Bull. Org. mond. Santé
Bull. Wld Hlth Org. } 1971, **44**, 729-737

Etude de la thermostabilité du vaccin antiamaril sur des échantillons de huit lots provenant de divers pays

Y. ROBIN,[1] A. C. SAENZ,[2] A. S. OUTSCHOORN[3] & B. GRAB[4]

Les épidémies de fièvre jaune, qui se sont multipliées en Afrique depuis une décennie, ont rendu nécessaire l'exécution de campagnes de vaccination de masse avec le vaccin 17 D dans des régions de la zone tropicale où les communications sont parfois très lentes et l'équipement en appareils frigorifiques insuffisant. Il est alors difficile pour les équipes de vaccination en déplacement de conserver le vaccin dans des conditions normales, c'est-à-dire de le maintenir à une température inférieure à +4°C — niveau qui ne peut être dépassé qu'exceptionnellement — pendant un délai n'excédant pas trois mois.

Il était donc très important de préciser la stabilité du vaccin 17 D à différentes températures pendant des périodes de une semaine à six mois. Les auteurs rapportent ici les résultats de l'étude qu'ils ont effectuée sur des lots de vaccins préparés par sept laboratoires producteurs.

La stabilité du vaccin antiamaril retient l'attention de l'OMS depuis quelque temps. Il s'agit d'une propriété dont dépend la quantité de virus effectivement administrée à l'homme dans les différentes préparations vaccinales utilisées, selon leur mode de fabrication et leur stockage. Sa prise en considération est importante tant dans les problèmes de transport du vaccin sous les climats particulièrement chauds qu'en rapport avec la disponibilité de matériel suffisamment stable pour servir de préparation internationale de référence de vaccin antiamaril.

La Vingt-troisième Assemblée mondiale de la Santé a examiné les « Problèmes actuels posés par la fièvre jaune en Afrique ». Elle a noté que « les vaccins contre la fièvre jaune préparés avec la souche 17 D sont très efficaces » et confèrent une protection de longue durée, mais elle a reconnu que « des recherches supplémentaires sur la thermostabilité du vaccin sont encore nécessaires ».[5]

Un groupe d'étude des normes relatives au vaccin antiamaril (1959) a précisé les conditions d'une épreuve applicable à l'estimation du contenu du vaccin en virus actif, fondée sur la détermination de la teneur en doses de virus létales pour la souris dans la dose de vaccin recommandée pour l'homme. Ce groupe a, de plus, stipulé que « le fabricant doit recommander des conditions de stockage et d'expédition permettant au vaccin prêt à l'emploi de rester conforme aux normes concernant l'activité jusqu'à la date-limite d'utilisation indiquée sur l'étiquette ». La possibilité de disposer d'une préparation de virus antiamaril stable, utilisable comme matériel de référence, permettrait la mise au point, pour le contrôle des vaccins antiamarils, de meilleures méthodes (par exemple lorsqu'il s'agit de déterminer la teneur en virus actif) conduisant à des résultats mieux comparables entre vaccins, et l'exécution d'études convenables concernant la teneur en virus du vaccin reconstitué sur le terrain. On pourrait alors établir des normes satisfaisantes en rapport avec les périodes de conservation du vaccin avant son utilisation, par exemple au moyen d'épreuves basées sur la demi-vie du virus vaccinal.

Dans le cadre des programmes OMS de standardisation biologique et de lutte contre les maladies virales, a été organisée une étude de la thermostabilité

[1] Sous-Directeur de l'Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal.

[2] Anciennement: service des Maladies à virus, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse.

[3] Chef du service de la Standardisation biologique, Organisation mondiale de la Santé, Genève.

[4] Service de la Méthodologie des statistiques sanitaires, Organisation mondiale de la Santé, Genève.

[5] Résolution WHA23.34.

de certains vaccins antiamarils de préparation courante. Ceux-ci ont pu être comparés directement, toutes les estimations de teneur en virus actif étant effectuées dans un seul et même laboratoire. L'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal) a bien voulu se charger de cette partie des travaux. Six laboratoires, choisis au hasard dans différentes régions et producteurs de vaccin antiamaril agréé par l'OMS pour les primovaccinations et les vaccinations de rappel exigées aux fins des voyages internationaux, ont été invités à fournir chacun 75 ampoules au moins d'un même lot. Le laboratoire chargé de l'expertise a fourni lui-même un matériel analogue provenant de deux lots. Les laboratoires ont également communiqué leurs protocoles de fabrication et d'épreuve de chacun des vaccins fournis. Ces laboratoires sont énumérés dans l'annexe, mais dans un ordre indépendant du numérotage des vaccins dans le présent rapport. Tout le matériel nécessaire à cette étude a été fourni à titre gracieux. Que les généreux donateurs trouvent ici l'expression d'une vive gratitude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des vaccins

A leur arrivée à Dakar, les colis contenant les ampoules de vaccin ont été pris en charge par une personne étrangère au titrage qui a noté la date d'arrivée, la nature du réfrigérant et la température au niveau des ampoules mesurée à l'aide d'une sonde thermique. Chaque ampoule a été conservée à −70°C jusqu'au jour de l'épreuve. Dans notre exposé, nous désignerons les préparations de vaccins par le numéro qu'ils ont reçu lors de leur prise en charge. Il y a eu en tout 8 préparations de vaccin, numérotées de 1 à 8, l'Institut Pasteur de Dakar ayant fourni deux préparations.

Epreuve thermique

Le comportement des vaccins a été étudié après 1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 6 semaines, 3 mois et 6 mois de séjour à quatre températures différentes: −20°C, +5°C, +22°C et +37°C.

−20°C: cette température est réalisée dans une sorbetière (*deep freeze*). Le contrôle de la température est effectué à l'aide d'une sonde thermique avec cadran extérieur à l'appareil.

+5°C: on a utilisé un réfrigérateur ménager muni d'une sonde thermique avec cadran mural.

+22°C: on a utilisé l'étuve réglée à 22°C (±1°C) qui sert à l'inactivation du vaccin antirabique.

+37°C: les ampoules ont été immergées dans un bain-marie équipé d'un microthermostat électrique Rotax assurant une température constante de 37°C à 1/10 de degré près.

Pour éliminer les risques d'inactivation des vaccins par rayonnement ultraviolet, les ampoules ont été enveloppées dans du papier d'aluminium.

Epreuves de laboratoire

Souris. Les souris utilisées pour le titrage appartiennent à un élevage de souris blanches provenant de reproducteurs fournis par le Yellow Fever Research Institute de Yaba (Nigéria), il y a 20 ans.

L'élevage, qui appartient à l'Institut, est situé à 15 km de Dakar. Les souris de quatre semaines sont commandées le vendredi et utilisées le mardi ou le mercredi suivant. Elles sont gardées dans des cages rectangulaires, chaque cage pouvant contenir 100 souris.

L'affectation aléatoire des souris a été faite par tirage au sort en deux étapes, la première aboutissant à la répartition en boîte, chaque boîte correspondant à un titrage (32 boîtes de 36 souris), la seconde consistant à répartir les souris de chaque boîte en quatre bocaux, chaque bocal correspondant à une dilution du vaccin à éprouver, soit 9 souris par bocal. Les souris inoculées ont été gardées en observation pendant une durée de 21 jours.

Titrage

a) Diluant: solution tampon phosphatée, pH 7,4, contenant 0,75 % d'albumine bovine (fraction V — Armour).

b) Réhydratation: les ampoules ont été réhydratées dans le volume de diluant indiqué par le fournisseur sauf en ce qui concerne le lot N° 4 qui contenait 1 ml de jus embryonnaire pur par ampoule et qui a été réhydraté à raison de 10 ml de diluant par ampoule (au lieu de 100).

Le volume de diluant correspondant à la réhydratation de trois ampoules par lot est mesuré à la pipette et déposé dans un tube de verre d'un volume suffisant.

Avec une seringue de 5 ml munie d'une aiguille de 80×12/10 mm, on prélève une partie du diluant pour réhydrater une ampoule. On effectue seize aspirations-refoulements successifs en évitant de faire mousser; l'ampoule est rincée une fois. On effectue la même opération sur les seconde et troisième ampoules et le vaccin reconstitué est laissé 25 minutes à la température du laboratoire

Tableau 1. Résultats des titrages

Température	Délai	Titre obtenu (log DL_{50}/0,03 ml intracérébrale; souris de 4-6 semaines)							
		Vaccin N° 1	Vaccin N° 2	Vaccin N° 3	Vaccin N° 4	Vaccin N° 5	Vaccin N° 6	Vaccin N° 7	Vaccin N° 8
−20°C	1 semaine	2,90	2,80	3,50	3,83	3,44	4,29	3,25	3,43
	2 semaines	3,0	2,89	4,12	3,67	3,28	4,28	3,24	2,80
	4 semaines	2,45	3,0	3,47	3,71	2,90	3,80	2,80	2,68
	6 semaines	3,09	2,32	3,64	3,23	2,50	3,64	2,74	3,0
	3 mois	2,27	2,00	3,70	3,53	3,0	4,20	2,89	3,16
	6 mois	2,68	2,73	3,56	3,20	3,0	3,49	3,0	2,78
+5°C	1 semaine	3,38	2,80	3,39	4,10	3,50	4,0	3,10	3,5
	2 semaines	2,82	2,67	3,57	3,44	3,34	3,68	2,71	3,27
	4 semaines	3,0	2,38	3,42	3,10	3,24	3,70	2,89	2,60
	6 semaines	2,85	1,88	3,43	2,90	2,56	3,64	2,50	3,0
	3 mois	2,32	2,37	2,89	3,15	3,10	3,74	2,41	2,89
	6 mois	3,0	2,81	3,0	3,32	2,64	3,45	2,18	2,63
+22°C	1 semaine	1,83	2,30	3,58	3,19	3,25	3,44	3,0	3,33
	2 semaines	1,56	2,62	3,34	3,10	2,80	3,87	2,71	2,87
	4 semaines	1,31	1,61	2,80	2,50	2,37	3,57	2,42	2,70
	6 semaines	2,13	1,50	2,50	2,70	2,33	2,73	1,81	1,67 [a]
	3 mois	1,75	1,43	2,43	2,19	1,40	2,65	2,0	2,50
	6 mois	2,22	— [b]	2,16	1,67	— [b]	2,42	1,20	2,34
+37°C	1 semaine	1,55	1,89	2,50	2,56	2,33	2,70	2,20	2,0
	2 semaines	2,0	1,62	2,50	2,64	1,57	2,50	1,20	2,20
	4 semaines	1,38	1,20	2,16	1,41	1,0	2,12	1	2,11
	6 semaines	1,28	1	1,43	1,35	0,5	1,34	1	1,24
	3 mois [b]	—	—	—	—	—	—	—	—
	6 mois [b]	—	—	—	—	—	—	—	—

[a] Une ampoule défectueuse sur les trois utilisées.
[b] Titrage non pratiqué.

(+28,5°C). Le vaccin reconstitué est considéré comme non dilué.

c) Dilutions: dilutions en série de 10 en 10 jusqu'à 10^{-5} en transférant 0,03 ml de dilution de virus (mesuré entre deux traits d'une pipette) dans 2,7 ml de diluant réparti en tubes à hémolyse.

On change de pipette à chaque dilution pour effectuer le mélange par seize aspirations-refoulements en évitant de faire mousser. Les quatre tubes correspondant aux dilutions à inoculer aux souris sont placés dans un bain glacé (eau et glace).

d) Inoculations: on utilise des seringues de 0,25 ml munies d'une aiguille de 10-5/10 mm à biseau court, la même seringue servant pour les quatre dilutions en commençant par la dilution la plus élevée. La seringue est rincée cinq fois dans chaque dilution dont on inocule 0,03 ml par voie intracérébrale à chaque souris, 9 souris étant utilisées pour chaque dilution. Les souris ne sont pas anesthésiées.

Après inoculation, les souris sont remises dans leur bocal, et observées pendant 21 jours. On n'a pas tenu compte, pour le calcul du titre, des souris mortes avant le 8e jour et de toutes les souris mortes par la suite sans avoir présenté de paralysies. Les souris paralysées mais non mortes le 21e jour ont été considérées comme survivantes.

Les titres ont été calculés par la méthode de Reed & Muench (1938) et exprimés en logarithme DL_{50}/0,03 ml.

Au cours d'une même manipulation, on a éprouvé tous les vaccins à une même température. On a pu étudier ainsi une température le matin et une l'après-midi, deux jours de suite. L'emploi du temps a été minuté de façon que la durée de la manipulation soit identique pour chaque vaccin:

réhydratation: 10 minutes,
diffusion : 25 minutes,
dilution : 5 minutes,
inoculation : 10 minutes.

En général, on n'a pas poursuivi l'étude d'un vaccin dont le titre s'était montré inférieur au minimum exigé par le groupe d'étude des normes relatives au vaccin antiamaril (1959) de 1000 DL_{50} souris par dose vaccinale, soit 1,78 pour le log DL_{50}/0,03 ml.

RÉSULTATS

Les résultats des titrages sont représentés dans les tableaux 1, 2 et 3 et sur les figures 1, 2 et 3.

Tableau 2. Influence de la durée de conservation sur la moyenne des titres obtenus à —20°C et +5°C

Durée de conservation	Vaccin N° 1		Vaccin N° 2		Vaccin N° 3		Vaccin N° 4		Vaccin N° 5		Vaccin N° 6		Vaccin N° 7		Vaccin N° 8	
	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)	Moyenne log DL_{50}	Variation[a] (%)
1 semaine	3,14	100,0	2,80	100,0	3,45	100,0	3,97	100,0	3,47	100,0	4,15	100,0	3,18	100,0	3,47	100,0
2 semaines	2,91	92,7	2,78	99,3	3,85	111,6	3,56	89,7	3,31	95,4	4,48	108,0	2,98	93,7	3,04	87,6
4 semaines	2,73	86,9	2,69	96,1	3,45	100,0	3,41	85,9	3,07	88,5	3,75	90,4	2,85	89,6	2,64	76,1
6 semaines	2,97	94,6	2,10	75,0	3,54	102,6	3,07	77,3	2,53	72,9	3,64	87,7	2,62	82,4	3,00	86,5
3 mois	2,30	73,2	2,59	92,5	3,30	95,7	3,34	84,1	3,05	87,9	3,97	95,7	2,65	83,3	3,03	87,3
6 mois	2,84	90,4	2,77	98,9	3,28	95,1	3,26	82,1	2,82	81,3	3,47	83,6	2,59	81,4	2,71	78,1

[a] Par rapport au résultat moyen obtenu après 1 semaine de conservation.

Tableau 3. Titres en fonction de la température et de la durée de conservation (valeurs moyennes pour les vaccins N°s 1 à 8)

Température de conservation	Durée de conservation					
	1 semaine	2 semaines	4 semaines	6 semaines	3 mois	6 mois
−20°C	3,43	3,41	3,10	3,02	3,09	3,05
+ 5°C	3,47	3,18	3,04	2,84	2,86	2,88
+22°C	2,86	2,86	2,41	2,28	2,04	—
+37°C	2,16	2,02	1,48	—	—	—

Résistance à −20°C et à +5°C

D'une façon générale, on voit que les courbes de stabilité à −20°C et à +5°C sont très proches l'une de l'autre. La perte du titre est continue jusqu'à la 6e semaine après quoi s'amorce un plateau qui se prolonge au moins jusqu'au 6e mois, la perte totale entre 1 semaine et 6 mois n'atteignant pas le demi-logarithme décimal à −20°C et avoisinant 0,6 logarithme décimal à +5°C.

Résistance à +22°C

Si l'on considère, pour chaque préparation, comme titre de départ la moyenne des titres obtenus après une semaine à −20°C et +5°C, on constate, dès la 1re semaine, une chute importante du titre pour la totalité des vaccins sauf un (No 3). Cette baisse va de 0,14 à 1,3 logarithme décimal. La moyenne de perte du titre pour l'ensemble des vaccins est de 0,59 logarithme, soit près de 75%. La baisse est insensible entre la 1re et la 2e semaine après quoi s'amorce une nouvelle chute avec perte de 90% du titre initial en fin de la 4e semaine. Au bout de 3 mois, cinq préparations ont encore un titre supérieur au minimum exigé, les baisses de titre allant de 0,97 à 1,78 logarithme selon les préparations vaccinales.

Résistance à +37°C

Si l'on se réfère de nouveau, comme titre de départ, à la moyenne des titres obtenus après une semaine à −20°C et à +5°C, la détérioration du vaccin est très rapide à +37°C puisque, après une semaine, la perte moyenne du titre pour toutes les préparations vaccinales atteint 1,29 logarithme. Trois préparations seulement ont un titre supérieur au minimum après la 4e semaine, les baisses de titre allant de 1,29 à 2,03 logarithmes.

DISCUSSION

On peut discuter la méthode employée et les résultats obtenus.

En ce qui concerne la méthode, il est évident qu'il s'agissait là d'une étude préliminaire tendant à dégager quelques notions concernant la stabilité de différentes préparations de vaccin antiamaril 17 D, notions pouvant servir de base à une étude plus poussée d'une ou deux préparations vaccinales.

Etant donné le nombre de préparations étudiées, nous n'avons pratiqué pour chaque intervalle de temps et chaque température qu'un seul titrage sur trois ampoules de chaque préparation. Il aurait été statistiquement préférable de pouvoir multiplier les essais pour chaque titrage.

D'autre part, ces essais auraient dû être faits dans différents laboratoires simultanément.

Quant aux résultats, on peut dire qu'il n'existe pas encore une préparation de vaccin antiamaril 17 D suffisamment stable pour pouvoir servir de vaccin de référence.

L'examen des courbes établies pour chaque vaccin amène quelques remarques: le titre final (à 6 mois) est très proche du titre initial (à une semaine) pour les vaccins N°s 1, 2 et 3 et c'est pour ces mêmes préparations que les valeurs sont les plus faibles à 6 semaines et à 3 mois. On peut noter qu'il existe un certain parallélisme entre les épreuves dans la variation de plusieurs facteurs communs. Il semble qu'il faille incriminer la sensibilité des souris. En effet, ces accidents ont coïncidé avec des difficultés dans notre élevage de souris au moment des grandes chaleurs de l'hivernage (août-septembre).

Cependant, les résultats, quoique très imparfaits, montrent que pratiquement toutes les préparations vaccinales supportent très bien une température de

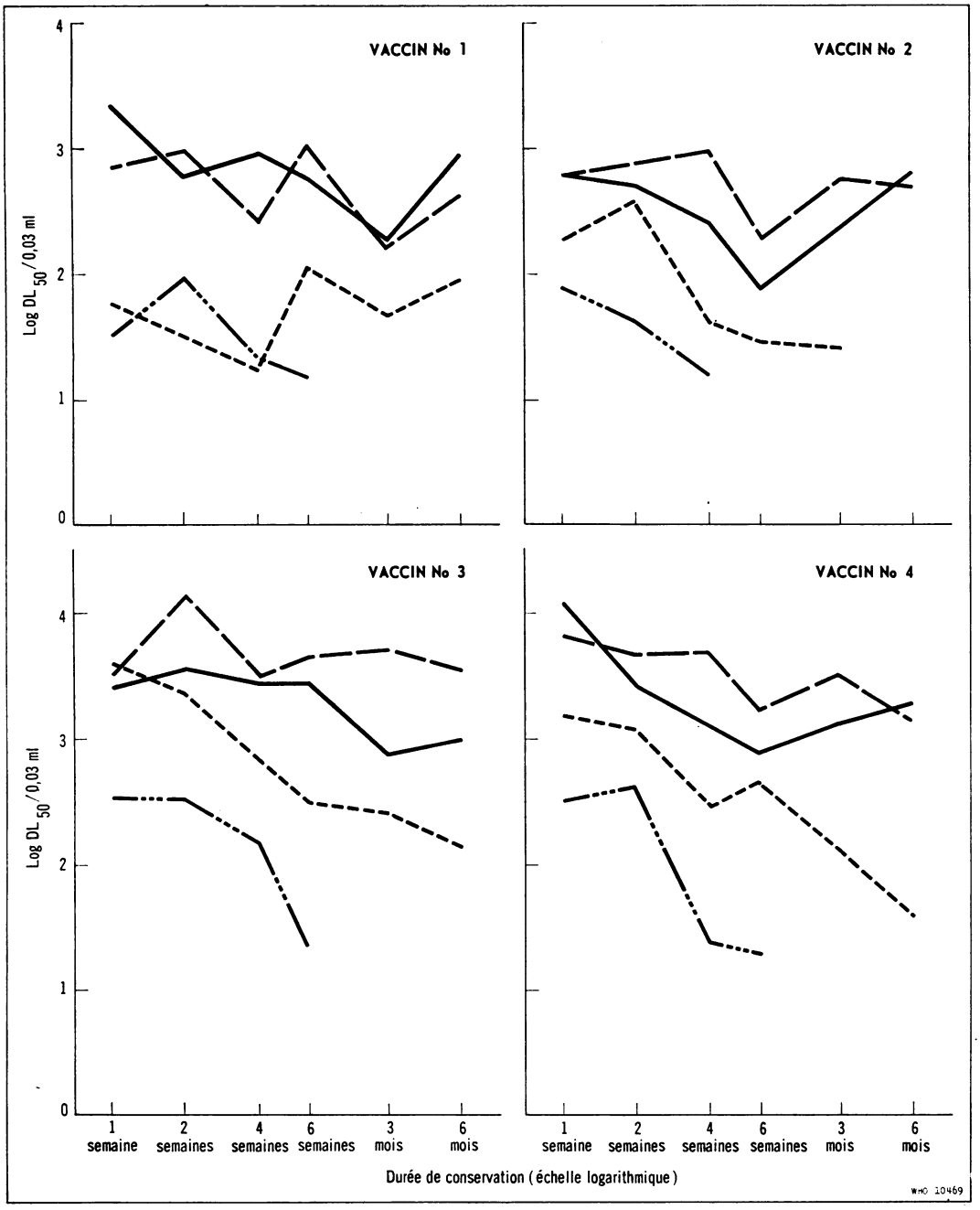

Fig. 1. Effet de la durée et de la température de conservation du vaccin sur le titre (vaccins Nos 1 à 4).

—— —— −20°C
———— + 5°C
- - - - - - +22°C
—·-·— +37°C

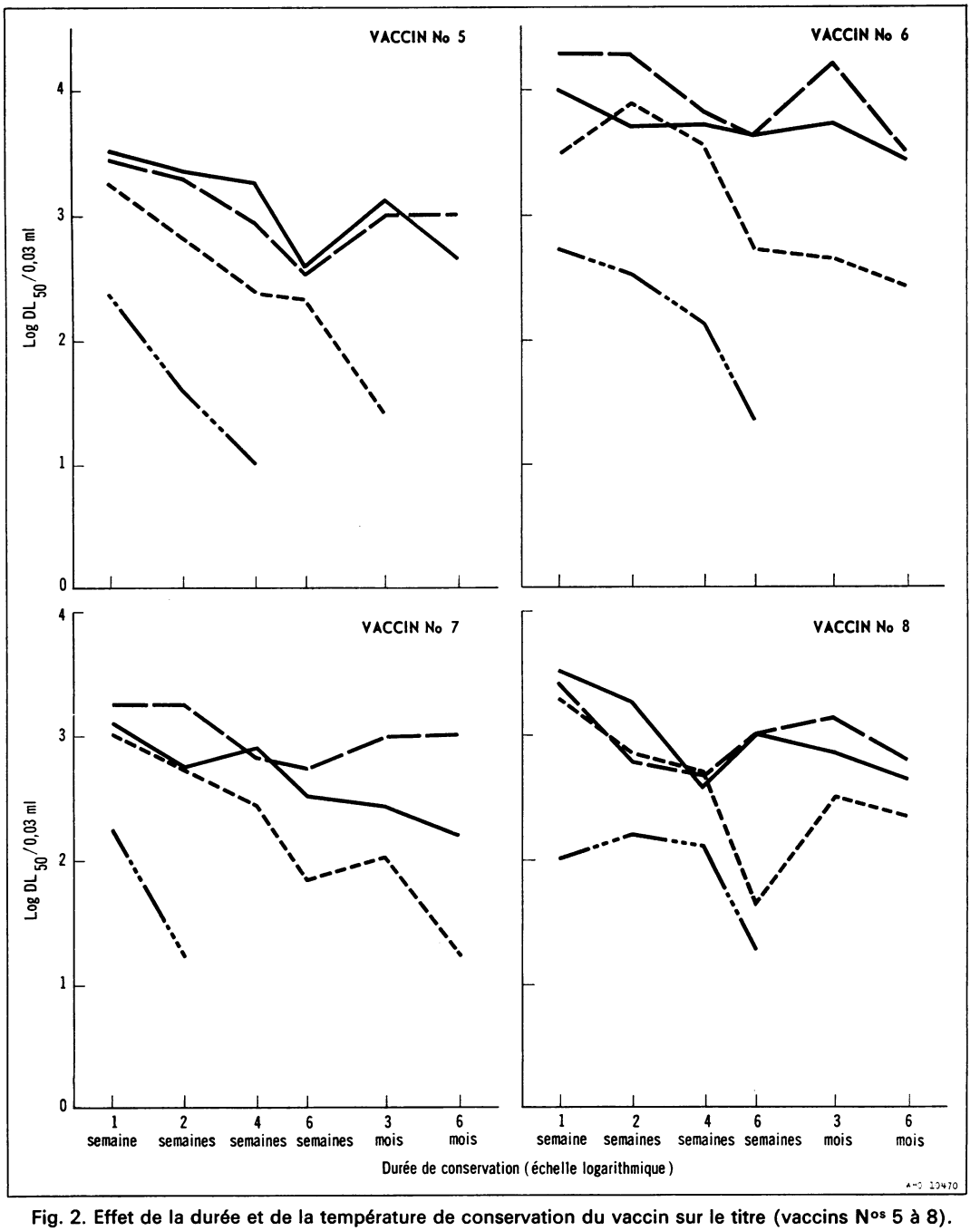

Fig. 2. Effet de la durée et de la température de conservation du vaccin sur le titre (vaccins Nos 5 à 8).

—— —— —— −20°C
———— + 5°C
- - - - - - +22°C
—·—·— +37°C

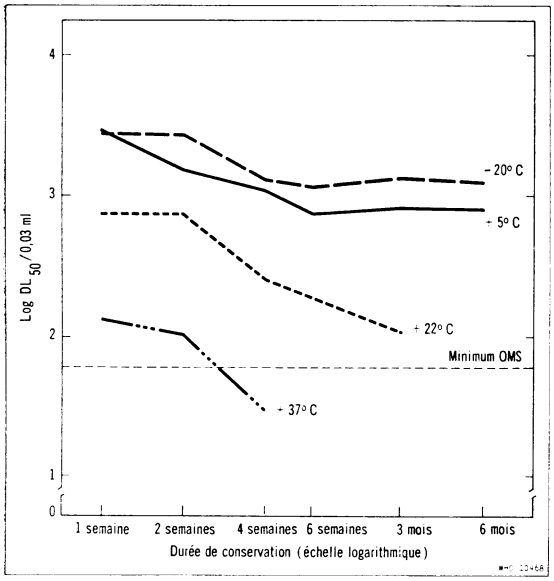

Fig. 3. Effet de la durée et de la température de conservation du vaccin sur le titre (moyenne des huit préparations).

+5°C pendant 4 semaines et la plupart pendant 6 mois. Même à +22°C, la plupart n'accusent qu'une légère baisse du titre après 2 semaines.

Si l'on établit, pour chaque température, une courbe moyenne des huit préparations vaccinales, on obtient des courbes qui donnent une idée générale de la thermostabilité du vaccin 17 D. On voit qu'avec un titre au départ d'environ 3,5 logarithmes DL_{50}/0,03 ml le vaccin peut être conservé à +5°C pendant au moins 6 mois, qu'il est utilisable après 3 mois à +22°C et après 2 semaines à +37°C (fig. 3). Ceci est très encourageant pour l'utilisation dans les campagnes de vaccination en pays tropicaux. Il suffit de maintenir le vaccin lyophilisé dans des récipients isothermes contenant de la glace.

Comme nous l'avons signalé, il ne s'agit là que d'une étude préliminaire. D'autres études sont nécessaires pour l'obtention de vaccins de plus en plus stables, par modification des méthodes de lyophilisation ou par adjonction de substances protectrices.

On a souvent dit que plus un produit biologique a une humidité résiduelle basse (moins de 1 %), plus il résistera à des températures élevées. Dans l'étude que nous avons entreprise, nous n'avons pu relier la thermostabilité à l'humidité résiduelle, le taux de celle-ci étant inconnu pour la plupart des vaccins étudiés. Mais il est concevable que l'amélioration des techniques de lyophilisation puisse entraîner une amélioration de la résistance du vaccin 17 D à des températures élevées.

L'adjonction de substances protectrices est utilisée depuis longtemps (Polge et al., 1949) pour protéger les produits biologiques lors de la congélation. Nous basant sur des travaux antérieurs (Chatelain, 1963), nous avons essayé le glutamate de sodium à une concentration de 0,2 % dans le vaccin prêt à l'emploi, soit 2 % lors de la lyophilisation. Nous n'avons pas obtenu de résultats significativement supérieurs. Il est possible que d'autres concentrations de glutamate de sodium ou que d'autres substances soient plus efficaces.

Parallèlement aux essais d'amélioration des conditions de lyophilisation du vaccin 17 D, il nous semble important d'étudier plus en détail la dégradation du vaccin antiamaril 17 D en fonction de températures élevées. Cette étude pourrait se faire sur une ou deux préparations vaccinales soumises à une température intermédiaire entre +22°C et +37°C (+30°C à +32°C), avec titrage tous les jours, ce qui permettrait d'estimer le temps nécessaire à la perte d'un logarithme de titre par rapport à des ampoules conservées constamment à −20°C.

CONCLUSION

Des études préliminaires sur la conservation de huit préparations de vaccin antiamaril 17 D soumises à différentes températures ont permis de dégager certains faits: le vaccin lyophilisé se conserve très bien à l'état sec à +5°C pendant au moins 6 mois mais se dégrade très rapidement à +37°C. L'adjonction de glutamate de sodium n'a pas apporté d'amélioration notable à la thermostabilité. Parallèlement aux tentatives d'amélioration des conditions de lyophilisation, il convient d'étudier maintenant, d'une façon plus précise, la dégradation du vaccin antiamaril 17 D soumis à une température élevée.

SUMMARY

A STUDY OF THE HEAT STABILITY OF EIGHT SAMPLES OF YELLOW-FEVER VACCINE COMING FROM VARIOUS COUNTRIES

The precautions that must be taken to preserve anti-yellow-fever vaccine are sometimes difficult for vaccination teams working in certain tropical areas to apply when communications are very slow and refrigeration facilities are inadequate. The present standards for yellow-fever vaccine provide for the storage of vaccine at a temperature below 4°C for 3 months or longer, or under exceptional circumstances, at a higher temperature for a short time. It was therefore considered important to study the stability of these vaccines at different temperatures, and 8 samples prepared in seven production laboratories in seven different countries were tested.

The vaccine samples were divided into lots and kept at the following temperatures: −20°C, 5°C, 22°C, 37°C. The lots were titrated in 4-week-old Swiss albino mice after periods of 1, 2, 4, and 6 weeks, then 3 and 6 months. The strain of mice was known to be sensitive to arboviruses and the mice were inoculated intracerebrally without anaesthesia; 9 mice were used for each vaccine dilution. After being inoculated, the mice were distributed to cages at random. The inoculation manipulations were carefully timed so that each vaccine lot was dealt with in the same time, all dilutions and inoculations being made by the same person who was very experienced in this work. The diluent employed was a phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.75% of bovine albumin. The mice were observed for 21 days, all deaths after the eighth day being noted; mice found to be paralysed on the 21st day were considered as survivors. The vaccines were given code numbers and their origin was unknown to the experimenter.

The mean titre remained above or equal to 3 log LD_{50}/0.03 ml (i.e., 16 596 LD_{50} per dose) for 6 months at storage temperatures of −20°C and 5°C. For three vaccines (No. 3, 4, 6), the titres were higher than 3.5 log LD_{50}/0.03 ml (i.e., 52 481 LD_{50} per dose at the end of 6 months. Three other vaccines (No. 5, 7, 8) closely followed the mean value.

At a temperature of 22°C all the vaccines retained a mean value above 1 659 LD_{50} per dose for 3 months but the individual variations noted in the ampoules could lead to the occurrence of titres below the mean. However, storage at this temperature for only 2 weeks should offer an adequate safety factor. The minimum activity required by the WHO specifications is 1 000 LD_{50} per dose.

The three best vaccines (No. 3, 4, 6) withstood storage for a week, and even two weeks, at a temperature of 37°C. The titres of the five other vaccines fell very rapidly after the first week. A vaccine lot prepared with the addition of sodium glutamate (0.2% in the diluted vaccine) did not produce significantly better results than the rest but it is possible that different concentrations of sodium glutamate, or the addition of other substances, might be more effective.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chatelain, R. (1963) *Ann. Inst. Pasteur*, **105**, 111.

Groupe d'étude des normes relatives au vaccin antiamaril et des normes relatives au vaccin anticholérique (1959) *Rapport* (*Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, N° 179)

Polge, C., Smith, A. U. & Parkes, A. S. (1949) *Nature (Lond.)*, **164**, 666

Reed, L. J. & Muench, J. (1938) *Amer. J. Hyg.*, **27**, 493

Annexe

LABORATOIRES PRODUCTEURS DES VACCINS

Commonwealth Serum Laboratories, Parkville, Victoria, Australie

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brésil

Institut Pasteur de Paris, Paris, France

Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal

Instituut voor Tropische Hygiene, Amsterdam, Pays-Bas

The National Drug Company, Philadelphia, Pa., Etats-Unis d'Amérique

The Wellcome Research Laboratory, Beckenham, Kent, Angleterre