

PARTIE VI

SÉRUM ET IMMUNOGLOBULINE ANTIRABIQVES

PRODUCTION DE SÉRUM ANTIRABIQUE D'ORIGINE ANIMALE

P. LÉPINE¹ & P. ATANASIU²

Méthode de l'Institut Pasteur

L'Institut Pasteur produit un sérum antirabique thérapeutique par immunisation de chevaux ou de mulets avec la souche Pasteur de virus fixe. A cet effet, on administre d'abord aux animaux, pendant deux mois, des injections de virus inactivé par la β -propiolactone, puis on leur injecte une série de doses croissantes de virus vivant. Toutes les injections sont faites par voie sous-cutanée. Dès que le volume à injecter devient très important, il est réparti en plusieurs doses administrées dans différentes parties du corps.

Les animaux utilisés doivent être soigneusement choisis car, même chez des chevaux de race identique, l'aptitude individuelle à produire un sérum satisfaisant varie suivant l'état de santé, la nutrition, l'âge ou les antécédents de l'animal. Des titrages d'anticorps faits en cours d'immunisation permettent d'éliminer les animaux présentant une réponse insuffisante et de ne retenir que ceux qui sont capables de donner un sérum de titre élevé.

Le protocole d'immunisation est le suivant :

Premier jour au 60^e jour : 20 ml de vaccin inactivé par la β -propiolactone, tous les deux jours (30 injections).

61^e jour au 72^e jour : 4 injections, chacune de $\frac{1}{4}$ de cerveau de lapin inoculé de virus fixe, à 3 jours d'intervalle.

73^e jour au 88^e jour : 4 injections, chacune de $\frac{1}{2}$ cerveau de lapin inoculé de virus fixe, à 4 jours d'intervalle.

89^e jour au 98^e jour : 2 injections, chacune de 1 cerveau entier de lapin inoculé de virus fixe, à 5 jours d'intervalle.

106^e jour : première saignée.

136^e jour : une injection de 1 cerveau entier de lapin inoculé de virus fixe.

144^e jour : deuxième saignée.

La période d'immunisation dure ainsi 98 jours et la première saignée est effectuée 8 jours après. Une injection de rappel est donnée 30 jours plus

¹ Institut Pasteur, Paris, France.

² Chef du Laboratoire des Recherches sur la Rage et des Rhabdovirus, Institut Pasteur, Paris, France.

tard, suivie d'une seconde saignée 8 jours après. On répète tous les mois les rappels et les saignées mais on laisse aux chevaux deux mois de repos par an.

Méthode de l'Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno, Sienna

La méthode appliquée à Sienna, telle qu'elle a été décrite à l'origine par d'Antona & Falchetti dans la première édition de cette monographie, utilise le cheval pour la production des sérums hyperimmuns. Cette même méthode a été reprise avec de légères modifications par Mirchamsy (1963) qui l'applique à l'Institut Razi, à Hessarek (Iran) pour immuniser des mulets adultes.

Le vaccin utilisé par Mirchamsy est préparé à partir de moutons inoculés par voie intracérébrale avec le virus fixe de Sassari et consiste en une suspension de tissu cérébral à 5 % contenant 0,5 % de phénol et inactivé à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les mulets sont simultanément immunisés contre le tétanos par plusieurs injections d'anatoxine tétanique purifiée adsorbée sur phosphate d'aluminium (PATT).

Le schéma d'immunisation est le suivant :

Premier jour : 20 ml de vaccin phénolé + 10 ml de PATT.

2^e jour au 20^e jour : 20 ml de vaccin phénolé chaque jour (19 injections).

21^e jour : 30 ml de vaccin phénolé + 25 ml de PATT.

22^e jour au 40^e jour : 30 ml de vaccin phénolé chaque jour (19 injections).

41^e jour : 45 ml de vaccin phénolé + 40 ml de PATT.

42^e jour au 56^e jour : 45 ml de vaccin phénolé chaque jour (15 injections).

57^e jour au 115^e jour : période de repos (60 jours).

116^e jour : 30 ml de vaccin phénolé + 30 ml de PATT.

117^e jour au 126^e jour : 30 ml de vaccin phénolé chaque jour (10 injections).

127^e jour : 45 ml de vaccin phénolé + 45 ml de PATT.

128^e jour au 136^e jour : 45 ml de vaccin phénolé chaque jour (9 injections).

137^e jour : 30 ml d'une suspension à 5 % de virus vivant (souche fixe Sassari) + 60 ml de PATT.

138^e jour au 144^e jour : 30 ml d'une suspension à 5 % de virus vivant Sassari chaque jour (6 injections).

156^e jour : première saignée.

Méthode accélérée

Fuenzalida & Palacios (1964) ont mis au point une méthode d'hyper-immunisation accélérée des chevaux qui reçoivent d'abord par voie sous-cutanée des injections de vaccin de concentration croissante, puis par voie sous-cutanée, intrapéritonéale et intradermique simultanément du virus pur en suspension dans l'adjuvant de Freund, sans mycobactéries.

Les chevaux sont saignés 20 jours après la fin de l'immunisation qui suit le schéma ci-après :

Premier jour : 40 ml de vaccin inactivé à 1 % par voie sous-cutanée.

7^e jour : 40 ml de vaccin inactivé à 2 % par voie sous-cutanée.

14^e jour : 40 ml de vaccin inactivé à 5 % par voie sous-cutanée.

34^e jour : 3 injections d'une suspension à 8 % de virus vivant (tissu cérébral) dans l'adjuvant de Freund (5 ml par voie intrapéritonéale, 4 ml par voie sous-cutanée, 1 ml par voie intradermique).

41^e jour : 3 injections de suspension à 16 % de virus vivant dans l'adjuvant de Freund (5 ml par voie intrapéritonéale, 4 ml par voie sous-cutanée, 1 ml par voie intradermique).

48^e jour : 3 injections d'une suspension à 20 % de virus vivant dans l'adjuvant de Freund (8 ml par voie intrapéritonéale, 6 ml par voie sous-cutanée, 1 ml par voie intradermique).

68^e jour : saignée.

Le vaccin utilisé à la phase initiale de l'immunisation est préparé selon la technique précédemment décrite par Fuenzalida & Palacios (1955), à partir de cerveaux de souriceaux nouveau-nés infectés de virus rabique fixe, et inactivé par les rayons ultraviolets. Les suspensions de virus vivant sont également préparées à partir de cerveaux de souriceaux nouveau-nés ; elles sont additionnées d'adjuvant de Freund, sans mycobactéries.

L'immunisation par cette méthode rapide paraît très satisfaisante et les titres d'anticorps neutralisants obtenus par Fuenzalida & Palacios sont comparables à ceux que donnent les autres méthodes d'immunisation.

Immunisation du cheval avec un antigène rabique de culture

Antigènes utilisés

Deux types d'antigènes ont été utilisés : vivants et inactivés ; tous deux sont préparés à partir de virus rabique de la souche Pasteur, cultivé en cellules BHK-S13 et entretenu par passages hebdomadaires.

a) *Antigène inactivé*

Des cultures du 20^e passage sont réunies pour obtenir un volume total d'environ 10 litres. Ce mélange titre normalement $10^{-5,1}$ pour 0,03 ml sur la souris et $10^{-5,5}$ pour 0,03 ml en culture cellulaire.

L'antigène est inactivé avec 0,1 ml de β -propiolactone pour 1000 ml d'antigène ; l'inactivation est contrôlée par l'inoculation intracérébrale à des lots de 10 souris qui doivent toutes survivre.

b) *Antigène vivant*

On mélange des volumes égaux de cultures du 20^e passage et de cultures du 23^e passage. Ce mélange titre normalement $10^{-5,1}$ pour 0,03 ml sur la souris et $10^{-5,5}$ pour 0,03 ml en culture cellulaire.

Les deux antigènes sont conservés à l'état congelé à -30°C .

Protocole d'immunisation

L'animal choisi est le cheval ou le mulet ; avant toute immunisation, une première saignée est faite pour rechercher des agents cytopathogènes éventuels dans le sérum : cette épreuve ne doit pas révéler d'activité cytopathogène. L'immunisation est alors effectuée comme suit :

Première phase, avec l'antigène inactivé

a) Pendant trois semaines, une injection hebdomadaire intramusculaire aux doses suivantes :

1 ^{re} injection.	20 ml
2 ^e injection.	50 ml
3 ^e injection.	100 ml
4 ^e injection.	100 ml

b) Pendant trois semaines, deux injections intramusculaires par semaine à la dose constante de 100 ml, c'est-à-dire six injections au total, suivies d'une première saignée de contrôle.

c) Pendant deux mois, une injection intramusculaire par semaine à la dose constante de 100 ml, c'est-à-dire 8 injections au total, suivies d'une deuxième saignée de contrôle.

Deuxième phase, avec l'antigène vivant

Une injection hebdomadaire aux doses suivantes :

1 ^{re} injection.	20 ml
2 ^e injection.	50 ml
3 ^e injection.	100 ml
4 ^e injection.	100 ml

suivies d'une troisième saignée de contrôle.

On continue de la même façon les injections hebdomadaires de 100 ml et les saignées périodiques jusqu'à obtention d'un titre satisfaisant.

Titrage du pouvoir protecteur

A chaque saignée de contrôle on doit observer une augmentation régulière du titre des anticorps. L'expérience actuelle indique qu'on peut compter obtenir les titres suivants aux trois premières saignées :

Première saignée : Le pouvoir protecteur du sérum, déterminé sur culture cellulaire avec 100 DL₅₀ de virus, doit être d'environ 1 : 300, soit à peu près 30 UI/ml.

Deuxième saignée : Le pouvoir protecteur est déterminé sur la souris par comparaison avec l'Étalon international qui contient 86,6 UI d'anticorps antirabique par ampoules¹. Avec 100 DL₅₀ de virus d'épreuve CVS, le sérum de référence doit titrer environ 1 : 2800 et le sérum éprouvé au moins 1 : 3000, ce qui correspond à plus de 90 UI par ml. Avec 300 DL₅₀ de CVS, le sérum de référence doit titrer environ 1 : 1300 et le sérum éprouvé 1 : 2800, soit environ 170 UI par ml. Quand le titre est déterminé sur culture cellulaire avec 300 DL₅₀ de virus, on doit obtenir une valeur supérieure à 1 : 3000.

Troisième saignée : Le pouvoir protecteur déterminé chez la souris infectée avec 300 DL₅₀ de CVS doit être environ 1 : 6500, soit 450 UI/ml.

Concentration et purification du sérum antirabique

Les quantités relativement élevées de sérum antirabique qui sont nécessaires pour la prophylaxie de la rage, ainsi que les risques d'accidents anaphylactiques et d'autres réactions ont conduit à la mise au point de diverses méthodes de la préparation de sérum antirabique concentré et purifié.

Habel (1945) a été le premier à essayer un fractionnement des protéines par le sulfate d'ammonium, et diverses méthodes ont été décrites depuis². A l'Institut Pasteur, la méthode de fractionnement et de purification consiste, dans un premier temps, en une digestion enzymatique suivie d'une précipitation par le sulfate d'ammonium, puis, dans un deuxième temps, en une élimination par thermocoagulation des protéines en excès (voir aussi chapitres 38, 39 et 40).

Quel que soit le procédé adopté, il convient de déterminer la teneur finale en protéines du sérum purifié et de la rapporter au pouvoir protecteur (voir chapitre 40, page 323). Il faut aussi pratiquer une électrophorèse sur

¹ Voir chapitre 40, pages 325 et 326. Un sérum de référence peut être obtenu sur demande aux centres OMS de référence pour la rage (voir appendice 7).

² Voir Koprowski et al. (1950), Pope & Stevens (1951), Delsal & Mirchamsy (1953), Devi et al. (1956), Wang & Lin (1957).

papier pour contrôler le fractionnement des protéines. D'une façon générale, un sérum purifié concentré titrant 120 UI/ml ne doit pas renfermer plus de 5 % des protéines sériques totales.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Delsal, J. L. & Mirchamsy, H. (1953) *Rev. Immunol.*, **17**, 110
Devi, P., D'Silva, C. B. & Ahuja, M. L. (1956) *Indian J. med. Res.*, **44**, 157
Fuenzalida, E. & Palacios, R. (1955) *Bol. Inst. bact. Chile*, **8**, 3
Fuenzalida, E. & Palacios, R. (1964) *Bull. Org. mond. Santé*, **30**, 437
Habel, K. (1945) *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*, **60**, 545
Koprowski, H., Van Del Scheer, J. & Black, J. (1950) *Amer. J. Med.*, **8**, 412
Mirchamsy, H. (1963) *Arch. Inst. Razi*, **15**, 83
Pope, C. G. & Stevens, M. F. (1951) *Brit. J. exp. Path.*, **32**, 314
Wang, S. P. & Lin, C. C. (1957) *Formosan med. Ass.*, **56**, 10

PRÉPARATION D'IMMUNOGLOBULINE ANTIRABIQUE D'ORIGINE ANIMALE : MÉTHODE EMPLOYÉE EN URSS

M. SELIMOV¹ & E. GORDIENKO²

L'immunoglobuline antirabique est fabriquée en URSS à partir de sérum hyperimmun de chevaux vaccinés à l'aide d'une suspension à 10 % de cerveau de mouton infecté de virus rabique fixe (souche Moscou, variant de la souche Pasteur). Le vaccin est du type Fermi et contient 0,5 % de phénol ; il est partiellement inactivé par conservation à 22°C pendant 8 jours. On l'administre en injections sous-cutanées dans différentes parties du corps. Le plan d'immunisation des animaux utilisés pour la production des globulines est présenté dans le tableau suivant :

**PLAN D'IMMUNISATION DES CHEVAUX UTILISÉS POUR LA PRODUCTION
D'IMMUNOGLOBULINE ANTIRABIQUE**

Etape d'immunisation	Jour	Dose d'antigène
1	1 7 14	40 ml 80 ml 120 ml
2	21 28 35	50 ml 100 ml 150 ml
3	42 49 56 63	50 ml 100 ml 150 ml Saignée de contrôle
4	73 80	150 ml Saignée de contrôle
5	96 103	150 ml Saignée

¹ Professeur, Chef du Laboratoire de Prophylaxie de la Rage, Institut de la Poliomyélite et des Encéphalites virales, Académie des Sciences médicales de l'URSS, Moscou, URSS.

² Chef de la Section du Vaccin antirabique, Institut de Kharkov pour la Recherche scientifique sur les Vaccins et les Sérums, Kharkov, URSS.

Lorsque le titre des anticorps neutralisants dépasse 1 : 500 (mesuré contre 100 DL₅₀ de virus rabique fixe), on administre aux animaux une injection d'une dose unique de 150 ml d'antigène. Les chevaux qui présentent un titre d'anticorps inférieur à 1 : 500 après la 5^e phase de l'immunisation reçoivent par voie intramusculaire 10, 20 ou 30 ml de l'antigène à intervalles d'une semaine ou bien ne sont pas utilisés pour la production d'immunoglobuline.

Extraction de la fraction immunoglobuline

Un mélange de sérum antirabique brut présentant un titre d'anticorps d'au moins 1 : 1000 (mesuré contre 100 DL₅₀ en moyenne de virus rabique fixe de la souche CVS), est précipité par l'éthanol à froid, selon une méthode qui est une modification de celle de Cohn (1961).

Première étape

Le sérum est dilué avec un volume égal d'eau distillée, puis agité au froid pendant 2 heures ; on ajoute alors 352 ml d'éthanol à 96 % par litre de mélange, à raison de 5 à 6 litres par heure (concentration finale de l'éthanol : 25 %). Le précipité est séparé par centrifugation à -5°C .

Deuxième étape

On dissout le précipité dans de l'eau distillée (25 litres par kg de précipité). On ajoute 10 ml d'une solution de chlorure de sodium 1 M à chaque litre du mélange, puis on ajuste le pH à $5,0 \pm 0,1$ avec un tampon à l'acétate. Le mélange est alors agité pendant 3 heures, après quoi il est additionné d'éthanol à 96 % à raison de 215 ml par litre de mélange (concentration finale de l'éthanol : 17 % ; température du mélange 0 à 6°C). Après agitation pendant une heure, le mélange est séparé par centrifugation dans un appareil ASG-3M¹ à raison de 20 litres à l'heure. A la sortie de l'appareil, la température du mélange est de 4,5 à 5°C. Le produit obtenu après centrifugation doit être clair.

Troisième étape

On verse ensuite le produit de centrifugation dans un bac à réaction et on y ajoute :

- solution de chlorure de sodium 1 M, 50 ml par litre de produit centrifugé ;
- solution de bicarbonate de sodium 1 M, 5 ml par litre de produit centrifugé, pH 7,0-7,2, en mélangeant continuellement ;
- éthanol à 34 %, en quantité égale à la somme des volumes des solutions de chlorure de sodium et de bicarbonate de sodium ;
- éthanol à 96 %, 113 ml par litre de produit centrifugé, pour obtenir une concentration finale de 25 %.

¹ Sa conception est semblable à celle d'une centrifugeuse à lait, mais il fonctionne à des vitesses plus élevées et en système clos, ce qui permet d'opérer dans des conditions d'asepsie.

La température après précipitation doit être de 7 à 8°C. On laisse reposer le mélange pendant 1 heure, puis on le centrifuge à raison de 25 litres à l'heure. Un litre de sérum antirabique brut produit 43 g de précipité d'immunoglobuline antirabique.

Afin d'éliminer l'éthanol, on place le précipité brut d'immunoglobuline dans une mousseline stérile, puis dans une toile de filtre ; la filtration est effectuée sous pression mécanique pendant 24 heures à 8–10°C. Le précipité brut sert à préparer une solution à 10 % \pm 1 % d'immunoglobuline en soluté physiologique (pH 7,0 à 7,5). Dans les 24 heures qui suivent sa préparation, la solution d'immunoglobuline est filtrée sous pression à travers des filtres de type Seitz (Sal'nikov) munis de plaques stérilisantes de porosité de 300 μ m.

Pour stabiliser la solution d'immunoglobuline, on la conserve pendant 20 à 30 jours à la température du laboratoire, puis on la filtre à nouveau.

A tous les stades de la production, on effectue des épreuves de contrôle de l'immunoglobuline antirabique. La préparation finale est soumise à des épreuves visant à contrôler :

- a) l'absence de contaminants bactériens et fongiques ;
- b) l'innocuité ;
- c) l'activité protectrice (le titre ne doit pas être inférieur à 580 UI par ml par comparaison avec le sérum de référence de l'OMS¹) ;
- d) l'homogénéité électrophorétique par électrophorèse ; dans un appareil de Tiselius ou sur papier (la teneur en immunoglobuline ne doit pas être inférieure à 97 %) ;
- e) la concentration en protéine (10 % \pm 1 %) ;
- f) l'éthanol résiduel (ne doit pas dépasser 4,5 %) ;
- g) la turbidité (la préparation doit être transparente et ne doit présenter au plus qu'une légère opalescence).

L'immunoglobuline antirabique est conservée entre 2 et 4°C. La date limite d'utilisation ne doit pas être postérieure de plus de 2 ans à la date de la détermination de l'activité protectrice.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Selimov, M. A., Durasova, M. N., Rogozina, E. N., Ratgauz, V. N. & Majorova, L. I. (1957) *Ž. Mikrobiol. (Mosk.)*, 7, 28
- Nečaeva, A. S. & Ponomareva, N. A. (1956) *Praktičeskoe rukovodstvo po proizvodstvu gammaglobulina* [Manuel pratique de la production de gamma-globuline], Moscou, Medgiz

¹ Qu'on peut se procurer auprès des centres OMS de référence pour la rage (voir appendice 7). Voir également la note au bas de la page 326.

PRÉPARATION D'IMMUNOGLOBULINE ANTIRABIQUE D'ORIGINE HUMAINE

R. K. SIKES¹

L'utilisation d'immunoglobulines homologues chez l'homme comme traitement après exposition élimine virtuellement le risque de réaction anaphylactique et de maladie sérique normalement associé aux sérums hétérologues et à leurs dérivés. En effet, près de 16 % des sujets traités avec un sérum antirabique d'origine équine sont victimes d'une maladie sérique et chez ceux de plus de 15 ans la proportion peut atteindre 46 % (Karliner & Belaval, 1965).

On s'est donc efforcé de produire des immunoglobulines antirabiques d'origine humaine. A l'heure actuelle, plusieurs lots préparés sur une grande échelle se sont statistiquement montrés aussi efficaces que le sérum antirabique d'origine équine dans la prévention de la rage chez les animaux d'expérience (Winkler et al., 1969 ; Sikes, 1969).

Ce chapitre expose en détail les méthodes de préparation des immunoglobulines d'origine humaine adoptées au Center for Disease Control, Atlanta, Etats-Unis d'Amérique.

Deux problèmes majeurs doivent être surmontés :

- 1) la difficulté de disposer de donneurs dont le titre d'anticorps est d'au moins 1 : 400 ;
- 2) le coût de la préparation d'une telle globuline, qui est encore très élevé.

Formule

L'immunoglobuline antirabique humaine (IGRH), destinée à l'administration intramusculaire, est une solution d'immunoglobuline à $16,5 \pm 1,5$ %, dans de la glycine à 0,3 M, additionnée d'une solution de thiomersal² à 1 : 10 000, comme agent de conservation.

Source et transport du sang

Les donneurs de plasma pour la production d'IGRH doivent présenter des titres élevés d'anticorps neutralisants, à la suite d'une immunisation

¹ Veterinary Director, Office of Veterinary Public Health Services, Center for Disease Control, Atlanta, Ga., Etats-Unis d'Amérique.

² Connu aussi sous les noms de thimérosal et merthiolate.

par du vaccin antirabique avant ou après une exposition. Il faut leur administrer une ou deux injections de rappel d'un vaccin antirabique agréé, une à deux semaines avant le premier prélèvement de sang. Pour préparer une IGRH d'activité suffisante (en supposant que les anticorps sont concentrés de 15 à 20 fois pendant la préparation), il est nécessaire d'utiliser au départ un mélange de plasmas contenant 8 à 10 unités d'anticorps antirabique par ml, ou ayant un titre neutralisant de 1 : 700 à 1 : 1000. Des études ont montré qu'une injection de rappel de vaccins antirabiques suscite l'apparition de titres suffisants d'anticorps chez environ 10 % des sujets soumis à une prophylaxie antirabique avant exposition et chez 40 % de ceux qui avaient été traités après exposition.

Le centre de collecte peut obtenir une unité de plasma par plasmaphérèse ou par séparation aseptique à partir d'une unité de sang total. On expédie le plasma à l'état réfrigéré au laboratoire et on le conserve congelé jusqu'à ce qu'il soit prêt à être inclus dans un mélange en vue du fractionnement.

Réactifs

Le mode de préparation et de conservation des réactifs nécessaires est exposé dans l'annexe, page 321.

Technique ¹

On sépare les immunoglobulines du plasma par la technique de fractionnement à l'éthanol à froid, décrite ci-dessous (Cohn et al., 1946).

Précipitation de la fraction 1

1. Réunir les plasmas en versant les échantillons individuels à travers de la gaze dans une cuve tarée suffisamment grande pour contenir 1,2 litre par litre de plasma introduit.

2. Déterminer le pH ; au besoin, l'ajuster entre 7,0 et 7,4 à l'aide d'un tampon à l'acétate (concentré 80 fois) ou d'une solution de phosphate de sodium 0,5 M.

3. Congeler trois échantillons de 15 ml du mélange de plasma.

4. Déterminer le poids du plasma.

5. Refroidir le plasma jusqu'à 0°C et ajouter de l'éthanol à 53,3 % froid, à raison de 163 g par kg de plasma et à un rythme tel que l'addition d'éthanol prenne environ une heure. Refroidir à -2°C pendant cette addition. Remuer pendant une demi-heure après la fin de cette opération.

¹ Les méthodes indiquées dans ce chapitre sont celles du Bureau of Laboratories, Michigan Department of Public Health, East Lansing, Mich., Etats-Unis d'Amérique ; elles ont été adoptées pour le fractionnement de l'IGRH au Center for Disease Control, Atlanta.

6. Centrifuger et introduire dans une cuve tarée suffisamment grande pour contenir 1,7 litre par litre de plasma d'origine. Maintenir la température entre -2° et -3°C pendant la centrifugation. Congeler un échantillon de 15 ml de surnageant I (S1) et le peser. Maintenir à -2°C , et commencer la précipitation de la fraction II-III.

Précipitation de la fraction II-III (P2)

1. Pour chaque kg de surnageant I, ajouter 552 g d'éthanol à 53,3 % contenant 1,33 ml d'un tampon à l'acétate (concentré 80 fois), à un rythme tel que l'addition d'éthanol prenne environ une heure. Refroidir à -9°C pendant l'addition.

2. Remuer à -9°C pendant une demi-heure après la fin de cette opération.

3. Centrifuger, et recueillir le produit de centrifugation dans un bol taré. Maintenir la température entre -6° et -9°C pendant la centrifugation.

4. Déterminer le poids du précipité, qui constitue la fraction II-III (P2). Congeler dans le bol à -20°C , et conserver pour la précipitation de la fraction II-IIIw.

Précipitation de la fraction II-IIIw (P2w)

1. Retirer du bol de la centrifugeuse la fraction P2 congelée et l'homogénéiser rapidement en une suspension uniforme dans un mélange d'eau et de glace pilée, dont on utilisera 2 g par gramme de P2. Eviter la formation d'une mousse excessive.

2. Pour chaque gramme de P2, ajouter immédiatement un mélange contenant 0,107 ml d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) 0,5 M dans 2,89 g d'eau et de glace pilée.

3. Remuer au froid jusqu'à ce que toute la matière solide soit en suspension.

4. Verser dans une cuve contenant 20 g d'eau froide par gramme de P2 et remuer à 1°C pendant 30 minutes, ou jusqu'à ce qu'il ne reste plus de glace dans le mélange. La cuve doit être assez grande pour contenir 4 litres pour 100 g de P2.

5. Retirer de la cuve 5 ml du mélange, ajouter 5 ml d'une solution de chlorure de sodium 0,15 M, et déterminer le pH ; au besoin l'ajuster entre 7,0 et 7,4 par addition d'un tampon à l'acétate (concentré 80 fois) ou d'une solution d'hydrogénophosphate de sodium 0,5 M.

6. Congeler un échantillon de 15 ml.

7. Ajouter 14,1 g d'éthanol à 53,3 % par gramme de P2 à un rythme tel que l'addition d'éthanol demande environ une heure. Refroidir à -6°C

pendant cette addition. Remuer à -6°C pendant 2 à 4 heures après la fin de cette opération.

8. Centrifuger et recueillir le produit dans un bol taré. Maintenir la température entre -5° et -7°C pendant la centrifugation.

9. Congeler un échantillon de 15 ml du surnageant II-IIIw (S2w).

10. Déterminer le poids du précipité, qui représente la fraction II-IIIw (P2w), le congeler dans le bol à -20°C , et le réserver pour la précipitation de la fraction III.

Précipitation de la fraction III

1. Retirer du bol le P2w congelé et l'homogénéiser rapidement en une suspension uniforme dans un mélange d'eau et de glace pilée dont on utilisera 2 g par gramme de P2w. Eviter la formation d'une mousse excessive.

2. Ajouter immédiatement 2 ml d'une solution froide d'acétate de sodium 0,175 M par gramme de P2w, et remuer au froid jusqu'à ce que toute la matière solide soit en suspension.

3. Ajuster le pH à $5,2 \pm 0,1$ par addition de tampon à l'acétate (concentré 80 fois), dilué à 1 : 25 dans de l'eau froide, puis ajouter à nouveau de l'eau froide jusqu'à ce que la quantité totale ajoutée soit de 1 ml par gramme de P2w.

4. Remuer au froid pendant une heure ou jusqu'à ce qu'il ne reste plus de glace dans le mélange. Déterminer le pH et l'ajuster si nécessaire entre 5,1 et 5,3.

5. Verser dans une cuve contenant 13,5 g d'eau froide par gramme de P2w. La cuve doit être suffisamment grande pour contenir 2,9 litres pour 100 g de P2w.

6. Ajouter 8,1 g d'éthanol à 53,5 % par gramme de P2w, à un rythme tel que l'addition d'éthanol demande environ une heure. Refroidir à -6°C pendant cette addition.

7. Remuer à -6°C pendant une demi-heure après la fin de cette opération.

8. Centrifuger et introduire dans un réservoir sous pression froid, puis filtrer dans une cuve tarée, qui doit être assez grande pour contenir 3,1 litres pour 100 g de P2w. Utiliser un préfiltre « Versapor »¹ de 1,2 μm , ou au-dessus d'une membrane de 0,8 μm . Maintenir la température entre -5° et -6°C pendant la centrifugation et la filtration.

9. Congeler un échantillon de 15 ml de surnageant III (S3).

¹ Filtre de verre renforcé d'époxy, que l'on peut se procurer chez Gelman Instrument Co., Ann Arbor, Mich., Etats-Unis d'Amérique. Les préfiltres de type G (voir page suivante) peuvent être obtenus dans le même établissement.

10. Déterminer le poids de S3, le conserver à -6°C , pour effectuer la précipitation de la fraction II.

Précipitation de la fraction II

1. Agiter S3 vigoureusement à -6°C , et pour chaque kg de cette solution ajouter lentement 2 g d'hydrogéo-carbonate de sodium.

2. Ajouter 2 ml du mélange contenu dans la cuve à 8 ml de soluté salin 0,15 M, et déterminer le pH ; si nécessaire ajouter à nouveau de l'hydrogéo-carbonate de sodium pour amener le pH à $7,4 \pm 0,2$.

3. Ajouter 94,7 g d'éthanol à 95 %, par kg de solution, à un rythme tel que l'addition d'éthanol demande environ une heure. Refroidir jusqu'à -9°C pendant cette addition.

4. Centrifuger, et recueillir le produit dans un bol taré. Maintenir la température entre -6° et -9°C pendant la centrifugation.

5. Déterminer le poids de la fraction II, la congeler à -20°C dans le bol, et la conserver pour la lyophilisation.

Lyophilisation de la fraction II et préparation finale

1. Retirer du bol la fraction II congelée et l'homogénéiser rapidement en une suspension pâteuse uniforme dans de la glycine froide 0,03 M dont on utilisera 1 ml par gramme de pâte congelée.

2. Ajouter 4 g d'eau¹ froide par gramme de pâte ; mélanger pendant 2 à 4 heures à froid, et laisser reposer pendant la nuit à 0°C , sans agiter.

3. Décanter le surnageant, le lyophiliser, et déterminer le poids du produit lyophilisé.

4. Pour préparer la solution finale du produit, on calcule les quantités comme suit :

a) Poids de poudre à l'état sec = poids de poudre lyophilisée (g) $\times 0,98$.

b) Volume de poudre (ml) = $a \times 0,75$.

c) Volume d'eau à ajouter (ml) = ml de glycine ajoutés avant lyophilisation $- b$.

d) Poids de globuline à l'état sec (g) = $a - (0,0225 \times \text{ml de glycine ajoutés avant lyophilisation})$.

e) Volume final (ml) = $\frac{d}{0,17}$

f) Volume de glycine 0,03 M à ajouter (ml) = $e - b - c$.

g) Volume de thiomersal à 10 % à ajouter (ml) = $e \times 10^{-3}$.

5. Mettre les volumes nécessaires d'eau (c)¹ et de glycine 0,3 M (f) dans un bécher muni d'un barreau pour agitateur magnétique et y ajouter

¹ Utiliser de l'eau pour soluté injectable ; voir note au bas de la page 321.

la globuline lyophilisée. Agiter pour mettre en solution ; éviter la formation excessive de mousse.

6. Ajouter le volume nécessaire de thiomersal à 10 % (g). Une seconde personne doit vérifier ce calcul et surveiller l'addition. Déterminer le pH et si nécessaire l'ajuster à 6,8 avec un tampon à l'acétate, concentré 80 fois.

7. Filtrer la solution de globuline à travers une membrane de 0,8 μm , avec un préfiltre « Versapor » de 1,2 μm et un préfiltre de verre de type G¹.

8. Dans la chambre stérile, stériliser la solution de globuline par filtration dans le récipient pour le produit en vrac.

9. Effectuer l'épreuve de stérilité sur le produit en vrac avec un échantillon de 2 ml et du milieu au thioglycolate liquide.

10. Réfrigérer le produit en vrac contenu dans le récipient et le conserver pour la répartition en récipients définitifs.

Contrôle

Il est nécessaire d'effectuer des épreuves d'innocuité, de stérilité, de recherche des substances pyrogènes, de thermostabilité, de détermination du pH et de turbidité pour s'assurer que le produit satisfait aux normes nationales minimales. En ce qui concerne les normes minimales d'activités, voir au chapitre 40, p. 323.

Annexe

PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

Sauf indication contraire, on utilise des produits chimiques de qualité pour réactifs.

Eau distillée

On recueille l'eau de l'alambic directement dans un réservoir pour filtration sous pression, et on la filtre à travers une membrane stérile de 0,2 μm , dans un récipient de distribution stérile. Cette eau est utilisée pour toutes les opérations et pour la préparation de la glace ainsi que des réactifs, sauf lorsqu'il est prescrit d'utiliser de l'eau pour soluté injectable¹ laquelle doit être apyrogène.

¹ Voir *Spécifications pour le contrôle de la qualité des préparations pharmaceutiques — deuxième édition de la Pharmacopée Internationale*, Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1967, p. 52.

Ethanol à 95 % (v/v)

Filtrer l'éthanol à 95 % à travers une membrane de 0,2 µm (non stérile) dans des récipients de distribution et conserver sous réfrigération (en chambre froide).

Ethanol à 53,3 % (v/v)

Ajouter 5060 g d'eau à 4940 g d'éthanol à 95 %. Filtrer le mélange à travers une membrane de 0,2 µm (non stérile) et conserver sous réfrigération (en chambre froide). Mesurer la densité avec un hydromètre 60°F/60°F à 15°C ; elle doit être comprise entre 0,9275 et 0,9285.

Tampon à l'acétate, concentré 80 fois

Dissoudre 108,9 g d'acétate de sodium et 240,2 g d'acide acétique glacial dans de l'eau, puis compléter jusqu'à un litre. Cela donne un produit concentré 80 fois. Quand on dilue ce concentré avec 80 volumes d'eau, le pH du tampon doit être de $4,00 \pm 0,02$.

Phosphate de sodium 0,5 M

Dissoudre 71 g d'hydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4 ou 89,1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau et compléter jusqu'à un litre. Le pH de cette solution doit être de 9,2. Conserver à température ambiante.

Acétate de sodium 0,175 M

Dissoudre 23,8 g d'acétate de sodium dans l'eau et compléter jusqu'à un litre.

Glycine 0,3 M

On ne doit utiliser que de la glycine qui a été reconnue apyrogène. Une solution 0,3 M contient 22,5 g de glycine par litre. Utiliser de l'eau pour soluté injectable¹ pour la préparation de cette solution qui doit être extemporanée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L., Jr, Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M. & Taylor, H. L. (1946) *J. Amer. chem. Soc.*, **68**, 459.
Karlner, J. S. & Belaval, G. S. (1965) *J. Amer. med. Ass.*, **193**, 109
Sikes, R. K. (1969) *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*, **84**, 787

¹ Voir note au bas de la page 321.

TITRAGE ET ÉPREUVE D'ACTIVITÉ DU SÉRUM ET DE L'IMMUNOGLOBULINE ANTIRABIQUES

*P. ATANASIU*¹

Principe

La méthode décrite ci-après consiste à neutraliser une dose constante de virus rabique d'épreuve préalablement titré par des quantités variables de sérum, obtenues par dilution. Utilisée principalement pour le titrage et l'épreuve d'activité des sérums et de l'immunoglobuline antirabiques thérapeutiques, cette méthode est applicable à tout sérum renfermant des anticorps rabiques. Elle permet notamment de déterminer les titres des sérums humains recueillis lors des essais de différents vaccins.

Elle comprend les 3 stades suivants :

1. Préparation et titrage du virus d'épreuve.
2. Séroneutralisation du virus : préparation du sérum, des mélanges sérum-virus et inoculation des souris.
3. Interprétation des résultats.

L'épreuve de séroneutralisation par la technique de réduction des plages est décrite dans le chapitre 9, p. 116.

1. Préparation et titrage du virus d'épreuve

Virus d'épreuve

Le virus rabique utilisé est habituellement le même que celui qui est employé pour éprouver les souris dans le contrôle d'activité du vaccin anti-rabique (voir chapitre 33, page 287), c'est-à-dire le virus souche CVS. Ce peut être aussi la souche de virus fixe du laboratoire, à condition que sa DL_{50} pour la souris soit bien connue et demeure constante.

Titration du virus stock

Le virus d'épreuve est conservé sous forme d'une suspension à 20 % répartie en ampoules et congelée à basse température. Pour pratiquer

¹ Chef du Laboratoire des Recherches sur la Rage et les Rhabdovirus, Institut Pasteur, Paris, France.

l'épreuve, on prélève une ampoule que l'on décongèle rapidement sous l'eau du robinet, et l'on prépare des dilutions de raison 10, soit : 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , etc., jusqu'à 2×10^{-7} . Le diluant employé est l'eau bidistillée additionnée de 2 % de sérum équin normal, inactivé pendant 30 minutes à 56°C .

On prend 5 tubes à hémolyse et l'on introduit dans chacun 0,05 ml d'une dilution de 2×10^{-3} à 2×10^{-7} . On ajoute ensuite dans chaque tube 0,5 ml de sérum de cheval, inactivé et dilué à 1 : 5, si bien que les dilutions finales dans les 5 tubes sont respectivement : 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} .

Après agitation, les mélanges sont incubés pendant 1½ heure à 37°C afin que les conditions soient les mêmes que lors de la séroneutralisation du virus. On refroidit alors les tubes dans un bac d'eau avec de la glace et l'on inocule par voie intracérébrale, à la dose de 0,03 ml, cinq souris pour chaque dilution. On peut procéder en utilisant toujours la même seringue si l'on a soin de commencer par la dilution la plus étendue. On note le nombre de souris qui meurent entre le 6^e et le 20^e jour après l'inoculation.

Pour le calcul du titre du virus, voir appendice 1, tableau 1 (p. 333), exemples 1 à 3.

Calcul des doses d'épreuve

Comme exemple de calcul des doses d'épreuve, supposons qu'une préparation stock donnée de CVS contient $10^{-5,84}$ DL₅₀ pour 0,03 ml, c'est-à-dire que 1 DL₅₀ est contenue dans 0,03 ml d'une dilution à $10^{-5,84}$ du virus stock. Dans le cas des sérums de titre élevé, on emploie entre 100 et 300 DL₅₀ pour le titrage par séroneutralisation du virus. Pour trouver la dilution de CVS qui contiendra 300 DL₅₀ dans 0,03 ml, on soustrait le logarithme de 300 du logarithme du titre présumé de la préparation stock¹ :

$$\log \text{ dilution de la préparation d'épreuve contenant } 300 \text{ DL}_{50} \text{ de virus par } 0,03 \text{ ml} = \log 10^{-5,84} - \log 300 = 5,84 - 2,48 = 3,36.$$

Puisque $3,36 = \log 2300$, il faudra donc diluer la préparation stock de CVS à 1 : 2300. A cette fin, faire d'abord des dilutions en série de 10 en 10 du stock de CVS jusqu'à ce que l'on obtienne une dilution à 10^{-3} , puis ajouter 1,3 ml de diluant pour chaque ml de la dilution à 10^{-3} . La dilution finale contiendra alors 300 DL₅₀ de virus pour 0,03 ml.

Dans le cas des sérums de faible titre (par exemple, les sérums humains après vaccination), il convient parfois de n'utiliser que 50 DL₅₀. Le calcul devient alors :

$$\log 10^{-5,84} - \log 50 = 5,84 - 1,70 = 4,14$$

Puisque $4,14 = \log 14\,000$, il faudra diluer la préparation stock de CVS à 1 : 14 000 ; à cette fin on pratique des dilutions de raison 10 jusqu'à

¹ Dans ces calculs, on ne tient pas compte des signes « moins » précédant les logarithmes.

ce que l'on arrive à la dilution de 10^{-4} , puis on ajoute encore 0,4 ml de diluant pour chaque ml de cette dilution ; on obtient ainsi une dilution finale contenant 50 DL₅₀ de virus pour 0,03 ml.

2. Séroneutralisation du virus

Inactivation

Les sérums à éprouver sont inactivés pendant 30 minutes à 56°C.

Neutralisation

On prépare les dilutions en série ci-après du sérum ou de l'immunoglobuline à éprouver : 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000 et 1 : 4000, etc., la dilution finale ne devant pas donner de neutralisation¹. Dans chaque tube d'une série, on place 0,5 ml d'une dilution de sérum. Chaque tube reçoit ensuite 0,5 ml de virus à la dilution renfermant 300 DL₅₀, soit, pour l'exemple précédent, la dilution à 1 : 2300. Cette opération a pour effet de diluer de moitié virus et sérum ; les dilutions finales sont donc 1 : 4600, ou $10^{-3,66}$, pour le virus, et 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000, etc., pour le sérum.

Il est recommandé d'introduire dans l'épreuve un sérum de référence qui est titré parallèlement aux sérums inconnus. Ce sérum de référence, de titre connu, a été préalablement titré par comparaison avec l'étalon international² et conservé au laboratoire avec les précautions d'usage. Son utilisation est obligatoire si l'on veut exprimer les résultats de l'épreuve en unités internationales (UI)

Titrage du témoin virus

Il est indispensable de déterminer la quantité effective de virus utilisée dans la réaction. A cette fin, on mélange 0,5 ml de virus d'épreuve (dilution 1 : 2300 = 300 DL₅₀ pour 0,03 ml) avec 0,5 ml de diluant contenant 20 % de sérum équin normal inactivé. On obtient ainsi une dilution du virus d'épreuve qui contient 150 DL₅₀ pour 0,03 ml. Ce tube est marqué « 0 » et l'on prépare 3 dilutions en série de raison 10 que l'on marque : -1, -2, et -3. Après agitation les tubes renfermant les sérums à éprouver, les tubes témoins sont placés à l'étuve à 37°C pendant 1½ heure.

Inoculation des souris

Après 1½ heure d'incubation à 37°C, on place tous les tubes dans un bac rempli d'eau glacée et l'on inocule, par voie intracérébrale, des souris pesant

¹ Si le niveau des anticorps est probablement assez bas, comme chez les sujets humains vaccinés, on emploiera les dilutions de sérum commençant par 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125, et la dilution finale du virus devra correspondre à 20-50 DL₅₀.

² Voir note au bas de la page suivante.

14 à 16 g, à raison de 0,03 ml par animal et de 5 souris par dilution. On opère ainsi pour les sérums à éprouver comme pour le témoin virus. Lorsque l'expérience porte sur un grand nombre de sérums, on a soin d'inoculer les dilutions de témoin virus après avoir inoculé la moitié des sérums à éprouver de façon que la durée moyenne de conservation du témoin virus et celle des sérums à éprouver soient égales. Les divers groupes d'animaux, placés séparément dans des bocaux étiquetés, sont ensuite mis en observation et l'on note le nombre de souris qui meurent entre le 6^e et le 20^e jour.

3. Calcul et interprétation des résultats

A titre d'exemple, voici les résultats obtenus dans le titrage d'un sérum thérapeutique expérimental avec des dilutions du virus stock correspondant à l'exemple de la page 324.

Détermination du nombre réel de DL_{50} utilisées dans l'épreuve

<i>Tube</i>	<i>Mortes</i>	<i>Survivantes</i>
0	5	0
-1	5	0
-2	4	1
-3	0	5

Si l'on calcule comme dans l'exemple 2, appendice 1 (tableau 1, p. 333 et tableau 5, p. 336), on trouve que la dilution correspondant au point 50 % du virus est $10^{-2,3}$. L'antilog de 2,3 (= 200) est le nombre réel de DL_{50} utilisées dans les mélanges réactifs de l'épreuve de neutralisation.

Calcul de la DE_{50} du sérum à expertiser

Ce calcul est illustré dans l'appendice 1, par l'exemple 7, tableau 2, p. 333 ; facteur de dilution = 1 : 2. Dans cet exemple, on détermine le nombre total de survivantes et l'on évalue le point 50 % en utilisant le tableau 3 (p. 334). Pour le sérum à expertiser, la DE_{50} ainsi trouvée est $10^{-3,21}$ ou 1 : 1620. On évalue de la même façon la DE_{50} du sérum de référence d'après les tableaux.

L'exemple 8 dans l'appendice 1, p. 333, permet d'illustrer le calcul de la DE_{50} d'un sérum de titre faible dilué à 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125 et 1 : 625. Cette gamme de dilutions est souvent utilisées pour le titrage des anticorps postvaccinaux dans les sérums humains (voir note en bas de la page 325). Dans l'exemple cité, la DE_{50} (ou titre d'anticorps) trouvée est $10^{-2,10}$ ou 1 : 125.

Le nombre d'unités internationales (UI) contenues dans l'étalon international de sérum antirabique est fixé arbitrairement à 80 par ml¹. Pour

¹ C'est à dire à un chiffre rond pour simplifier les calculs. En réalité, l'étalon international de sérum antirabique contient 86,6 mg de sérum desséché par ampoule, ce qui équivaut à 86,6 UI. Les laboratoires nationaux peuvent le recevoir sur demande adressée au Laboratoire international d'Etalons biologiques, Statens Seruminstitut, Copenhague, Danemark.

exprimer en UI l'activité du sérum à expertiser, il faut comparer son pouvoir neutralisant avec celui de l'étalon international ou celui d'un sérum de référence élaboré par rapport à l'étalon international. A cette fin on calcule la différence entre les logarithmes des points 50 % des deux sérums. Ainsi, dans l'exemple 7 déjà cité, le point 50 % du sérum à expertiser est $10^{-3,21}$. Si l'on suppose que le point 50 % du sérum de référence est $10^{-3,19}$, on a :

$$-3,19 - (-3,21) = 0,02.$$

Le sérum à expertiser est donc $10^{0,02} = 1,05$ fois plus actif que le sérum de référence ; son activité est par conséquent : $1,05 \times 80 = 84$ UI par ml.

Epreuve d'activité thérapeutique

Le sérum antirabique doit satisfaire aux normes énoncées dans le quatrième rapport du Comité OMS d'experts de la Rage¹, à savoir :

Un sérum est considéré comme ayant satisfait à l'épreuve d'activité thérapeutique si, lors d'un essai comparatif unique, il s'est révélé égal ou supérieur au sérum étalon international. Un sérum qui ne satisfait pas à l'épreuve peut être soumis à deux autres essais analogues. Si, lors de ces deux essais supplémentaires, le sérum se révèle égal ou supérieur au sérum étalon international, il est considéré comme ayant satisfait à l'épreuve. Il y a résultat « égal » ou « supérieur » quand la proportion totale des souris survivantes (nombre de souris survivantes/nombre total des souris) pour le sérum soumis à l'épreuve est égale ou supérieure à la proportion correspondante pour le sérum étalon.

Ces normes s'appliquent également à l'immunoglobuline.

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1960, **201**, 10.