



WORLD HEALTH ORGANIZATION  
GENEVA

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ  
GENÈVE

# WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD

## RELEVÉ ÉPIDÉMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE

*Epidemiological Surveillance of Communicable Diseases*  
Telegraphic Address: EPIDNATIONS GENEVA Telex 27821

*Service de la Surveillance épidémiologique des Maladies transmissibles*  
Adresse télégraphique: EPIDNATIONS GENÈVE Telex 27821

Automatic Telex Reply Service  
Telex 28150 Geneva with ZCZC and ENGL for a reply in English

Service automatique de réponse  
Télex 28150 Genève suivi de ZCZC et FRAN pour une réponse en français

3 JUNE 1977

52<sup>nd</sup> YEAR — 52<sup>e</sup> ANNÉE

3 JUIN 1977

### VIRAL HAEMORRHAGIC FEVER

*An account of two outbreaks of haemorrhagic fever due to Ebola virus was given in the previous issue of the Weekly Epidemiological Record<sup>1</sup> together with extracts from a report<sup>2</sup> of a consultative group which reviewed the experience acquired during the outbreaks. The following recommendations arose from this consultation.*

#### Planning and Coordination of Measures

An essential factor in planning for future outbreaks of diseases of international significance (such as Marburg virus-like disease) is the development of mechanisms for identification of cases and/or outbreaks as early as possible and for prompt reporting to local and national health authorities and WHO. Delays in recognition and reporting of such outbreaks result in continued transmission of the disease and prolong the initiation of the clinical, epidemiological, and laboratory investigations which are essential to provide the necessary data for formulation of appropriate methods of prevention and control. Since diseases such as Lassa, Marburg and the other viral haemorrhagic fevers are not currently required to be reported to WHO, it is urged that reporting of these diseases be made mandatory and that a specific category for reporting these diseases requiring special consideration to WHO be created. Health administrations of neighbouring countries should also exchange reports and keep lines of communication open.

The necessity of having a system for widespread dissemination of information in the event of such outbreaks was underlined. Such a system should serve the purpose of informing the public through the news media and also providing appropriate clinical, epidemiological, and other information to medical and hospital personnel, so that a basic understanding of the nature of the disease in progress, the means of spread and appropriate measures for prevention and control are understood by all.

WHO should serve as the focus for coordination of international activities related to the study and control of such outbreaks of disease. These outbreaks often require coordination of efforts by numerous countries and the resources available in these countries must be utilized in the most efficient and logical fashion.

<sup>1</sup> No. 21, 1977, pp. 177-180.

<sup>2</sup> The full report or a reprint of the two articles on this subject from the *Weekly Epidemiological Record* is available from the Virus Diseases Unit, WHO, Geneva.

### FIÈVRE HÉMORRAGIQUE D'ORIGINE VIRALE

*Dans le précédent numéro du Relevé épidémiologique hebdomadaire,<sup>1</sup> on trouve une description de deux poussées épidémiques de fièvre hémorragique due au virus Ebola ainsi que des extraits du rapport<sup>2</sup> d'un groupe consultatif qui a examiné l'expérience acquise au cours de ces événements. Les recommandations ci-après découlent de cette consultation.*

#### Planification et coordination des mesures

La mise au point de mécanismes permettant d'identifier dès que possible les cas et/ou les poussées épidémiques et de faire promptement rapport aux autorités sanitaires locales et nationales ainsi qu'à l'OMS est un élément essentiel des plans qui seront faits pour se prémunir contre de futures poussées épidémiques de maladies revêtant une importance internationale (telle que la maladie à virus de type Marburg). En effet, si l'on tarde à les déceler et à les notifier, on prolongera la transmission de la maladie et l'on retardera la mise en route des recherches cliniques, épidémiologiques et de laboratoire; or, celles-ci sont essentielles pour obtenir les données nécessaires à la formulation de méthodes de prévention et de lutte appropriées. Les maladies de Lassa et de Marburg ainsi que les autres fièvres hémorragiques d'origine virale n'étant actuellement pas soumises à la déclaration obligatoire, il serait urgent qu'elles le soient et que l'on crée une catégorie spéciale pour notifier à l'OMS les maladies qui nécessitent un examen particulier. Les administrations sanitaires des pays voisins devraient aussi échanger des rapports et garder les canaux de communication ouverts.

On a souligné la nécessité d'instaurer un système permettant une large diffusion des informations au moment des épidémies. Ce système devrait permettre de renseigner le public par le biais des organes d'information et fournirait aussi au personnel médical et hospitalier des données appropriées — cliniques, épidémiologiques et autres — afin que tous soient à même de comprendre, pour l'essentiel, la nature de la maladie en évolution, ses moyens de propagation et les mesures propres à la prévenir et à l'endiguer.

L'OMS doit servir de centre de coordination pour les activités internationales liées à l'étude et à l'endiguement de ces épidémies. Ces poussées obligent souvent à coordonner les efforts de nombreux pays et les ressources dont ceux-ci disposent doivent être utilisées de la façon la plus efficace et la plus logique.

<sup>1</sup> N° 21, 1977, pp. 177-180.

<sup>2</sup> Le rapport complet ou un tiré à part des deux articles publiés sur ce sujet dans le *Relevé épidémiologique hebdomadaire* peuvent être obtenus auprès du service des Maladies à Virus, OMS, Genève.

Epidemiological notes contained in this number:

Viral Haemorrhagic Fever.

List of Newly Infected Areas, p. 192.

Informations épidémiologiques contenues dans ce numéro:

Fièvre hémorragique d'origine virale.

Liste des zones nouvellement infectées, p. 192.

A prime function of WHO would be to provide international coordination of requests for assistance from the country experiencing the outbreak as well as identifying the resources necessary to combat the epidemic and from which countries these would be derived. Resources generally fall within the categories of personnel, equipment and supplies, and funds. Planning on the international scale for such outbreaks would include the development of check lists for each of these headings. WHO could then serve as the focus for forming an international team to respond to a request for assistance by an affected country, or could serve to facilitate and/or coordinate bilateral assistance arrangements which could take place directly between an affected country and a resource country. With respect to personnel, it was felt that maintaining lists of institutions and their individual personal resources might be more advantageous than just preparing a list of individual persons since the identification of institutions would essentially serve to identify teams of experts who already know how to work well together. With respect to equipment and supplies, stockpiling should be discouraged since outdating occurs at a rather rapid rate, making this an expensive procedure. Consideration could be given to contracting with companies to provide supplies and equipment when they are needed. WHO should investigate the possibility of maintaining a disaster or a contingency fund which might be used in the event of occurrences such as the outbreaks of haemorrhagic fever in the Sudan and Zaire. Possible coordination of contingency funding with the International Red Cross and the office of the United Nations Disaster Relief Coordinator should also be investigated.

Three of the major problems to be faced when combatting outbreaks of such disease are those of communication, transport and dissemination of information. Such complicated problems and arrangements are best handled by a skilled and experienced expert in logistics. WHO should, therefore, study the problem of identifying and training persons in coordination, administration and logistics who could be called upon to coordinate such activities at a local and/or national level in an emergency. Furthermore, such persons should be aware of the importance of working with persons in key positions inside the affected country because of their familiarity with the local and national scene.

The importance of early disclosure of disease activity, prompt reporting of such episodes to the national and international level as soon as possible was emphasized. In anticipation of the occurrence of future episodes, WHO should prepare specific and detailed operational plans for undertaking surveillance, epidemiological studies, laboratory support, logistics and communications, dissemination of the information and identification and efficient utilization of resources existing in Member countries which might be called upon in the future.

#### Clinical and Epidemiological Investigations

(a) *Rapid Diagnosis of the Cause of the Outbreak.* Three types of specimens should be collected:

- Acute phase whole blood obtained from patients, who have been sick for less than seven days. Blood should be collected in sterile receptacles and despatched in liquid nitrogen (this requires special plastic screw tubes), dry ice or kept chilled with refrigerant packs (cold dogs). The separation of sera from blood clots is not recommended unless facilities are available to protect laboratory workers from infectious aerosols.
- Convalescent sera from patients at least 14 days after disease onset. Whereas paired samples from the same patient are desirable, single convalescent sera are valuable and should be looked for. Sera should be separated from blood clots and sent frozen as above.
- Liver specimens taken by post-mortem with a biopsy needle (biopsy from sick patients is contra-indicated as it may cause bleeding of the liver) should be divided in two: one being placed in 10% buffered formalin and the other handled as an acute blood specimen.

L'une des principales fonctions de l'OMS consisterait à coordonner, sur le plan international, les demandes d'aide adressées par les pays où sévit l'épidémie ainsi qu'à déterminer, d'une part, les ressources nécessaires pour combattre la maladie et, d'autre part, les pays dont celles-ci pourraient provenir. Ces ressources se classent généralement dans les rubriques « personnel », « matériel et fournitures », et « fonds ». Pour se prémunir contre ces épidémies à l'échelle mondiale, il faudrait prévoir notamment des listes de référence correspondant à chacune de ces rubriques. L'OMS pourrait alors servir de point central pour la mise sur pied d'une équipe internationale chargée de répondre aux demandes d'assistance émanant des pays affectés ou contribuer à faciliter et/ou coordonner les accords d'assistance bilatéraux qui pourraient être conclus directement entre un pays affecté et un pays fournisseur de ressources. En ce qui concerne le personnel, on a estimé qu'il serait plus avantageux d'établir et de tenir à jour des listes d'institutions et de leurs ressources en personnel au lieu de préparer simplement une liste de personnes car, dans les institutions, on trouve des équipes d'experts sachant déjà travailler efficacement ensemble. En ce qui concerne le matériel et les fournitures, il faut décourager le stockage qui est une opération coûteuse, car ces articles sont assez rapidement périmés. On pourrait envisager de passer des contrats avec des sociétés qui livreraient fournitures et matériels au moment où ils sont nécessaires. L'OMS devrait étudier la possibilité de constituer un fonds d'aide en cas de catastrophe ou fonds pour imprévus qui serait utilisé lorsque surviendrait un événement tel que les flambées de fièvre hémorragique du Soudan et du Zaïre. On pourrait également étudier les moyens de coordonner ce fonds pour imprévus avec la Croix-Rouge internationale et le Bureau du Coordonnateur des Nations Unies des secours en cas de catastrophe.

Trois des principaux problèmes auxquels on se heurte dans la lutte contre les épidémies de ces maladies concernent la communication, les transports et la diffusion des informations. Un expert en logistique compétent et expérimenté est, mieux que quiconque, capable de régler des problèmes et dispositions aussi complexes. L'OMS devrait donc examiner comment on pourrait choisir et entraîner à la coordination, à l'administration et à la logistique des personnes qui seraient appelées en cas d'urgence à coordonner de telles activités aux niveaux local et/ou national. Ces personnes devront en outre comprendre l'importance d'une collaboration avec des personnalités occupant une position clé dans le pays affecté en raison de leur connaissance des conditions locales et nationales.

On a fait observer qu'il y avait lieu de signaler rapidement l'activité de la maladie et de notifier promptement ces épisodes aux échelons national et international. En prévision de futurs épisodes, l'OMS devrait préparer des plans d'opérations précis et détaillés portant sur la surveillance, les études épidémiologiques, les services de laboratoire, la logistique et les communications, la diffusion de l'information et, enfin, les moyens de déterminer et d'utiliser efficacement les ressources existant dans les pays Membres auxquels on pourrait faire appel à l'avenir.

#### Études cliniques et épidémiologiques

a) *Diagnostic rapide de la cause de l'épidémie.* Il y a lieu de recueillir trois types de spécimens:

- Le sang total de la phase aiguë chez des sujets ayant été malades pendant moins de sept jours. Ce sang sera recueilli dans des récipients stériles et expédié dans de l'azote liquide (il faut à cet effet des tubes de plastique spéciaux avec bouchon à vis) ou dans de la glace carbonique ou encore réfrigéré au moyen d'accumulateurs de froid (tampons congelés). Il n'est pas recommandé de séparer le sérum des caillots de sang à moins que l'on ait les moyens de protéger les travailleurs de laboratoire contre les aérosols infectieux.
- Des sérums de sujets convalescents prélevés au moins 14 jours après le début de la maladie. Il serait souhaitable d'avoir des échantillons appariés provenant du même sujet, mais les échantillons uniques sont utiles et doivent être recherchés. Il faut séparer les sérums des caillots de sang et les expédier sous une forme congelée, comme il est indiqué plus haut.
- Des spécimens de foie prélevés sur les cadavres à l'aide d'une aiguille à biopsie (la biopsie est contre-indiquée chez les malades car elle peut entraîner une hémorragie du foie). Ces spécimens sont divisés en deux parties: l'une est placée dans de la formaline en solution tampon à 10% et la deuxième est traitée comme un spécimen de sang de la phase aiguë.

Relevant information must be included with specimens: locality, name of patient, age, sex, date of sampling, date of onset of the disease, summary of clinical findings and pertinent epidemiological information such as number and history of similar cases, history of contact and occurrence of disease in hospital staff. Specimens for shipment to laboratories abroad must be packed in compliance with international regulations.<sup>1</sup> They must be sent to high security laboratories<sup>2</sup> who should be informed by cable of the airwaybill number, flight number (connecting flights if necessary) and the estimated time of arrival. A copy of the cable should be sent to WHO, attention Chief, Virus Diseases Unit.

At this stage, the differential diagnosis has to be made rapidly with salmonellosis which is the major cause of an acute disease simulating a viral haemorrhagic fever. Treatment with chloroquine, tetracycline or chloromycetine will allow a differential diagnosis by eliminating the possibility of malaria and bacterial infections. Supplies of aspirin, multivitamins and iron tablets may prove useful to obtain cooperation from the population.

Generally it is not feasible to establish viral diagnostic facilities in the field at the site of an outbreak. However, if electricity is available certain advanced techniques can be utilized as has been demonstrated in Zaire. Antibodies can be tested by the immunofluorescence technique. It should also be possible, at least theoretically, to detect viral antigens by IF tests in cells taken from acutely ill patients such as: leukocytes, bone marrow, throat and conjunctival swabs and urinary sediments.

(b) *Further Clinical Studies.* Much basic clinical information is still needed concerning viral haemorrhagic fevers. Serial observations should be made on all hospitalized patients and recorded on standardized forms.

Serial specimens should be titrated for their content of virus or antibodies. Blood, throat swabs, urine, faeces, conjunctival swabs and vomitus should be obtained three times a week until three days after termination of the disease and kept at  $-60^{\circ}\text{C}$  for virus assay. A series of at least six patients should be studied. It would also be desirable to obtain three specimens of semen or cervical swabs at weekly intervals during convalescence. Serum specimens for antibody titrations should be collected at 10, 14 and 30 days from onset of disease. Long-term serial samples from a few patients are desirable in order to document the pattern of antibody persistence.

Both limited facilities and the significant bio-hazard involved tend to restrict the variety of tests which can be carried out in the field during outbreaks. However, total and differential leukocyte counts, as well as simple haematological measurements are possible and are indicated. More sophisticated tests depend on availability of equipment. Serum samples should be collected twice weekly and frozen for testing elsewhere if a centrifuge filled with sealed carriers is not locally available.

It is necessary to obtain more information from complete autopsies of a few patients. This should, however, only be performed under complete safety conditions.

<sup>1</sup> A WHO Guide to the Collection and Transport of Virological Specimens can be ordered from Distribution and Sales, WHO, 1211 Geneva 27.

<sup>2</sup> The following laboratories have indicated that they have suitable biocontainment facilities:

Head of Special Pathogens Unit  
Microbiological Research Establishment  
Porton Down, Salisbury  
Wiltshire SP4 0JG, England  
Institut de Médecine tropicale  
Prince Léopold  
Nationaalestraat 155  
Antwerp B-2000, Belgium

Chief, Special Pathogens Branch  
Virology Division  
Center for Disease Control  
Atlanta, Georgia 30333, USA  
(Shipments to CDC should be addressed to Officer in Charge, United States Public Health Service, Room 2339, International Arrivals Building, Kennedy International Airport, Jamaica, NY 11430)

Les spécimens doivent être accompagnés d'informations pertinentes: localité, nom, âge et sexe du malade, date d'échantillonnage, date d'apparition de la maladie, résumé des observations cliniques et données épidémiologiques appropriées telles que le nombre et l'évolution de cas semblables, les contacts éventuels et l'incidence de la maladie chez le personnel hospitalier. Les spécimens destinés à des laboratoires étrangers doivent être emballés conformément aux règlements internationaux.<sup>1</sup> Ils doivent être adressés à des laboratoires de haute sécurité<sup>2</sup> qui seront informés par télégramme du numéro de la lettre de transport aérien, du numéro de vol (et des vols de correspondance, si nécessaire) et de l'heure prévue d'arrivée. Une copie du télégramme sera adressée à l'OMS, à l'attention du Chef de l'Unité des Maladies à Virus.

A ce stade, on doit poser rapidement le diagnostic différentiel avec une salmonellose, qui est la principale cause d'une maladie aiguë simulant une fièvre hémorragique d'origine virale. Le traitement à la chloroquine, à la tétracycline ou à la chloromycétine permettra un diagnostic différentiel en éliminant l'éventualité du paludisme et d'infections bactériennes. Des distributions d'aspirine, de multi-vitamines et de comprimés de fer pourraient se révéler utiles pour obtenir la coopération de la population.

La mise en place d'installations pour le diagnostic virologique n'est généralement pas réalisable sur le terrain, à l'endroit même où s'est déclarée l'épidémie. Toutefois, si l'on dispose d'électricité, certaines techniques avancées sont utilisables comme on l'a montré au Zaïre. Les anticorps peuvent être titrés par la technique de l'immunofluorescence et il devrait être aussi possible, du moins en théorie, de détecter des antigènes viraux par l'immunofluorescence dans des cellules prélevées sur des malades au stade aigu, par exemple dans les leucocytes, la moëlle osseuse, des prélèvements de la gorge et de la conjonctive et des sédiments urinaires.

(b) *Etudes cliniques plus poussées.* Il demeure nécessaire d'obtenir nombre d'informations cliniques de base au sujet des fièvres hémorragiques d'origine virale. Des observations en série doivent être faites sur tous les malades hospitalisés et être enregistrées sur des formulaires normalisés.

On fera alors le titrage de spécimens successifs pour déterminer leur teneur en virus ou en anticorps. A cet effet, il faut recueillir, trois fois par semaine et jusqu'au troisième jour suivant la fin de la maladie, du sang, des prélèvements de gorge, des urines, des selles, des prélèvements de conjonctive et des vomissures et les maintenir à une température de  $-60^{\circ}\text{C}$  pour le titrage virologique. On étudiera un groupe d'au moins six malades et il serait souhaitable d'obtenir trois spécimens de sperme ou de mucus cervical à des intervalles d'une semaine pendant la convalescence. Les spécimens de sérum prélevés pour le titrage des anticorps doivent être recueillis le dixième, le quatorzième et le trentième jours suivant l'apparition de la maladie. Il serait souhaitable de prélever sur de plus longues périodes des échantillons successifs chez un petit nombre de malades afin d'obtenir des précisions sur la persistance des anticorps.

L'insuffisance des installations et les risques biologiques considérables que comporte cette opération tendent à restreindre la variété des épreuves que l'on peut effectuer sur le terrain au cours des épidémies. Toutefois, les numérations leucocytaires totales et différentielles, ainsi que les mesures hématologiques simples sont possibles et conseillées. Selon le matériel disponible, on peut procéder à des épreuves plus poussées. Il convient de recueillir deux fois par semaine des échantillons de sérum qui seront congelés pour être éprouvés ailleurs si l'on ne dispose pas sur place d'une centrifugeuse remplie de porte-tubes scellés.

Il importe d'obtenir des informations plus poussées en pratiquant sur un petit nombre de malades des autopsies complètes. Ces opérations ne doivent toutefois se dérouler que dans des conditions de parfaite sécurité.

<sup>1</sup> Un Guide OMS pour la collecte et le transport des spécimens virologiques peut être commandé au service de Distribution et de Vente, OMS, 1211 Genève 27.

<sup>2</sup> Les laboratoires ci-après ont fait connaître qu'ils disposaient d'installations appropriées pour le bio-confinement:

Head of Special Pathogens Unit  
Microbiological Research Establishment  
Porton Down  
Salisbury, Wiltshire SP4 0JG  
Angleterre  
Institut de Médecine tropicale  
Prince Léopold  
Nationaalestraat 155  
Antwerp B-2000  
Belgique

Chief, Special Pathogens Branch  
Virology Division,  
Center for Disease Control  
Atlanta, Georgia 30333  
Etats-Unis d'Amérique  
(Les envois destinés au CDC doivent être adressés comme suit: Officer in Charge, United States Public Health Service, Room 2339, International Arrivals Building, Kennedy International Airport, Jamaica, NY 11430)

(c) *Safety Measures.* It is important to limit as far as possible the number of persons at risk during an outbreak. These persons should be vaccinated against yellow fever, given malaria prophylactic treatment and should receive gamma globulin to prevent viral hepatitis. Personnel should be protected from infection through skin abrasions, conjunctivae or mouth and should wear: gloves, gowns, caps, boots or over-shoes and masks. Goggles and respirators to cover eyes and mouth are necessary to examine patients. Full face respirators are necessary only for laboratory work and autopsies. Disinfectants, such as sodium hypochlorite or formalin must be used for decontamination. A pressure cooker can be used as a portable autoclave for sterilization.

(d) *Epidemiological Investigations.* Surveillance teams may consist of locally recruited persons, trained on the spot and supervised by one or more epidemiologists. They should have standardized forms for case and control evaluation and for village surveillance reports. Transportation is the major requirement during an outbreak.

(e) *Containment Measures.* A clear definition of cases is necessary for a sound application of containment measures:

- (i) Confirmed case: a person with acute clinical symptoms with isolation of the virus and/or presence of specific antibodies;
- (ii) probable case: a person who for three days has headache, lumbar pain, high fever, abdominal pain, nausea, vomiting and haemorrhage without any other specific diagnosis and no sedation after anti-malaria and antibiotic treatment; knowledge of a contact with a confirmed case or another probable case is essential;
- (iii) possible case: a person with only three days of fever and headache without any other diagnosis and not responding to treatment as above and with contact with a confirmed or probable case three weeks previously;
- (iv) contact: a person having had direct contact with (i), (ii), or (iii), i.e. sharing the same room or meals, having given care or participated in burial; either two days before onset, during the disease or immediately after death.

A distinction must be established between primary and secondary contacts. A *primary contact* is a person who has nursed or buried a confirmed or probable case, has spent a night under the same roof, had a meal at the same table or had face to face contact sometime during a period beginning two days before the onset of the disease with a proven or probable case. A *secondary contact* is a person who, sometime during the same period, spent one night under the same roof, shared a meal or had face to face contact with a primary contact.

Strict barrier nursing should be used for the treatment of confirmed and probable cases. Primary contacts should be isolated and their temperature taken twice daily. Secondary contacts are not confined. They are either informed to contact certain medical centres in case fever develops, or alternatively medical centres are given the identity of the secondary contacts. A contact becomes a probable case when fever lasts for 48 hours and no malaria parasites are found in the peripheral blood or if there is no response to anti-malarial therapy.

Active surveillance is a prerequisite for rational measures to be taken, at four levels:

- Area quarantine should be enforced for a duration of two estimated incubation periods (twice 14 days) after the last case. In view of the economic consequences, this measure should be regularly adapted to the situation. This measure is never absolutely effective but cuts down significantly long distance travel.
- Village quarantine should be combined with health education aiming at limitation of contact with patients. Bringing patients

c) *Mesures de sécurité.* Il importe de limiter autant que possible le nombre des personnes exposées au cours d'une épidémie. Ces personnes doivent être vaccinées contre la fièvre jaune, suivre un traitement prophylactique contre le paludisme et recevoir des gammaglobulines pour la prévention de l'hépatite virale. Le personnel doit être protégé contre les risques d'infection par les égratignures, les conjonctives ou la bouche et porter des gants, blouses, bonnets, bottes ou couvre-chaussures et masques. Des lunettes de protection et des respirateurs recouvrant les yeux et la bouche sont nécessaires pour l'examen des malades. Des respirateurs recouvrant tout le visage ne sont nécessaires que pour le travail en laboratoire et les autopsies. Pour la décontamination, on utilisera des désinfectants tels que l'hypochlorite de sodium ou le formol, et un autocuiseur peut servir d'autoclave portatif pour stériliser.

d) *Recherches épidémiologiques.* Les équipes de surveillance peuvent se composer de personnes recrutées localement, formées sur place et supervisées par un ou plusieurs épidémiologistes. Elles devront être pourvues de formulaires standardisés pour l'évaluation des cas et des opérations de lutte, ainsi que pour les rapports sur la surveillance des villages. Les moyens de transport sont une nécessité absolue au cours d'une épidémie.

e) *Mesures d'endiguement.* Pour appliquer judicieusement les mesures d'endiguement, il est nécessaire de définir clairement les cas:

- i) Cas confirmé: personne présentant des symptômes cliniques aigus avec isolement du virus et/ou présence d'anticorps spécifiques;
- ii) cas probable: personne qui, pendant trois jours, a des maux de tête, des douleurs lombaires, une température élevée, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et des hémorragies en l'absence de tout autre diagnostic spécifique et de sédation après traitement antipaludique et par les antibiotiques; il est essentiel qu'il y ait eu contact avec un cas confirmé ou un autre cas probable;
- iii) cas possible: personne ayant seulement souffert pendant trois jours de fièvre et de maux de tête, en l'absence de tout autre diagnostic et de réaction au traitement susmentionné, et ayant eu un contact avec un cas confirmé ou probable dans les trois semaines précédentes;
- iv) contact: personne ayant eu un contact direct avec i), ii), ou iii), c'est-à-dire ayant partagé la chambre ou les repas du malade, lui ayant donné des soins ou ayant participé à son enterrement, deux jours avant l'apparition de la maladie, au cours de la maladie, ou immédiatement après le décès.

Il convient d'établir une distinction entre les contacts primaires et secondaires. Un *contact primaire* est une personne qui a soigné ou enterré un cas confirmé ou probable, qui a passé une nuit sous le même toit, qui a pris un repas à la même table ou qui s'est trouvée en face de lui à un moment quelconque pendant la période qui s'étend à partir du deuxième jour avant l'apparition de la maladie. Quant au *contact secondaire*, c'est une personne qui, à un moment quelconque au cours de cette même période, a passé une nuit sous le toit d'un contact primaire, a partagé son repas ou s'est trouvée en face de lui.

Pour le traitement des cas confirmés et probables, on devra pratiquer un isolement rigoureux. Les contacts primaires doivent être également isolés et leur température prise deux fois par jour. Les contacts secondaires n'ont pas à être isolés; ils sont soit informés d'avoir à se mettre en rapport avec certains centres médicaux en cas de fièvre, soit signalés aux centres médicaux. Un contact devient un cas probable lorsqu'il est fébrile pendant plus de 48 heures sans qu'aucun parasite du paludisme ait été décelé dans son sang périphérique et en l'absence d'une réaction au traitement antipaludique.

Une surveillance active est indispensable pour que des mesures rationnelles soient prises à quatre niveaux:

- Une quarantaine « de zone » sera imposée pendant une période correspondant à deux périodes possibles d'incubation (soit deux fois 14 jours) après le dernier cas. En raison de ses conséquences économiques, cette mesure doit être convenablement adaptée à la situation. Elle n'est jamais d'une efficacité absolue, mais réduit considérablement les déplacements sur de grandes distances.
- Une quarantaine « de village » doit être associée à une éducation sanitaire visant à limiter les contacts avec les malades. L'hospita-

to the hospital is not necessarily the best measure and, depending on local circumstances, household confinement may be preferable. If hospital isolations are decided, it should be very strict because it attracts inevitably a great number of visitors.

- Household confinement consists of isolation of a patient in one house or room and only one person cares for the patient. Protective clothing is offered to the person looking after the patient.
- In all eventualities, precise instructions for burial have to be given.
- International quarantine is only applied if cases occur in cities with international transport facilities and if primary contacts are not identified and quarantined.
- Individual quarantine should last for a period of 14 days, to take into account the fact that the incubation period may in certain cases exceed the average length of seven days.

Members of medical teams will be considered according to their functions as possible primary or secondary contacts and should be quarantined accordingly. A decision on whether to treat a patient in a local centre and to send a specialized team there, or to evacuate the patient to a specially equipped centre, should be taken according to local circumstances.

#### Management of Patients

(a) Three levels of management of patients may be established:

- (i) Procedures to render as safe as possible medical care of patients consisting of analgesia and attention to basic requirements;
- (ii) control of electrolytes, administration of immune plasma and blood when required;
- (iii) intensive care and anti-coagulation therapy.

The second level is considered to be the most practical in field conditions as epidemics are likely to be over by the time level (iii) can be organized.

(b) *Management and In-Service Training.* Care at the desired level may be best carried out by groups of trained persons travelling to the site of outbreak and training local personnel. Competent institutes and centres in the world should maintain groups of persons trained and ready to undertake such a task. Lists of such centres rather than lists of individuals should be established by WHO.

(c) *Treatment* at the second level depends mainly upon:

- (i) Prerequisite means of containing the infection and training personnel in these means;
- (ii) equipment, material and trained staff for control of body fluids and electrolytes and for replacement of blood loss.

(d) Although *control of body fluids* may be possible using only clinical signs and symptoms, field laboratory facilities should be available for leucocyte count<sup>1</sup> (Marburg-virus infection is improbable in the presence of a leucocytosis), research for malaria parasites, blood culture, urine examination and culture and flame photometry. There is an urgent need to establish safe means for the examination of body fluids.

(e) *Equipment* must be standardized to fit different local conditions.

(f) It is necessary to exclude relatives and visitors from hospitals where Marburg disease-like illnesses are treated.

(g) It is suggested that countries likely to receive patients suffering from Marburg disease-like illnesses should be urged to make the best possible facilities available for their care and laboratory investigation.

(h) It is also suggested that information should be collected to ascertain the relative value of treatment with interferon and convalescent plasma.

<sup>1</sup> A Coulter counter was utilized in Zaire.

lisation des malades n'est pas nécessairement la meilleure mesure et, dans certaines circonstances, l'isolement à domicile pourrait être préférable. S'il est décidé de recourir à l'isolement hospitalier, celui-ci doit être très rigoureux car les hôpitaux reçoivent inévitablement un grand nombre de visites.

- L'isolement à domicile consiste à imposer au malade de rester dans une maison ou une chambre et à le faire soigner par une seule personne. La personne qui le soigne doit recevoir des vêtements de protection.
- Dans tous les cas, on doit donner des instructions précises pour les funérailles.
- La quarantaine internationale ne s'applique que si des cas se produisent dans des villes où il existe des transports internationaux et si les contacts primaires n'ont pas été identifiés et placés en quarantaine.
- La quarantaine individuelle doit durer 14 jours car la période d'incubation peut, dans certains cas, dépasser la durée moyenne de sept jours.

Selon leurs fonctions, les membres des équipes médicales seront considérés comme des contacts primaires ou secondaires possibles et isolés en conséquence. La question de savoir si l'on doit traiter un malade dans un centre local et y envoyer une équipe spécialisée ou le transporter dans un centre spécialement équipé doit être réglée au vu des circonstances.

#### Conduite du traitement

a) La conduite du traitement peut se faire à trois niveaux:

- i) Mesures visant à rendre les soins médicaux aussi sûrs que possible: analgésiques et précautions de base;
- ii) contrôle des électrolytes et administration de plasma immun et de sang, lorsque cela est nécessaire;
- iii) soins intensifs et thérapie anti-coagulation.

On considère que le deuxième niveau est le plus réalisable sur le terrain, car l'épidémie risque d'avoir pris fin avant que l'on puisse organiser le niveau iii).

b) *Conduite du traitement et formation en cours d'emploi.* Le meilleur moyen de dispenser les soins au niveau souhaité consiste à envoyer dans la zone d'épidémie des groupes de personnes qualifiées que l'on charge d'entraîner un personnel local. Des instituts et des centres compétents du monde entier devraient former de tels groupes et les tenir prêts à intervenir. L'OMS devrait établir des listes de ces centres plutôt que des listes d'individus.

c) Le *traitement* au deuxième niveau dépend essentiellement:

- i) Des moyens requis pour endiguer l'infection et de la formation du personnel pour leur mise en œuvre;
- ii) du matériel, des fournitures et du personnel qualifié nécessaires pour contrôler les liquides organiques et les électrolytes et remplacer le sang perdu.

d) Si le *contrôle des liquides organiques* peut se faire sur la seule base des signes et symptômes cliniques, on doit disposer d'un laboratoire de campagne pour la numération leucocytaire<sup>1</sup> (l'infection par le virus de Marburg est peu probable en présence d'une leucocytose), la recherche des parasites du paludisme, l'hémoculture, les examens d'urine et l'uroculture et enfin, la photométrie de flamme. Il est urgent de mettre au point des méthodes sans danger pour l'examen des liquides biologiques.

e) Le *matériel* sera normalisé de manière à pouvoir être adapté aux conditions locales.

f) Il est nécessaire d'interdire aux parents et visiteurs l'accès des hôpitaux où l'on soigne des maladies à virus de type Marburg.

g) Il est proposé que les pays pouvant recevoir des malades atteints d'une maladie analogue à celle de Marburg soient instamment priés d'utiliser les meilleures installations possibles pour les soins et les recherches de laboratoire.

h) Il est aussi proposé de recueillir des informations pour déterminer la valeur relative du traitement à l'interféron et du traitement au plasma de convalescent.

<sup>1</sup> Au Zaire, on a utilisé un compteur de particules de Coulter.

### Laboratory Investigations

(a) *Rapid Diagnosis.* Ebola virus has been isolated from whole blood during the acute stage (1st-2nd weeks) of the disease. The virus seems fairly stable and successful isolation has been achieved with samples which had been repeatedly frozen and thawed. For sending samples it is important to use only plastic ampoules which can be safely sealed with a screw stopper or which can be heat sealed, and which will not crack in liquid nitrogen or in dry ice.

The most rapid method of diagnosis is electron microscopy (EM) of whole blood, or serum, fixed with glutaraldehyde, after concentration by moderate centrifugation. Inoculation of Vero cells, followed by daily examination of concentrated supernatant culture fluids by EM or by fluorescent antibody (FA) has enabled virus isolation after 2-4 days. It was generally agreed that inoculation of guinea pigs and suckling mice should always be included where possible in isolation attempts. Virus isolations have been made from throat swabs and from excreta but there is scope for improvements in techniques for using these.

It is recommended that attempts should be made to develop other rapid diagnosis methods, for example the demonstration by FA of virus in leucocytes or in other tissue cells. A wider range of tissue culture cells should be tested for susceptibility with the possibility of finding some with increased sensitivity.

Specific antibody has been detected early in the disease. The indirect FA test is more sensitive than the complement-fixation test.

It is recommended that attempts should be made to produce an inactivated antigen for the FA test without reduction of sensitivity. There is also the possibility of developing other serological tests for human and animal surveys. For example, the enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA) test is very suitable for large scale surveys. For this test, it would be preferable to use an inactivated antigen prepared, for example, by column fractionation of the virus. Laboratories involved in diagnosis of viral haemorrhagic fevers should utilize routinely a range of different virus antigens for use in these tests (e.g., Lassa fever virus, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus).

(b) *Virological Monitoring of Cases.* At present this is quite arbitrary. Cases have been isolated until no virus has been detected in two consecutive weekly blood samples. However, it is known that the virus can persist in other tissues when there is no detectable viraemia. There is a great need for more exact criteria for handling cases but this can only come from more research on the natural evolution of the infection.

(c) *Laboratory Safety.* Ebola and similar viruses should obviously only be handled in adequately equipped laboratories. At least three isolation cabinets are required: one for microscopes, centrifuge, water bath, etc.; one as a working area, with a "dunk tank"; and one for handling animals. The most hazardous procedure is the inoculation of animals. People should never work alone in these laboratories, always at least in pairs. There should be a clearly defined accident reporting system and post-accident procedure.

There is scope for the development of an improved isolation cabinet for field use.

### Passive Immunization

From the limited experience based on the treatment of a few patients with Marburg virus infection and one confirmed patient with Ebola virus, convalescent plasma appears to be a useful therapy, and, at the present time, it is the only form of specific treatment.

The collection of large volumes of convalescent plasma by plasmapheresis for prophylactic and therapeutic use is, therefore, essential and urgent and should be carried out while antibody titres are still high. This plasma should be tested for specific antibody to the virus and also for adventitious agents by sensitive techniques. If

### Examens de laboratoire

a) *Diagnostic rapide.* Le virus Ebola a été isolé dans le sang total au cours de la phase aiguë (1<sup>re</sup>-2<sup>e</sup> semaine) de la maladie. Ce virus semble assez stable et l'isolement a été obtenu avec des échantillons congelés et dégelés à plusieurs reprises. Pour l'expédition des échantillons, il importe de n'utiliser que des ampoules de plastique pouvant être scellées de façon étanche avec un capuchon à vis ou scellées à la chaleur et ne se brisant pas dans l'azote liquide ou la glace carbonique.

La méthode de diagnostic la plus rapide est la microscopie électronique du sang total ou du sérum fixé avec de l'aldéhyde glutarique, après concentration par centrifugation modérée. L'inoculation sur des cellules Vero, suivie d'un examen quotidien des surnageants de culture concentrés par la microscopie électronique ou l'immunofluorescence a permis d'isoler le virus après deux à quatre jours. On considère, d'une manière générale, que les essais d'isolement devraient toujours comporter, dans la mesure du possible, l'inoculation de cobayes et de souris à la mamelle. Des isollements de virus ont été réalisés sur des prélèvements de gorge et d'excreta, mais les techniques permettant de les utiliser devraient être encore améliorées.

Il est recommandé de faire des efforts pour mettre au point d'autres méthodes de diagnostic rapide, par exemple l'utilisation de l'immunofluorescence pour démontrer la présence du virus dans les leucocytes ou dans toute autre cellule tissulaire. Il faudrait éprouver la sensibilité d'une gamme plus étendue de cellules provenant de cultures tissulaires pour tenter d'en découvrir quelques-unes dotées d'une sensibilité accrue.

Des anticorps spécifiques ont été décelés au début de la maladie et l'on a constaté que l'épreuve d'immunofluorescence indirecte était plus sensible que celle de la fixation du complément.

Il est recommandé de s'attacher à produire un antigène inactivé pour l'épreuve d'immunofluorescence qui n'entraîne pas de réduction de la sensibilité. On pourrait aussi mettre au point d'autres épreuves sérologiques pour les enquêtes humaines et animales. C'est ainsi que le titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme (ELISA) convient parfaitement pour les enquêtes de grande envergure. À cet effet, il serait préférable d'utiliser un antigène inactivé préparé par exemple par fractionnement du virus sur colonne. Les laboratoires qui participent au diagnostic des fièvres hémorragiques d'origine virale devraient utiliser couramment pour ces épreuves une série d'antigènes viraux différents (virus de la fièvre de Lassa, virus de la fièvre hémorragique de Crimée et du Congo, etc.).

b) *Surveillance virologique des cas.* Elle est actuellement tout à fait arbitraire. Certains cas ont été isolés jusqu'à ce qu'aucun virus ne puisse être décelé dans deux échantillons hebdomadaires de sang prélevés consécutivement. Toutefois, on sait que le virus peut persister dans d'autres tissus sans aucune virémie décelable. Il est donc tout à fait nécessaire d'obtenir des critères plus exacts pour le traitement des cas, ce qui suppose des recherches plus approfondies sur l'évolution naturelle de l'infection.

c) *Sécurité des laboratoires.* De toute évidence, le virus Ebola et autres virus semblables ne doivent être manipulés que dans des laboratoires convenablement équipés. Il faut au moins trois boîtes de sécurité: l'une pour les microscopes, la centrifugeuse, le bain-marie, etc., l'autre servant d'aire de travail avec un bac de trempage et la troisième pour la manipulation des animaux; la procédure la plus dangereuse est l'inoculation des animaux. Personne ne doit jamais travailler seul dans ces laboratoires: il doit toujours y avoir au moins deux personnes. On prévoira dans tous les cas un système de notification des accidents clairement défini ainsi que la procédure à suivre en cas d'accident.

Il devrait être possible de mettre au point un box de sécurité pour le terrain.

### Immunisation passive

D'une expérience limitée qui se résume au traitement d'un petit nombre de personnes atteintes par le virus de Marburg et d'un cas confirmé d'infection par le virus Ebola, il semble ressortir que le plasma de convalescents a une bonne valeur thérapeutique; de toute façon, c'est actuellement la seule forme de traitement spécifique.

Il est donc essentiel de recueillir d'urgence de grandes quantités de plasma de convalescents par plasmaphérese à des fins prophylactiques et thérapeutiques pendant que les titres d'anticorps sont encore élevés. Ce plasma devra être éprouvé à l'aide de techniques sensibles pour déterminer les anticorps spécifiques du virus ainsi que les agents

sufficient plasma is available, fractionation can be undertaken to prepare specific immunoglobulins which can be stored and used more easily than whole plasma. These products should be collected, stored and utilized at the discretion of the Governments of the Sudan and Zaire. Local teams should be trained in the plasmapheresis techniques.

Most of the plasma should be fractionated into immunoglobulin suitable for intravenous administration for use in the following groups:

- (a) Pre-exposure prophylaxis:
  - personnel engaged in direct patient care
  - laboratory workers
- (b) Post exposure prophylaxis:
  - laboratory personnel engaged in work on the virus in maximum security facilities
- (c) Therapeutic use will be limited by availability.

Several litres of plasma should be kept in storage, not fractionated.

It is most important that a standard protocol be used in each case to obtain the maximum of information on the effect of passive immunization and on the efficacy of this treatment on the course of the disease.

In addition, information is required on:

- (a) The persistence of the antibody after infection;
- (b) the nature of the antibody in plasma;
- (c) experimental data on the protective efficacy of specific batches of plasma and immunoglobulin in a suitable animal model.

Consideration should be given to the preparation of immunoglobulin in a heterologous species e.g. nonhuman primates or horses for life-saving treatment.

The storage of globulin and plasma and the logistics of distribution require definition.

#### Active Immunization

Although there has not been any direct experimental virological work, it is a reasonable supposition that an inactivated virus vaccine will be efficacious. Such a vaccine is required in the first instance for laboratory personnel engaged in experimental work with the agent. If shown to be immunogenic in laboratory workers, the vaccine would be used for individuals engaged in direct patient care, for epidemiologists, and, in due course, it may be available for protection of all individuals at high risk.

The development and production of such a vaccine will require initial research to establish the following basic virological data:

- (a) precise and sensitive infectivity and neutralizing antibody assays;
- (b) evaluation of suitable substrate cell cultures;
- (c) selection of virus strains;
- (d) methods of inactivation;
- (e) antigen assay methods;
- (f) the development of suitable animal model systems;

In addition, the following serological and immunological data are required:

- (a) Passive immunization in primates:
  - (i) pre-exposure
  - (ii) post-exposure
- (b) immunogenicity assays:
  - (i) small animals
  - (ii) primates
- (c) protection tests
- (d) sensitive laboratory tests for characterizing the antigens associated with the virus.

Such developmental work requires maximum containment facilities. The magnitude of this undertaking and work is such that a collaborative vaccine development programme is essential. The establishment of this collaboration requires precise and careful allocation of responsibilities between the laboratories and WHO.

contaminants. Si l'on dispose de quantités suffisantes de plasma, on sera en mesure de le fractionner pour préparer des immunoglobulines spécifiques pouvant être entreposées et utilisées plus facilement que le plasma total. Ces produits doivent être prélevés, entreposés et utilisés à la discrétion des Gouvernements du Soudan et du Zaïre et des équipes locales seront formées aux techniques de plasmaphérese.

La plus grande partie du plasma doit être fractionnée en immunoglobulines pouvant être administrées par voie intraveineuse aux groupes ci-après:

- a) Prophylaxie en pré-exposition:
  - personnel s'occupant directement des malades;
  - travailleurs de laboratoire.
- b) Prophylaxie post-exposition:
  - personnel de laboratoire participant à des travaux sur le virus dans des installations qui offrent une sécurité maximale.
- c) Utilisation thérapeutique: en fonction du matériel disponible.

Plusieurs litres de plasma devront être entreposés sans fractionnement.

Il importe au plus haut point d'utiliser dans chaque cas un protocole type pour obtenir le maximum d'informations concernant les effets de l'immunisation passive et l'efficacité de son influence sur l'évolution de la maladie.

En outre, il faudra recueillir des informations sur:

- a) la persistance des anticorps après l'infection;
- b) la nature des anticorps dans le plasma;
- c) les données expérimentales recueillies sur l'efficacité de la protection assurée par certains lots de plasma et d'immunoglobulines chez un modèle animal approprié.

Il convient encore d'envisager la préparation d'immunoglobulines chez une espèce hétérologue, par exemple des primates ou des chevaux, pour le traitement d'urgence.

L'entreposage de la globuline et du plasma et la logistique de la distribution nécessitent une définition.

#### Immunsation active

Si aucune expérience n'a encore porté directement sur le virus, on peut toutefois raisonnablement supposer qu'un vaccin à base de virus inactivé serait efficace. Un tel vaccin est nécessaire au premier chef pour le personnel de laboratoire qui se livre à des expériences sur l'agent. S'il apparaissait que le vaccin immunise les travailleurs de laboratoire, on l'utiliserait sur les personnes qui s'occupent directement des malades, les épidémiologistes et, en temps utile, tous les individus à haut risque.

Pour mettre au point et produire un tel vaccin, il va falloir entreprendre des recherches initiales en vue d'obtenir des données virologiques de base concernant:

- a) des épreuves d'infectiosité et des titrages par les anticorps neutralisants qui soient précis et sensibles;
- b) l'évaluation de cultures cellulaires pouvant constituer un substrat approprié;
- c) la sélection de souches virales;
- d) les méthodes d'inactivation;
- e) les méthodes de titrage des antigènes;
- f) la mise au point de systèmes appropriés de modèles animaux.

En outre, il importe d'obtenir les données sérologiques et immunologiques ci-après:

- a) immunisation passive chez les primates:
  - i) pré-exposition
  - ii) post-exposition
- b) titrage de l'immunogénicité:
  - i) chez les petits animaux
  - ii) chez les primates
- c) essais de protection
- d) épreuves de laboratoire sensibles pour la caractérisation des antigènes associés au virus.

Ce travail de développement nécessite des installations assurant un confinement maximum. L'ampleur de cette entreprise et des travaux envisagés est telle qu'il est essentiel de mettre sur pied un programme collectif pour élaborer un vaccin. Une telle collaboration ne pourra s'instaurer que si les responsabilités sont réparties soigneusement et avec précision entre les laboratoires et l'OMS.

### Ecological Studies

As for Lassa fever, it is most probable that Ebola virus has an animal reservoir. Rodents are probably implicated as reservoirs of Ebola virus as laboratory studies have shown that primary passages in guinea pigs provide numerous survivors of the virus and that it becomes more virulent only with subsequent passages. Bats also live in human settlements and should also be given consideration. Monkeys might be implicated, but they are probably only victims, as is man, of the amplifying cycle. Birds, especially garden species, can also be investigated. Hematophagous arthropods, if they play a role in the transmission of the virus from the reservoir to man or man to man, do not appear to have been greatly involved in the recent outbreaks.

Sampling of rodents should commence with those found in houses, graneries and adjacent fields. Rodents should then be trapped in transects from villages to forests through cultivated land and that from which trees have been cleared. For detection of antibodies, preference should be given to older rodents. Other tissues (liver, spleen and kidney) should be collected from rodents of different age groups.

Safety precautions have to be taken and personnel carrying out autopsies and drawing blood should use respirators. Specimens should be kept in dry ice and sent to a high security laboratory.

### Etudes écologiques

Il est tout à fait probable que, comme celui de la fièvre de Lassa, le virus Ebola dispose d'un réservoir animal. Les rongeurs jouent sans doute ce rôle puisque des travaux de laboratoire ont permis d'établir que, lors des passages primaires chez les cobayes, de nombreux animaux survivent au virus qui ne devient plus virulent qu'à l'occasion des passages ultérieurs. Les chauves-souris vivent aussi dans des établissements humains et doivent donc être prises en considération. Les singes pourraient faire partie de ce processus mais, à l'instar de l'homme, ils sont sans doute les victimes seulement d'un cycle en expansion. Les oiseaux, et notamment les espèces vivant dans les jardins, pourraient faire aussi l'objet de recherches. Les arthropodes hématophages, s'ils jouent un rôle dans la transmission du virus entre le réservoir et l'homme ou d'un individu à l'autre, ne semblent pas avoir eu une part importante dans les récentes épidémies.

La collecte d'échantillons de rongeurs devrait d'abord porter sur les animaux qui se trouvent dans les logements, les greniers et les champs avoisinants. On les piégera ensuite dans des zones radiales allant du village à la forêt en passant par les terres cultivées et celles que l'on a défrichées. Pour déceler les anticorps, on examinera de préférence les rongeurs âgés. D'autres tissus (foie, rate et reins) seront prélevés sur des rongeurs appartenant à des groupes d'âge différents.

Il faut prendre des mesures de sécurité et le personnel qui fait les autopsies et prélève le sang doit se servir de respirateurs. Les spécimens seront conservés dans de la glace carbonique et expédiés à un laboratoire de haute sécurité.