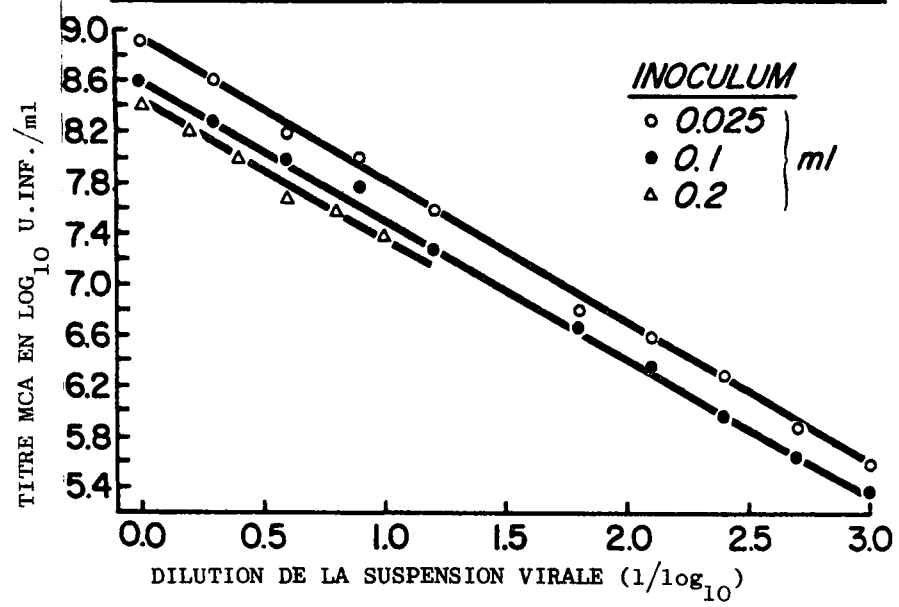
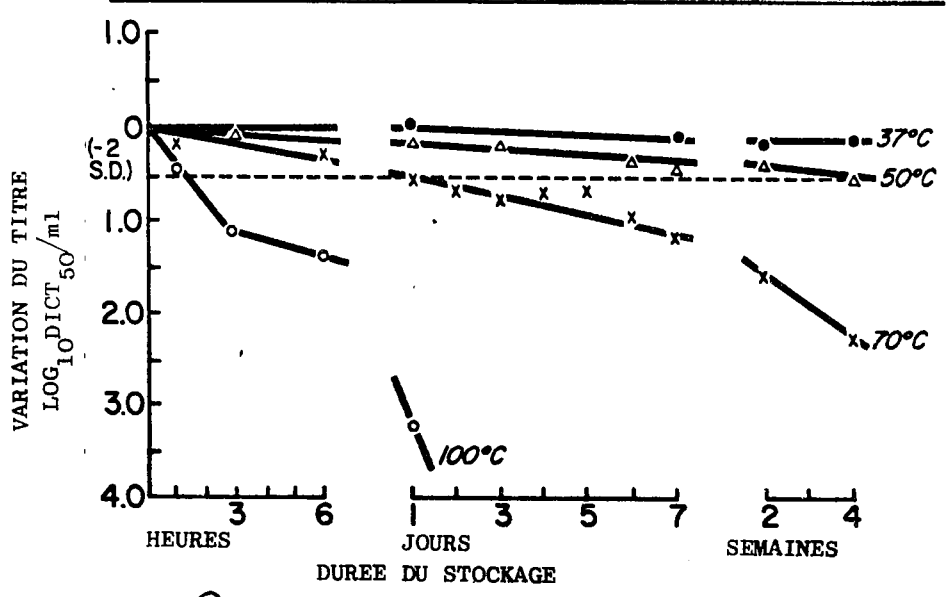


FIGURE 2. ETUDES DE LA STABILITE DU DRYVAX®
- VACCIN LYOPHILISE STOCKE A 37°, 50°, 70° ET 100°C -
TITRAGE SUR CULTURES DE CELLULES RSC



DRYVAX® - Vaccin antivariolique lyophilisé

FIGURE 3. ETUDES DE LA STABILITE DU DRYVAX®
- VACCIN LYOPHILISE STOCKE A 5°, 25°, 37°, 50°, et 70°C -
TITRAGE SUR CULTURES DE CELLULES RSC

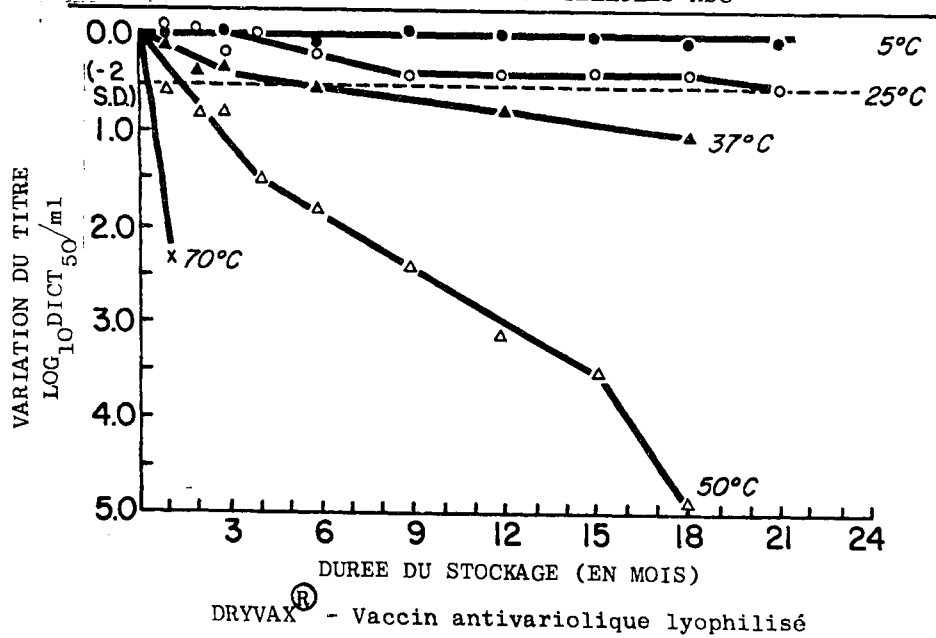


FIGURE 4. COMPARAISON DES TITRES OBTENUS SUR CULTURE CELLULAIRE RSC ET SUR MCA POUR DES DILUTIONS EN SERIE DE 2 EN 2 DU VACCIN ANTIVARIOLIQUE

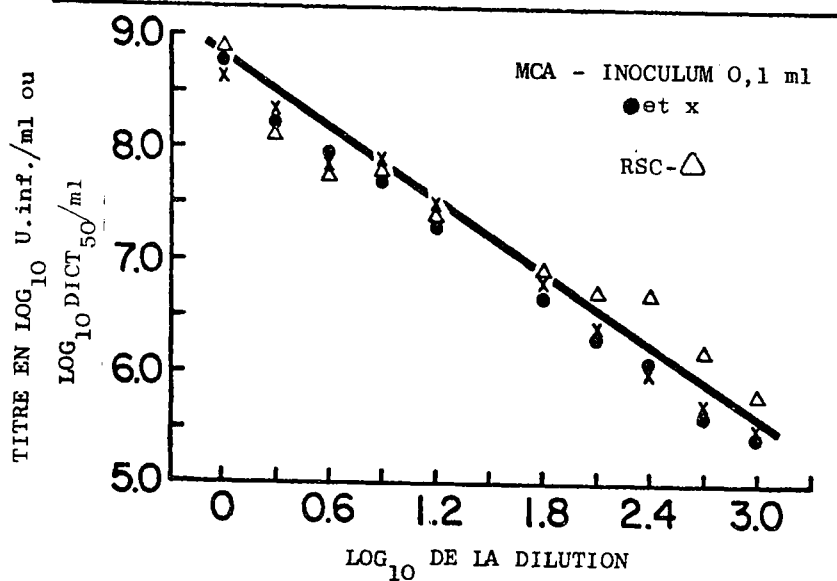


FIGURE 1. RESULTATS DU TITRAGE MCA AVEC
DES INOCULUMS DE 0,2, 0,1 ET 0,0025 ml

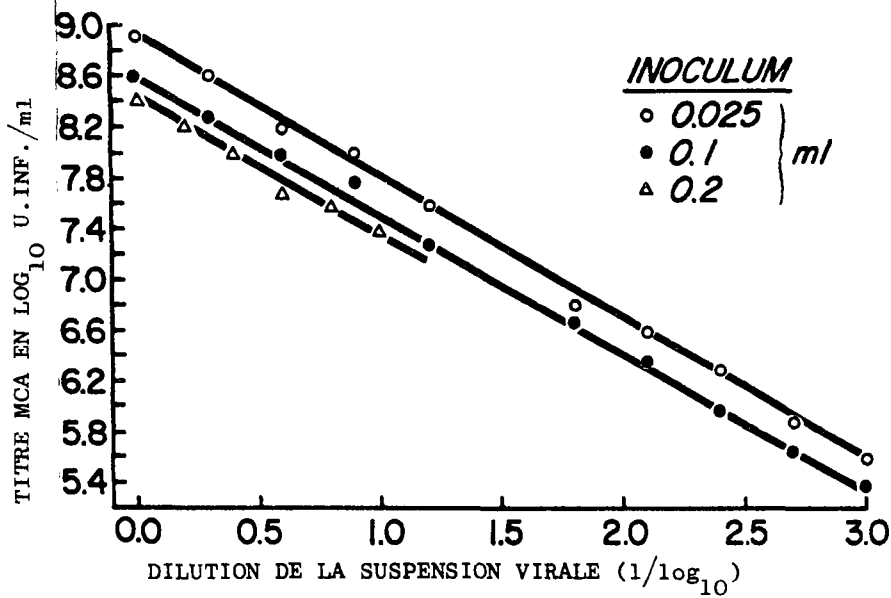
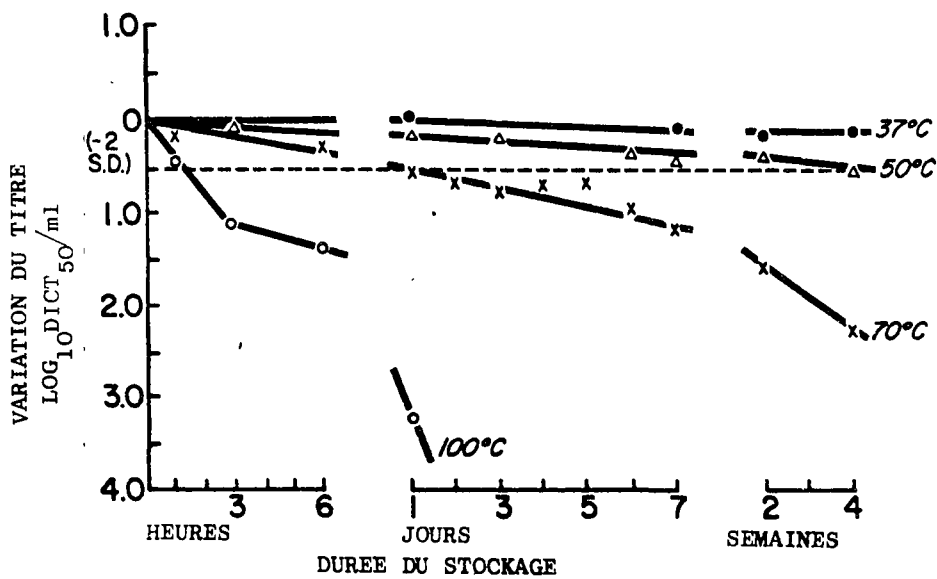


FIGURE 2. ETUDES DE LA STABILITE DU DRYVAX®
- VACCIN LYOPHILISE STOCKE A 37°, 50°, 70° ET 100°C -
TITRAGE SUR CULTURES DE CELLULES RSC



DRYVAX® - Vaccin antivariolique lyophilisé

FIGURE 3. ETUDES DE LA STABILITE DU DRYVAX[®]
- VACCIN LYOPHILISE STOCKE A 5°, 25°, 37°, 50°, et 70°C -
TITRAGE SUR CULTURES DE CELLULES RSC

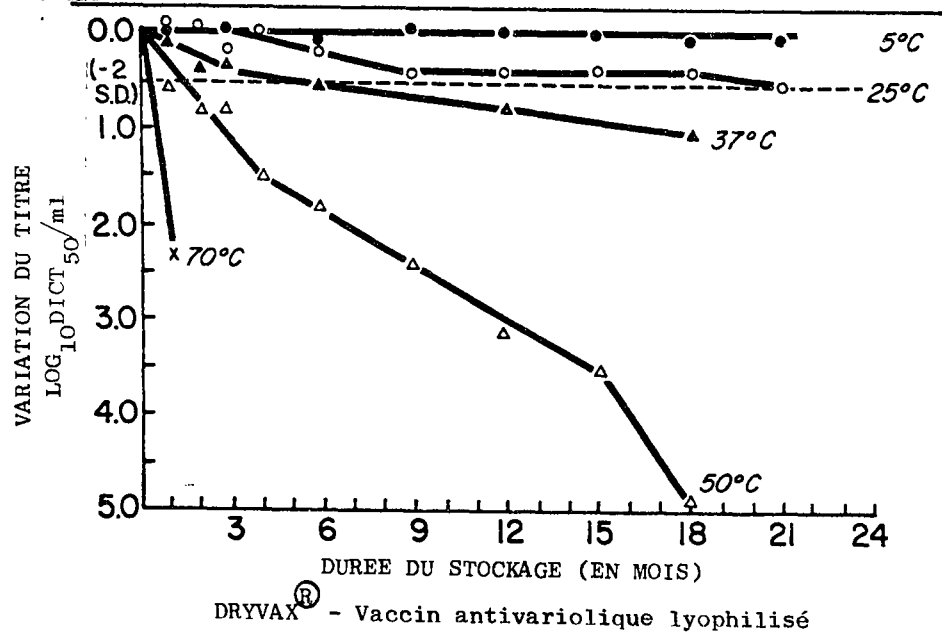


FIGURE 4. COMPARAISON DES TITRES OBTENUS SUR CULTURE CELLULAIRE RSC ET SUR MCA POUR DES DILUTIONS EN SERIE DE 2 EN 2 DU VACCIN ANTIVARIOLIQUE

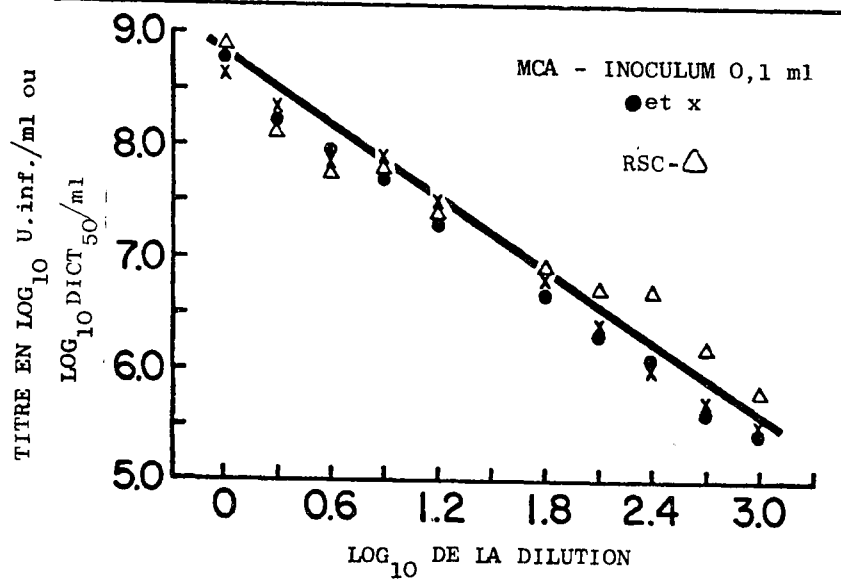
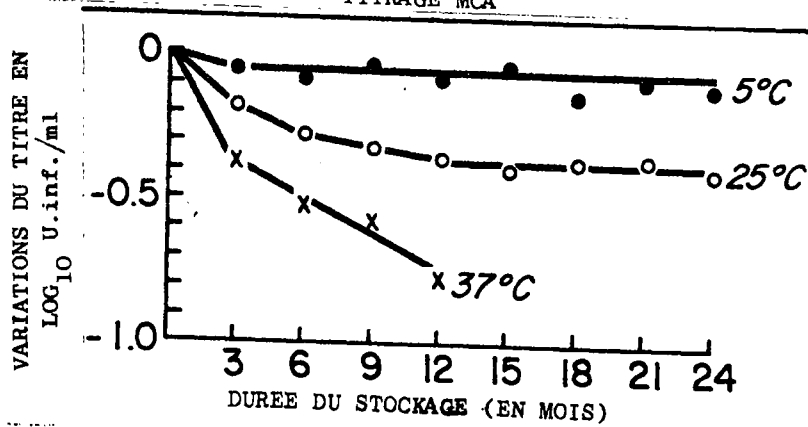


FIGURE 5. ETUDE* DE LA STABILITE DU DRYVAX®
- VACCIN LYOPHILISE STOCKE A 5°, 25°, et 37°C
TITRAGE MCA



* Variation moyenne du titre de 6 lots de vaccin pour administration par injecteur sans aiguille
DRYVAX® - Vaccin antivariolique lyophilisé

FIGURE 6. STOCKAGE A LONG TERME DU DRYVAX® A 2-8°C

