

PARTIE VII

APPENDICES

MÉTHODES DE CALCUL

R. J. LORENZ¹ & K. BÖGEL²

A. MÉTHODES DE SPEARMAN-KÄRBER

Cette méthode est fondée sur une idée avancée dès 1908 par Spearman et développée ultérieurement par Kärber (1931). Elle a été perfectionnée par Finney (1952). On trouvera pages 337-339, la description du mode de calcul des dilutions correspondant aux points 50 % selon la formule de Spearman-Kärber, mais grand avantage de la méthode, cette opération assez longue peut être évitée par l'emploi de simples tables, à condition de ne pas avoir à tenir compte de morts accidentelles parmi les animaux d'expérience (voir ci-dessous). Cette méthode ayant aussi un degré de précision relativement élevé, elle est de plus en plus utilisée en virologie³.

Procédé à l'aide des tableaux

D'après la formule donnée à la page 337, chaque indicateur positif (souris) augmente le logarithme du point 50 % d'une valeur numérique constante, à condition que le facteur de dilution et le nombre d'animaux inoculés par dilution soient tous deux constants.

Le \log_{10} de la dilution correspondant au point 50 % s'obtient donc par simple addition de deux valeurs (tableaux 1 et 2), la première tirée de la plus faible dilution de virus, de sérum ou de vaccin, c'est-à-dire celle pour laquelle tous les animaux sont positifs, la seconde en rapport avec la somme des animaux positifs (« positifs ») tant à cette dilution qu'à toutes les dilutions plus élevées. Cette seconde valeur se lit immédiatement à partir des tableaux 3 à 5 (pages 334-336) préparés pour différents facteurs de dilution et différents nombres (n) d'animaux inoculés par dilution.

Ce procédé permet également une évaluation rapide de l'erreur qui pourrait être due à des morts accidentelles. Dans un premier calcul, ces morts accidentelles sont comptées avec les « positifs » et dans un second

¹ Institut fédéral des Maladies animales à Virus, Tübingen, République fédérale d'Allemagne.

² Santé publique vétérinaire, Division des Maladies transmissibles, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse.

³ Certains virologistes pouvant encore préférer l'emploi de la méthode de Reed & Muench, exposée dans les éditions précédentes de cette monographie, cette méthode est également décrite pages 339-342.

calcul avec les « négatifs ». Si l'un ou l'autre des titres influe sur l'interprétation du résultat (comme dans le cas des valeurs marginales obtenues dans les tests d'activité), l'épreuve doit être répétée (voir aussi « Considérations particulières », page 338).

Manière d'opérer

Les valeurs numériques attribuées aux « positifs » pour les différents facteurs de dilution et les différentes valeurs de n sont présentées dans les tableaux 3 à 5 (pages 334–336).

Les animaux positifs peuvent être soit ceux qui meurent soit ceux qui survivent, selon le type d'épreuve, ainsi :

1) *Ce sont les animaux morts qui sont comptés comme positifs dans les cas ci-après :*

- a) titrage de vaccin à virus vivant (chapitres 19, 26, 27, 34) ;
- b) titrage du virus d'épreuve dans le test NIH (chapitre 33) ;
- c) titrage du virus d'épreuve pour le titrage et l'épreuve d'activité du sérum antirabique (chapitre 40) ;
- d) la détermination de l'indice de neutralisation du virus (chapitre 8) ; et
- e) le test de Habel ainsi que le test de Habel modifié (chapitres 31, 32).

2) *Ce sont les animaux survivants qui sont comptés comme positifs dans les cas ci-après :*

- a) titrage de sérums par la technique « dilution du sérum — virus constant » (chapitre 40) ;
- b) détermination de la valeur antigénique d'un vaccin par la technique « dilution du vaccin — virus constant » (test NIH, chapitre 40).

Le calcul de la dilution correspondant au point 50 % comprend les étapes suivantes :

Etape 1 : Noter le \log_{10} de l'inverse de la plus faible dilution (de virus, de sérum ou de vaccin), celle pour laquelle tous les animaux sont positifs (c'est-à-dire si la dilution est 10^{-3} , prendre \log_{10} de $10^3 = 3$).

Etape 2. Déterminer la somme des animaux positifs à la dilution définie à l'étape 1 et à toutes les dilutions plus poussées.

Etape 3. Lire dans le tableau correspondant au facteur de dilution utilisé la valeur numérique attribuée au nombre d'animaux positifs déterminés à l'étape 2.

Etape 4. Additionner les valeurs déterminées dans les étapes 1 et 3. Ce total représente le \log_{10} de l'inverse de la dilution point 50 %.

**TABLEAU 1. EXEMPLES DE TITRAGE DE SUSPENSIONS DE VIRUS
(LES ANIMAUX POSITIFS SONT CEUX QUI MEURENT)**

	Exemple 1 <i>n</i> = 5	Exemple 2 <i>n</i> = 5	Exemple 3 <i>n</i> = 5	Exemple 4 <i>n</i> = 10	Exemple 5 <i>n</i> = 10	Exemple 6 <i>n</i> = 4
<i>Dilution (facteur de dilution = 10):</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>pos. nég.</i>
10 ⁻¹	— —	5 0	— —	6 4	— —	4 0
10 ⁻²	— —	4 1	— —	5 5	— —	3 1
10 ⁻³	5 0	0 5	5 0	7 3	— —	1 3
10 ⁻⁴	4 1	— —	5 0	2 8	— —	0 4
10 ⁻⁵	5 0	— —	5 0	0 10	10 0	0 4
10 ⁻⁶	2 3	— —	0 5	— —	6 4	— —
10 ⁻⁷	0 5	— —	0 5	— —	1 9	— —
<i>Étapes de calcul</i>						
1	3,0	1,0	5,0	0,0 ^a	5,0	1,0
2	16	9	5	30 ^a	17 ^b	8
3 ^c	2,7	1,3	0,5	2,5	1,2	1,50
4	5,7	2,3	5,5	2,5	6,2	2,50
<i>Dilution point final</i>	10 ^{-5,7}	10 ^{-2,3}	10 ^{-5,5}	10 ^{-2,5}	10 ^{-6,2}	10 ^{-2,5}

^a On suppose que la dilution la plus faible, c'est-à-dire à laquelle tous les animaux sont constamment positifs, est 10^{0,0} (suspension virale non diluée), ce qui peut se justifier dans cet exemple, car la gamme des dilutions du virus pour lesquelles il y a aussi bien des positifs que des négatifs ne correspond habituellement qu'à un intervalle de 2 à 3 dilutions de 10 en 10.

^b On suppose qu'il n'y aurait pas eu de positifs pour des dilutions plus poussées que 10⁻⁷, si on les avait éprouvées.

^c Voir tableau 5.

**TABLEAU 2. EXEMPLES DE TITRAGE DE SÉRUMS ET DE VACCINS
(LES ANIMAUX POSITIFS SONT CEUX QUI SURVIVENT)**

Sérum			Vaccin		
Exemple 7 <i>n</i> = 5 (facteur de dilution = 2)		Exemple 8 <i>n</i> = 6 (facteur de dilution = 5)	Exemple 9 <i>n</i> = 16 (facteur de dilution = 5)		
<i>Dilution</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>Dilution</i>	<i>pos. nég.</i>	<i>Dilution</i>	<i>pos. nég.</i>
10 ^{-2,7}	5 0	10 ^{-0,7}	6 0	10 ^{-0,7}	10 6
10 ^{-3,0}	4 1	10 ^{-1,4}	5 1	10 ^{-1,4}	8 8
10 ^{-3,3}	1 4	10 ^{-2,1}	4 2	10 ^{-2,1}	1 15
10 ^{-3,6}	1 4	10 ^{-2,3}	0 6		
10 ^{-3,9}	0 5				
<i>Étapes de calcul:</i>		<i>Étapes de calcul:</i>		<i>Étapes de calcul:</i>	
1	2,70	1	0,70	1	0,0 ^a
2	11	2	15	2	35
3 ^b	0,51	3 ^c	1,40	3 ^c	1,18
4	3,21	4	2,10	4	1,18
<i>Dilution point final</i>	10 ^{-3,21}	<i>Dilution point final</i>	10 ^{-2,10}	<i>Dilution point final</i>	10 ^{-1,18^a}

^a Il n'est nullement certain que 16 animaux sur 16 auraient survécu (comme on le suppose ici) si on les avait inoculés avec le vaccin non dilué. L'estimation de la dilution correspondant au point final est donc très approximative et constitue probablement une surévaluation.

^b Voir tableau 3.

^c Voir tableau 4.

**TABLEAU 3. VALEURS NUMÉRIQUES POUR LE CALCUL DES TITRES :
FACTEUR DE DILUTION – 2**

Nombre total d'animaux positifs	Nombre d'animaux inoculés par dilution		
	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 6
4	0,15		
5	0,23	0,15	
6	0,30	0,21	0,15
7	0,38	0,27	0,20
8	0,45	0,33	0,25
9	0,53	0,39	0,30
10	0,60	0,45	0,35
11	0,68	0,51	0,40
12	0,75	0,57	0,45
13	0,83	0,63	0,50
14	0,90	0,69	0,55
15	0,98	0,75	0,60
16	1,05	0,81	0,65
17	1,13	0,87	0,70
18	1,20	0,93	0,75
19	1,28	0,99	0,80
20	1,35	1,05	0,85
21	1,43	1,11	0,90
22	1,51	1,17	0,95
23	1,58	1,23	1,00
24	1,66	1,29	1,05
25	1,73	1,35	1,10
26	1,81	1,41	1,15
27	1,88	1,48	1,20
28	1,96	1,54	1,25
29	2,03	1,60	1,30
30	2,11	1,66	1,35
31	Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,075	1,72	1,40
32		1,78	1,45
33		1,84	1,51
34		1,90	1,56
35		1,96	1,61
36		2,02	1,66
37		2,08	1,71
38		2,14	1,76
39		2,20	1,81
40		2,26	1,86
		Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,060	Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,050

**TABLEAU 4. VALEURS NUMÉRIQUES POUR LE CALCUL DES TITRES :
FACTEUR DE DILUTION – 5**

Nombre total d'animaux positifs	Nombre d'animaux inoculés par dilution			
	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 16
4	0,35			
5	0,52	0,35		
6	0,70	0,49	0,35	
7	0,87	0,63	0,47	
8	1,05	0,77	0,58	
9	1,22	0,91	0,70	
10	1,40	1,05	0,82	
11	1,57	1,19	0,93	
12	1,75	1,33	1,05	
13	1,92	1,47	1,16	
14	2,10	1,61	1,28	
15	2,27	1,75	1,40	
16	2,45	1,89	1,51	0,35
17	2,62	2,03	1,63	0,39
18	2,80	2,17	1,75	0,44
19	2,97	2,31	1,86	0,48
20	3,15	2,45	1,98	0,52
21	Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,175	2,59	2,10	0,57
22		2,73	2,21	0,61
23		2,87	2,33	0,66
24		3,01	2,45	0,70
25		3,15	2,56	0,74
26		3,29	2,68	0,79
27		3,42	2,80	0,83
28		3,56	2,91	0,87
29		3,70	3,03	0,92
30		3,84	3,15	0,96
31	Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,140	3,26	3,26	1,00
32		3,38	3,38	1,05
33		3,49	3,49	1,09
34		3,61	3,61	1,14
35		3,73	3,73	1,18
36		3,84	1,22	
37			1,27	
38			1,31	
39			1,35	
40			1,40	
41			1,44	
42			1,49	
43			1,53	
44			1,57	
45			1,62	
			Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,0437	

**TABLEAU 5. VALEURS NUMÉRIQUES POUR LE CALCUL DES TITRES:
FACTEUR DE DILUTION = 10**

Nombre total d'animaux positifs	Nombre d'animaux inoculés par dilution				
	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 10
4	0,50				
5	0,75	0,5			
6	1,00	0,7	0,50		
7	1,25	0,9	0,67		
8	1,50	1,1	0,83	0,50	
9	1,75	1,3	1,00	0,63	
10	2,00	1,5	1,17	0,75	0,5
11	2,25	1,7	1,33	0,88	0,6
12	2,50	1,9	1,50	1,00	0,7
13	2,75	2,1	1,67	1,13	0,8
14	3,00	2,3	1,83	1,25	0,9
15	3,25	2,5	2,00	1,38	1,0
16	3,50	2,7	2,17	1,50	1,1
17	3,75	2,9	2,33	1,63	1,2
18	4,00	3,1	2,50	1,75	1,3
19	4,25	3,3	2,67	1,88	1,4
20	4,50	3,5	2,83	2,00	1,5
21	4,75	3,7	3,00	2,13	1,6
22	5,00	3,9	3,17	2,25	1,7
23	5,25	4,1	3,33	2,38	1,8
24	5,50	4,3	3,50	2,50	1,9
25	5,75	4,5	3,67	2,63	2,0
26		4,7	3,83	2,75	2,1
27	Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,25	4,9	4,00	2,88	2,2
28		5,1	4,17	3,00	2,3
29		5,3	4,33	3,13	2,4
30		5,5	4,50	3,25	2,5
31		Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,2	4,67	3,38	2,6
32			4,83	3,50	2,7
33			5,00	3,63	2,8
34			5,17	3,75	2,9
35			5,33	3,88	3,0
36			Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,167	4,00	3,1
37				4,13	3,2
38				4,25	3,3
39				4,38	3,4
40				4,50	3,5
41				Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,125	3,6
42					3,7
43					3,8
44					3,9
45					4,0
					Pour chaque animal positif en surplus ajouter 0,1

Procédé utilisant la formule de Spearman-Kärber

Lorsque la technique simplifiée décrite ci-dessus est inapplicable, par exemple s'il y a réduction de la valeur de n pour une ou plusieurs dilutions, du fait de morts accidentelles, il faut calculer la dilution correspondant au point final à partir de la formule de Spearman-Kärber :

$$\log_{10} \text{ dilution terminale} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right)$$

où :

x_0 = \log_{10} de l'inverse de la plus faible dilution, celle pour laquelle tous les animaux sont positifs

d = \log_{10} du facteur de dilution

n_i = nombre d'animaux utilisés à chaque dilution (après soustraction des morts accidentelles)

r_i = nombre d'animaux positifs (parmi n_i).

L'addition commence à la dilution x_0 .

Exemple 10. Dilution terminale d'une suspension de virus

dilution	$10^{-3,6}$	$10^{-4,6}$	$10^{-5,6}$	$10^{-6,6}$	$10^{-7,6}$
positifs (r_i)	5	5	0	1	0
inoculés (n_i)	5	5	5	4	5

$x_0 = 4,6$; $d = 1,0$

$$\begin{aligned} \log_{10} \text{ de la dilution terminale} &= - \left[4,6 - \frac{1,0}{2} + 1,0 \left(\frac{5}{5} + \frac{0}{5} + \frac{1}{4} + \frac{0}{5} \right) \right] \\ &= -(4,6 - 0,5 + 1,25) \\ &= -5,35 \end{aligned}$$

Dilution terminale = $10^{-5,35}$

Exemple 11. Dilution terminale du vaccin, test d'activité NIH

dilution	$10^{-0,7}$	$10^{-1,4}$	$10^{-2,1}$	$10^{-2,8}$
r_i	10	8	1	0
n_i	15	14	16	15

Si l'on admet qu'à la dilution $10^{-0,0}$, on aurait inoculé 16 animaux et que tous auraient été positifs, on a $x_0 = 0,0$ et $d = 0,7$, et

$$\begin{aligned} \log_{10} \text{ de la dilution terminale} &= \\ &= - \left[0,0 - \frac{0,7}{2} + 0,7 \times \left(\frac{16}{16} + \frac{10}{15} + \frac{8}{14} + \frac{1}{16} + \frac{0}{15} \right) \right] \\ &= -(-0,35 + 0,7 \times 2,30) = -1,26 \end{aligned}$$

Mais, bien entendu, il ne s'agit là que d'une estimation approximative fondée sur une hypothèse peut-être fautive. Il est également possible que si l'on avait inoculé des animaux avec le vaccin non dilué, tous n'auraient pas été positifs, ce qui aurait donné une dilution terminale plus faible.

Supposons que l'épreuve soit répétée, mais en commençant avec le vaccin non dilué, et que les résultats soient les suivants :

Dilution	$10^{-0,0}$	$10^{-0,7}$	$10^{-1,4}$	$10^{-2,1}$	$10^{-2,8}$
r_i	13	9	9	0	0
n_i	15	15	13	14	15

Même avec le vaccin non dilué, tous les animaux traités n'ont pas été protégés, mais il semble raisonnable, d'après ces résultats plus complets, de supposer que la dilution immédiatement à la gauche de $10^{-0,0}$ (c'est-à-dire $10^{-0,7}$, $x_0 = -0,7$) aurait donné une protection à 100 %. Par conséquent :

$$\begin{aligned} \log_{10} \text{ de la dilution terminale} &= \\ &= - \left[-0,7 - \frac{0,7}{2} + 0,7 \times \left(\frac{15}{15} + \frac{13}{15} + \frac{9}{15} + \frac{9}{13} + \frac{0}{14} \right) \right] \\ &= - (-0,7 - 0,35 + 0,7 \times 3,16) \\ &= -1,16. \end{aligned}$$

Considérations particulières

Lorsqu'on utilise la méthode de Spearman-Kärber, on ne doit pas oublier que des variations aléatoires des nombres d'animaux qui meurent provoquent des écarts faibles mais inconnus par rapport aux valeurs réelles des dilutions terminales. Ces écarts seront plus importants si l'on n'emploie qu'un petit nombre d'animaux. Il peut également y avoir de légères inexactitudes provenant de la méthode d'évaluation elle-même, mais on a montré qu'en moyenne ces inexactitudes sont plus petites avec la méthode Spearman-Kärber qu'avec d'autres méthodes comparables (par exemple à l'aide de la formule de Reed & Muench).

Pour un matériel donnant une courbe dose-réponse symétrique, la valeur calculée par la formule de Spearman-Kärber est la dilution qui provoquerait une réponse positive chez exactement 50 % des animaux dans une très grande population, c'est-à-dire la dilution correspondant au point 50 %. Or, les courbes dose-réponse sont généralement symétriques dans le cas des sérums et des vaccins, mais on sait qu'elles présentent un certain degré d'asymétrie dans le cas des suspensions virales, si bien que dans ce dernier cas, la valeur telle qu'elle est calculée par la méthode de Spearman-Kärber, est la dilution qui provoquerait la mort d'exactly 43 % des animaux et correspond donc au point final 43 %. Cependant, cette valeur convient tout aussi bien que celle du point 50 % pour mesurer la virulence d'une suspension virale. Dans ce chapitre, le terme de dilution point 50 %, ou simplement

« dilution terminale » se rapporte à la dilution correspondant réellement au point 50 % dans le cas des sérums et des vaccins, et à la dilution correspondant au point 43 % dans le cas des suspensions virales. Pour éviter la confusion, certains auteurs préfèrent utiliser dans ce sens le terme « dose efficace moyenne ».

Pour que la formule de Spearman-Kärber soit applicable, il faut employer une gamme de dilutions suffisamment large pour inclure la dilution à partir et au-dessous de laquelle 100 % des animaux seront constamment positifs et la dilution à partir et au-dessus de laquelle 100 % des animaux seront constamment négatifs. Si l'une de ces deux conditions ou toutes les deux ne sont pas remplies, on admet parfois que, pour un facteur de dilution constant, la dilution immédiatement plus élevée ou plus basse que la dernière dilution éprouvée aurait produit le résultat désiré. Cette « fabrication » de données ne repose sur aucune base théorique, mais si l'on agit avec les précautions voulues, l'inconvénient peut être léger (voir les notes se rapportant aux exemples 4, 5 et 9, au bas des tableaux 1 et 2). Cependant, il est préférable de refaire le titrage avec une gamme de dilutions plus appropriée, et c'est chose indispensable si les données présentent des insuffisances importantes (voir exemple 11). Comme on l'a déjà mentionné, la technique simplifiée ne peut être employée que lorsque le nombre (n) de souris par dilution est constant : toute mort accidentelle réduit n pour la dilution en cause, et le procédé plus long décrit pages 337 et 338, doit être alors appliqué. Cependant, on peut passer outre, s'il survient une seule mort accidentelle pour une dilution au moins 10 fois plus faible que la dilution à partir de laquelle tous les animaux inoculés sont positifs, ou pour une dilution au moins 10 fois plus élevée que la dilution à partir de laquelle tous les animaux inoculés sont négatifs. Donc, dans l'exemple suivant où $n = 6$, les morts accidentelles aux dilutions 10^{-1} et 10^{-6} peuvent être négligées.

Dilution virale :	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Positifs :	5	6	4	1	0	0
Négatifs :	0	0	2	5	6	5

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Spearman, C. (1908) *Brit. J. Psychol.*, **2**, 227
 Kärber, G. (1931) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, **162**, 480
 Finney, D. J. (1952) *Statistical method in biological assay*, Londres, Griffin, p. 524.

B. MÉTHODE DE REED & MUENCH

Bien qu'il y ait des raisons de préférer la méthode de calcul de Spearman-Kärber, certains laboratoires utilisent encore la méthode de Reed & Muench.

Les conditions préalables sont les mêmes que pour la méthode de Spearman-Kärber, soit : nombre constant d'animaux par dilution, facteur de dilution constant, intervalle de dilutions couvrant 100 % et 0 % de positifs, et absence de morts accidentelles. S'il en survient, on donnera la préférence à la formule de Spearman-Kärber (voir exemples 10 et 11, page 337).

Pour le calcul des dilutions donnant 50 % de mortalité (titres DL_{50}), par la méthode de Reed & Muench, on part de la dilution à laquelle on observe une mortalité légèrement inférieure à 50 % (« dilution de départ »). On utilise la formule donnée ci-dessous pour déterminer la différence entre le logarithme du point de départ et le logarithme du point 50 % (« différence des logarithmes »). Si la mortalité diminue quand la dilution augmente (comme dans les titrages de suspensions virales), la dilution point 50 % sera plus faible que la dilution de départ. La « différence des logarithmes » doit donc être soustraite du logarithme de l'inverse de la dilution de départ. Au contraire, la « différence des logarithmes » doit lui être ajoutée si la mortalité augmente avec la dilution. Il faut toujours, lorsqu'on effectue les calculs, se rappeler cette distinction, illustrée dans les exemples suivants :

Exemple 1. Titrage d'une suspension virale

Supposons que dans une épreuve d'activité par le test de Habel, le titrage de la suspension virale chez les souris témoins donne les résultats suivants :

Dilution du virus	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de mortalité
	Survivantes	Mortes	Survivantes	Mortes	
10^{-5}	0	10	↓ 0	↑ 17	17/17 = 100
10^{-6}	4	6	↓ 4	↑ 7	7/11 = 64
10^{-7}	9	1	↓ 13	↑ 1	1/14 = 7

Les totaux sont cumulés de 10^{-5} à 10^{-7} pour les survivantes et de 10^{-7} à 10^{-5} pour les souris dont la mort est attribuée à la rage.

Dans cet exemple, le facteur de dilution est 10 et la dilution de départ (entraînant une mortalité immédiatement inférieure à 50 %) est 10^{-7} .

Calculer la « différence des logarithmes » d'après la formule :

$$\frac{50 \% - (\text{mortalité immédiatement inférieure à } 50 \%)}{\text{mortalité immédiatement supérieure à } 50 \% - (\text{mortalité immédiatement inférieure à } 50 \%)} \times \text{logarithme du facteur de dilution}$$

Donc,

$$\begin{aligned} \text{« différence des logarithmes »} &= \frac{50-7}{64-7} \times 1 \\ &= \frac{43 \times 1}{57} \\ &= 0,75 \end{aligned}$$

Comme, dans cet exemple, la mortalité décroît quand la dilution augmente, la dilution correspondant au point 50 % est inférieure à la dilution de départ ; pour la calculer, il faut soustraire la « différence des logarithmes » comme suit :

$$\begin{aligned} \log (\text{inverse de la dilution du point } 50 \%) &= \log (\text{inverse de la dilution} \\ &\quad \text{de départ}) - \text{« différence des logarithmes »} \\ &= \log 10^7 - 0,75 \\ &= 7 - 0,75 \\ &= 6,25 \end{aligned}$$

Donc,

$$\begin{aligned} \log (\text{dilution point } 50 \%) &= -6,25 \\ \text{et dilution correspondant au point } 50 \% \\ \text{(titre } DL_{50}) &= 10^{-6,25} \end{aligned}$$

Exemple 2. Titrage du vaccin antirabique

Supposons que dans l'épreuve d'activité NIH, le titrage d'un vaccin antirabique donne les résultats suivants :

Dilution d'un vaccin à 5 % de tissu cérébral	Tissu cérébral (mg)	Nom- bre de souris	Survi- vantes	Mortes	Totaux cumulatifs Survivantes	Mortes	Pourcentage de mortalité
5 ⁻¹ (= 10 ^{-0,7})	10	16	10	6	↑ 19	6	6/25 = 24
5 ⁻² (= 10 ^{-1,4})	2	16	8	8	9	↓ 14	14/23 = 61
5 ⁻³ (= 10 ^{-2,1})	0,4	16	1	15	1	↓ 29	29/30 = 97

Dans cet exemple, le facteur de dilution est 5 et la dilution de départ¹ (correspondant à une mortalité immédiatement inférieure à 50 %) est 5⁻¹.

Si l'on utilise la même formule que dans l'exemple précédent, la « différence des logarithmes » est :

$$\frac{50 - 24}{61 - 24} \times 0,699 = 0,491$$

Comme dans ce cas, la mortalité croît avec la dilution, la dilution correspondant au point 50 % sera plus élevée que la dilution de départ ; on la calculera en ajoutant la « différence des logarithmes » comme suit :

¹ Dans certains manuels, on prend comme dilution de départ pour les titrages des vaccins et sérums (mortalité croissant avec la dilution), la dilution à laquelle on observe une mortalité immédiatement supérieure à 50 %. La formule pour la « différence des logarithmes » devient alors :

$$\frac{\text{mortalité à la dilution immédiatement supérieure à } 50 \% - 50 \%}{(\text{mortalité immédiatement supérieure à } 50 \%) - (\text{mortalité immédiatement inférieure à } 50 \%)}$$

Si l'on utilise cette formule, la « différence des logarithmes » doit être soustraite du logarithme de l'inverse de la dilution de départ.

$$\begin{aligned} \log (\text{inverse de la dilution point } 50 \%) &= \log (\text{inverse de la dilution} \\ &\quad \text{de départ}) + \text{« différence} \\ &\quad \text{des logarithmes »} \\ &= 0,699 + 0,491 \\ &= 1,2 \text{ (approx.)} \end{aligned}$$

Donc,

$$\begin{aligned} \log (\text{dilution point } 50 \%) &= -1,2 \\ \text{et dilution correspondant au point } 50 \% &= 10^{-1,2} (= 1 : 16) \end{aligned}$$

Exemple 3. Titrage du sérum antirabique

Supposons qu'un protocole typique de titrage d'un sérum thérapeutique donne les résultats suivants :

Dilution du sérum	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de mortalité
	Survi- vantes	Mortes	Survi- vantes	Mortes	
$10^{-2,7}$ (1 : 500)	5	0	↑ 11	0	0/10 = 0
10^{-3} (1 : 1000)	4	1	6	1	1/7 = 14
$10^{-3,3}$ (1 : 2000)	1	4	2	5	5/7 = 71
$10^{-3,6}$ (1 : 4000)	1	4	1	9	9/10 = 90
$10^{-3,9}$ (1 : 8000)	0	5	0	↓ 14	14/14 = 100

Dans cet exemple, le facteur de dilution est 2 et la dilution de départ (correspondant à une mortalité immédiatement inférieure à 50 %) est 10^{-3} .

Si l'on utilise la même formule que dans l'exemple précédent, la « différence des logarithmes » est :

$$\frac{50 - 14}{71 - 14} \times 0,301 = 0,19$$

Comme dans ce cas, la mortalité s'accroît avec la dilution, la dilution correspondant au point 50 % sera plus élevée que la dilution de départ ; on le calculera en ajoutant la « différence des logarithmes » comme suit :

$$\begin{aligned} \log (\text{inverse de la dilution point } 50 \%) &= \log (\text{inverse de la dilution} \\ &\quad \text{de départ}) + \text{« différence} \\ &\quad \text{de logarithmes »} \\ &= 3 + 0,19 \\ &= 3,2 \text{ (approx.)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Donc, log de la dilution point } 50 \% &= -3,2 \\ \text{et dilution correspondant au point } 50 \% &= 10^{-3,2} \end{aligned}$$

C. TITRAGE DE L'INFECTIVITÉ D'APRÈS LES NUMÉRATIONS DES PLAGES

Lorsqu'on compte les plages sur plusieurs boîtes pour chacune des dilutions en série de la suspension virale, on peut calculer la concentration des unités formatrices de plages (UFP) dans la suspension non diluée, à partir de la somme de toutes les numérations prises ensemble, sous réserve que deux conditions soient remplies :

1) Le nombre moyen de plages doit être inversement proportionnel à la dilution. En d'autres termes, le nombre moyen de plages à une dilution initiale donnée doit être (au moins approximativement) supérieur de 10 fois au nombre moyen de plages à la dilution suivante de raison 10. Il est peu probable d'obtenir cette relation dans les boîtes encombrées par de grands nombres de plages. Les nombres de plages comptés à ces dilutions seront alors plus faibles en moyenne que ceux auxquels on s'attendait d'après les nombres trouvés pour des dilutions supérieures. Afin de garantir des numérations correctes, il faut éliminer du calcul toutes les dilutions qui produisent des plages se chevauchant et non identifiables.

2) L'écart entre les numérations des plages dans plusieurs boîtes à la même dilution ne doit pas excéder celui que la seule fluctuation aléatoire rendait prévisible. Si pour chaque dilution on utilise deux boîtes, un simple calcul fournit un coefficient statistique D , dont la valeur indique si la fluctuation aléatoire suffit à rendre compte de la différence entre les deux numérations. Si n_1 et n_2 représentent les deux nombres de plages observés pour la même dilution, on a

$$D = \frac{(n_1 - n_2)^2}{n_1 + n_2}$$

Si D ne dépasse pas 5,02, la différence entre n_1 et n_2 peut être attribuée à une fluctuation aléatoire. Une valeur de D supérieure à 5,02 peut indiquer qu'il existe d'autres sources de variation, par exemple un manque d'homogénéité des préparations de couches monocellulaires ou des erreurs techniques de pipetage.

Exemple

Supposons que le titrage d'une suspension virale donne les résultats suivants :

Données pour le calcul des UFP dans la suspension virale non diluée					Données pour le calcul du coefficient D		
Dilution ^a (d)	Nombre de boîtes (k)	Nombre de plages Boîte 1 (n ₁)	Nombre de plages Boîte 2 (n ₂)	Somme des plages (n ₁ + n ₂)	Différence des plages (n ₁ - n ₂)	(n ₁ - n ₂) ²	$D = \frac{(n_1 - n_2)^2}{n_1 + n_2}$
10 ⁻⁵	2	27	38	65	-11	121	1,862
10 ⁻⁶	2	6	3	9	3	9	1,000
10 ⁻⁷	2	0	0	0			
Nombre total de plages (N) = 74							

^a Les numérations effectuées dans les boîtes inoculées avec des dilutions plus faibles, ne sont pas fiables par suite du chevauchement des plages, et l'on ne tient donc pas compte de ces boîtes pour le calcul.

Dans cet exemple, le coefficient D est \leq à 5,02 pour chaque dilution. La différence dans les numérations de plages peut donc être attribuée à la seule fluctuation aléatoire.

Pour calculer le nombre d'UFP par inoculum de la suspension non diluée, on utilise la formule suivante :

$$x = \frac{N}{\sum k \cdot d}$$

où N = nombre total de plages comptées sur toutes les boîtes employées pour l'évaluation de x

d = dilution

k = nombre de boîtes à la dilution d

Donc,

$$\begin{aligned} \sum k \cdot d &= 2 \times 10^{-5} + 2 \times 10^{-6} + 2 \times 10^{-7} \\ &= 2 \times 10^{-7} (10^2 + 10^1 + 10^0) = 2 \times 10^{-7} \times 111 = 222 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

Si l'on introduit cette valeur dans la formule donnée ci-dessus, on obtient :

$$x = \frac{74}{222 \times 10^{-7}} = 0,3333 \times 10^7 = 3\,333\,000 \text{ UFP par inoculum.}$$

Si on a utilisé 0,1 ml d'inoculum par boîte, cela correspond à $3,333 \times 10^6$ UFP pour 0,1 ml de la suspension non diluée (ou $3,333 \times 10^1$ UFP/ml). Il faut noter que dans le calcul de $\sum k \cdot d$, on inclut également les boîtes où le nombre de plages est zéro.

La valeur calculée de x ne peut être considérée que comme une valeur approchée de la concentration réelle d'UFP dans la suspension non diluée. La précision de cette approximation s'exprime par l'écart-type $s(x)$,

$$s(x) = \sqrt{\frac{x}{\sum k \cdot d}}$$

La concentration réelle d'UFP dans la suspension d'origine peut donc être exprimée sous la forme :

$$x \pm sx$$

Dans l'exemple ci-dessus

$$\begin{aligned} s(x) &= \sqrt{\frac{0,3333 \times 10^7}{222 \times 10^{-7}}} = \sqrt{0,0015 \times 10^{14}} = 0,0388 \times 10^7 \\ &= 0,388 \times 10^6 \end{aligned}$$

Donc, le nombre estimé d'UFP pour 0,1 ml de suspension non diluée est :

$$\begin{aligned} x \pm s(x) &= (3,333 \pm 0,388) \times 10^6 \\ &\text{ou } (3,333 \pm 0,388) \times 10^7 \text{ UFP par ml.} \end{aligned}$$

Une autre façon d'indiquer la précision de x est de calculer le coefficient de variation (c.v.) :

$$\text{Coefficient de variation} = \frac{\text{écart-type des UFP}}{\text{nombre d'UFP calculé}}$$

$$\text{ou c.v.}(x) = \frac{s(x)}{x}$$

Ce qui s'exprime parfois sous forme de pourcentage. Dans l'exemple ci-dessus, on a :

$$\text{c.v.}(x) = 0,388/3,333 = 0,116 \text{ ou } 11,6 \%$$

Rien n'exige que le nombre de boîtes soit le même pour toutes les dilutions. Parfois, une boîte doit être rejetée pour une raison quelconque et ne peut être inclus dans les numérations. Pour illustrer ce cas, supposons que dans l'exemple ci-dessus il n'y ait qu'une boîte à la dilution 10^{-5} et qu'elle présente 27 plages. Nous avons $k = 1$ pour cette dilution, et $N = 27 + 9 = 36$.

D'où,

$$\begin{aligned} \sum k \cdot d &= 1 \times 10^{-5} + 2 \times 10^{-6} + 2 \times 10^{-7} \\ &= 10^{-7} (10^2 + 2 \times 10^1 + 2 \times 10^0) = 122 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

$$x = \frac{36}{122 \times 10^{-7}} = 0,2951 \times 10^7 = 2,951 \times 10^6 \text{ UFP pour } 0,1 \text{ ml.}$$

$$\begin{aligned} s(x) &= \sqrt{\frac{0,2951 \times 10^7}{122 \times 10^{-7}}} = \sqrt{0,002419 \times 10^{14}} = 0,0492 \times 10^7 \\ &= 0,492 \times 10^1 \end{aligned}$$

$$x \pm s(x) = (2,951 \pm 0,492) \times 10^6 \text{ UFP pour } 0,1 \text{ ml}$$

$$\text{c.v.}(x) = \frac{0,492}{2,951} = 0,167 \text{ ou } 16,7 \%$$

MÉTHODE RAPIDE DE MARQUAGE DES ANTICORPS ANTIRABIQVES PAR LA FLUORESCÉINE

L. SCHNEIDER¹

Tout sérum antirabique d'activité AF connue peut être marqué. On obtient d'excellents résultats avec les globulines antirabiques obtenues chez le hamster (voir chapitre 6).

Pour la précipitation des globulines, le marquage par la fluorescéine, et l'élimination du colorant en excès au moyen de Sephadex, les procédés ci-après ont été employés avec succès dans de nombreux laboratoires de diagnostic. Avec ces méthodes, des conjugués anticorps-fluorescéine prêts à l'emploi peuvent être préparés en deux à trois jours.

Matériel

Sulfate d'ammonium. Solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dans l'eau distillée, pH 7,2.

Soluté salin tamponné au phosphate (PBS) 0,01 M

Solution-mère I :

hydrogénophosphate de sodium, dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	10,0 g
dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,0 g
eau distillée	1000 ml

Solution-mère II :

chlorure de sodium	8,5 g
eau distillée	1000 ml

Mélanger 180 ml de la solution-mère I avec 900 ml de la solution-mère II. Le pH du tampon obtenu doit être de 7,4-7,6.

Tampon au carbonate-bicarbonate, pH 9

carbonate de sodium, anhydre (Na_2CO_3)	0,6 g
bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	3,7 g
eau distillée	100 ml

¹ Institut fédéral de Recherche sur les Maladies à Virus des Animaux, Tübingen, République fédérale d'Allemagne.

Comme, dans cet exemple, la mortalité décroît quand la dilution augmente, la dilution correspondant au point 50 % est inférieure à la dilution de départ ; pour la calculer, il faut soustraire la « différence des logarithmes » comme suit :

$$\begin{aligned} \log (\text{inverse de la dilution du point } 50 \%) &= \log (\text{inverse de la dilution} \\ &\quad \text{de départ}) - \text{« différence des logarithmes »} \\ &= \log 10^7 - 0,75 \\ &= 7 - 0,75 \\ &= 6,25 \end{aligned}$$

Donc,

$$\begin{aligned} \log (\text{dilution point } 50 \%) &= -6,25 \\ \text{et dilution correspondant au point } 50 \% \\ \text{(titre } DL_{50}) &= 10^{-6,25} \end{aligned}$$

Exemple 2. Titrage du vaccin antirabique

Supposons que dans l'épreuve d'activité NIH, le titrage d'un vaccin antirabique donne les résultats suivants :

Dilution d'un vaccin à 5 % de tissu cérébral	Tissu cérébral (mg)	Nom- bre de souris	Survi- vantes	Mortes	Totaux cumulatifs		Pourcentage de mortalité
					Survi- vantes	Mortes	
5 ⁻¹ (= 10 ^{-0,7})	10	16	10	6	↑ 19	6	6/25 = 24
5 ⁻² (= 10 ^{-1,4})	2	16	8	8	9	↓ 14	14/23 = 61
5 ⁻³ (= 10 ^{-2,1})	0,4	16	1	15	1	↓ 29	29/30 = 97

Dans cet exemple, le facteur de dilution est 5 et la dilution de départ¹ (correspondant à une mortalité immédiatement inférieure à 50 %) est 5⁻¹.

Si l'on utilise la même formule que dans l'exemple précédent, la « différence des logarithmes » est :

$$\frac{50 - 24}{61 - 24} \times 0,699 = 0,491$$

Comme dans ce cas, la mortalité croît avec la dilution, la dilution correspondant au point 50 % sera plus élevée que la dilution de départ ; on la calculera en ajoutant la « différence des logarithmes » comme suit :

¹ Dans certains manuels, on prend comme dilution de départ pour les titrages des vaccins et sérums (mortalité croissant avec la dilution), la dilution à laquelle on observe une mortalité immédiatement supérieure à 50 %. La formule pour la « différence des logarithmes » devient alors :

$$\frac{\text{mortalité à la dilution immédiatement supérieure à } 50 \% - 50 \%}{(\text{mortalité immédiatement supérieure à } 50 \%) - (\text{mortalité immédiatement inférieure à } 50 \%)} \times \text{logarithme du facteur de dilution}$$

Si l'on utilise cette formule, la « différence des logarithmes » doit être soustraite du logarithme de l'inverse de la dilution de départ.

$$\begin{aligned} \log (\text{inverse de la dilution point } 50 \%) &= \log (\text{inverse de la dilution de départ}) + \ll \text{différence des logarithmes} \gg \\ &= 0,699 + 0,491 \\ &= 1,2 \text{ (approx.)} \end{aligned}$$

Donc,

$$\begin{aligned} \log (\text{dilution point } 50 \%) &= -1,2 \\ \text{et dilution correspondant au point } 50 \% &= 10^{-1,2} (= 1 : 16) \end{aligned}$$

Exemple 3. Titrage du sérum antirabique

Supposons qu'un protocole typique de titrage d'un sérum thérapeutique donne les résultats suivants :

Dilution du sérum	Souris		Totaux cumulatifs		Pourcentage de mortalité
	Survivantes	Mortes	Survivantes	Mortes	
$10^{-2,7}$ (1 : 500)	5	0	↑ 11	0	0/10 = 0
10^{-3} (1 : 1000)	4	1	6	1	1/7 = 14
$10^{-3,3}$ (1 : 2000)	1	4	2	5	5/7 = 71
$10^{-3,6}$ (1 : 4000)	1	4	1	9	9/10 = 90
$10^{-3,9}$ (1 : 8000)	0	5	↓ 0	14	14/14 = 100

Dans cet exemple, le facteur de dilution est 2 et la dilution de départ (correspondant à une mortalité immédiatement inférieure à 50 %) est 10^{-3} .

Si l'on utilise la même formule que dans l'exemple précédent, la « différence des logarithmes » est :

$$\frac{50 - 14}{71 - 14} \times 0,301 = 0,19$$

Comme dans ce cas, la mortalité s'accroît avec la dilution, la dilution correspondant au point 50 % sera plus élevée que la dilution de départ ; on le calculera en ajoutant la « différence des logarithmes » comme suit :

$$\begin{aligned} \log (\text{inverse de la dilution point } 50 \%) &= \log (\text{inverse de la dilution de départ}) + \ll \text{différence des logarithmes} \gg \\ &= 3 + 0,19 \\ &= 3,2 \text{ (approx.)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Donc, log de la dilution point } 50 \% &= -3,2 \\ \text{et dilution correspondant au point } 50 \% &= 10^{-3,2} \end{aligned}$$

C. TITRAGE DE L'INFECTIVITÉ D'APRÈS LES NUMÉRATIONS DES PLAGES

Lorsqu'on compte les plages sur plusieurs boîtes pour chacune des dilutions en série de la suspension virale, on peut calculer la concentration des unités formatrices de plages (UFP) dans la suspension non diluée, à partir de la somme de toutes les numérations prises ensemble, sous réserve que deux conditions soient remplies :

1) Le nombre moyen de plages doit être inversement proportionnel à la dilution. En d'autres termes, le nombre moyen de plages à une dilution initiale donnée doit être (au moins approximativement) supérieur de 10 fois au nombre moyen de plages à la dilution suivante de raison 10. Il est peu probable d'obtenir cette relation dans les boîtes encombrées par de grands nombres de plages. Les nombres de plages comptés à ces dilutions seront alors plus faibles en moyenne que ceux auxquels on s'attendait d'après les nombres trouvés pour des dilutions supérieures. Afin de garantir des numérations correctes, il faut éliminer du calcul toutes les dilutions qui produisent des plages se chevauchant et non identifiables.

2) L'écart entre les numérations des plages dans plusieurs boîtes à la même dilution ne doit pas excéder celui que la seule fluctuation aléatoire rendait prévisible. Si pour chaque dilution on utilise deux boîtes, un simple calcul fournit un coefficient statistique D , dont la valeur indique si la fluctuation aléatoire suffit à rendre compte de la différence entre les deux numérations. Si n_1 et n_2 représentent les deux nombres de plages observés pour la même dilution, on a

$$D = \frac{(n_1 - n_2)^2}{n_1 + n_2}$$

Si D ne dépasse pas 5,02, la différence entre n_1 et n_2 peut être attribuée à une fluctuation aléatoire. Une valeur de D supérieure à 5,02 peut indiquer qu'il existe d'autres sources de variation, par exemple un manque d'homogénéité des préparations de couches monocellulaires ou des erreurs techniques de pipetage.

Exemple

Supposons que le titrage d'une suspension virale donne les résultats suivants :

Données pour le calcul des UFP dans la suspension virale non diluée				Données pour le calcul du coefficient D			
Dilution ^a (d)	Nombre de boîtes (k)	Boîte 1 (n ₁)	Boîte 2 (n ₂)	Somme des plages (n ₁ +n ₂)	Différence des plages (n ₁ -n ₂)	(n ₁ -n ₂) ²	$D = \frac{(n_1 - n_2)^2}{n_1 + n_2}$
10 ⁻⁵	2	27	38	65	-11	121	1,862
10 ⁻⁶	2	6	3	9	3	9	1,000
10 ⁻⁷	2	0	0	0			
Nombre total de plages (N) =				74			

^a Les numérations effectuées dans les boîtes inoculées avec des dilutions plus faibles, ne sont pas fiables par suite du chevauchement des plages, et l'on ne tient donc pas compte de ces boîtes pour le calcul.

Dans cet exemple, le coefficient D est \leq à 5,02 pour chaque dilution. La différence dans les numérations de plages peut donc être attribuée à la seule fluctuation aléatoire.

Pour calculer le nombre d'UFP par inoculum de la suspension non diluée, on utilise la formule suivante :

$$x = \frac{N}{\sum k \cdot d}$$

où N = nombre total de plages comptées sur toutes les boîtes employées pour l'évaluation de x

d = dilution

k = nombre de boîtes à la dilution d

Donc,

$$\begin{aligned} \sum k \cdot d &= 2 \times 10^{-5} + 2 \times 10^{-6} + 2 \times 10^{-7} \\ &= 2 \times 10^{-7} (10^2 + 10^1 + 10^0) = 2 \times 10^{-7} \times 111 = 222 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

Si l'on introduit cette valeur dans la formule donnée ci-dessus, on obtient :

$$x = \frac{74}{222 \times 10^{-7}} = 0,3333 \times 10^7 = 3\,333\,000 \text{ UFP par inoculum.}$$

Si on a utilisé 0,1 ml d'inoculum par boîte, cela correspond à $3,333 \times 10^6$ UFP pour 0,1 ml de la suspension non diluée (ou $3,333 \times 10^1$ UFP/ml). Il faut noter que dans le calcul de $\sum k \cdot d$, on inclut également les boîtes où le nombre de plages est zéro.

La valeur calculée de x ne peut être considérée que comme une valeur approchée de la concentration réelle d'UFP dans la suspension non diluée. La précision de cette approximation s'exprime par l'écart-type $s(x)$,

$$s(x) = \sqrt{\frac{x}{\sum k \cdot d}}$$

La concentration réelle d'UFP dans la suspension d'origine peut donc être exprimée sous la forme :

$$x \pm sx$$

Dans l'exemple ci-dessus

$$\begin{aligned} s(x) &= \sqrt{\frac{0,3333 \times 10^7}{222 \times 10^{-7}}} = \sqrt{0,0015 \times 10^{14}} = 0,0388 \times 10^7 \\ &= 0,388 \times 10^6 \end{aligned}$$

Donc, le nombre estimé d'UFP pour 0,1 ml de suspension non diluée est :

$$\begin{aligned} x \pm s(x) &= (3,333 \pm 0,388) \times 10^6 \\ &\text{ou } (3,333 \pm 0,388) \times 10^7 \text{ UFP par ml.} \end{aligned}$$

Une autre façon d'indiquer la précision de x est de calculer le coefficient de variation (c.v.) :

$$\text{Coefficient de variation} = \frac{\text{écart-type des UFP}}{\text{nombre d'UFP calculé}}$$

$$\text{ou c.v.}(x) = \frac{s(x)}{x}$$

Ce qui s'exprime parfois sous forme de pourcentage. Dans l'exemple ci-dessus, on a :

$$\text{c.v.}(x) = 0,388/3,333 = 0,116 \text{ ou } 11,6 \%$$

Rien n'exige que le nombre de boîtes soit le même pour toutes les dilutions. Parfois, une boîte doit être rejetée pour une raison quelconque et ne peut être inclus dans les numérations. Pour illustrer ce cas, supposons que dans l'exemple ci-dessus il n'y ait qu'une boîte à la dilution 10^{-5} et qu'elle présente 27 plages. Nous avons $k = 1$ pour cette dilution, et $N = 27 + 9 = 36$.

D'où,

$$\begin{aligned} \sum k \cdot d &= 1 \times 10^{-5} + 2 \times 10^{-6} + 2 \times 10^{-7} \\ &= 10^{-7} (10^2 + 2 \times 10^1 + 2 \times 10^0) = 122 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

$$x = \frac{36}{122 \times 10^{-7}} = 0,2951 \times 10^7 = 2,951 \times 10^6 \text{ UFP pour } 0,1 \text{ ml.}$$

$$\begin{aligned} s(x) &= \sqrt{\frac{0,2951 \times 10^7}{122 \times 10^{-7}}} = \sqrt{0,002419 \times 10^{14}} = 0,0492 \times 10^7 \\ &= 0,492 \times 10^1 \end{aligned}$$

$$x \pm s(x) = (2,951 \pm 0,492) \times 10^6 \text{ UFP pour } 0,1 \text{ ml}$$

$$\text{c.v.}(x) = \frac{0,492}{2,951} = 0,167 \text{ ou } 16,7 \%$$

MÉTHODE RAPIDE DE MARQUAGE DES ANTICORPS ANTIRABIQVES PAR LA FLUORESCÉINE

L. SCHNEIDER¹

Tout sérum antirabique d'activité AF connue peut être marqué. On obtient d'excellents résultats avec les globulines antirabiques obtenues chez le hamster (voir chapitre 6).

Pour la précipitation des globulines, le marquage par la fluorescéine, et l'élimination du colorant en excès au moyen de Sephadex, les procédés ci-après ont été employés avec succès dans de nombreux laboratoires de diagnostic. Avec ces méthodes, des conjugués anticorps-fluorescéine prêts à l'emploi peuvent être préparés en deux à trois jours.

Matériel

Sulfate d'ammonium. Solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dans l'eau distillée, pH 7,2.

Soluté salin tamponné au phosphate (PBS) 0,01 M

Solution-mère I :

hydrogénophosphate de sodium, dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$)	10,0 g
dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,0 g
eau distillée	1000 ml

Solution-mère II :

chlorure de sodium	8,5 g
eau distillée	1000 ml

Mélanger 180 ml de la solution-mère I avec 900 ml de la solution-mère II. Le pH du tampon obtenu doit être de 7,4-7,6.

Tampon au carbonate-bicarbonate, pH 9

carbonate de sodium, anhydre (Na_2CO_3)	0,6 g
bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	3,7 g
eau distillée	100 ml

¹ Institut fédéral de Recherche sur les Maladies à Virus des Animaux, Tübingen, République fédérale d'Allemagne.

Dissoudre chacun des sels dans un flacon différent, puis mélanger les solutions et les amener au volume indiqué.

Isothiocyanate de fluorescéine. On peut employer tout produit de qualité reconnue, soit pur sous forme de poudre cristalline, soit adsorbé sur un support comme la Célite ou une autre terre de diatomées.

Sephadex. Pour éliminer le sulfate d'ammonium ou la fluorescéine en excès, on peut remplacer avantageusement la dialyse, opération de longue durée, par l'utilisation de colonnes de Sephadex G25 ou G50, à grain moyen.

Agiter environ 100 g de Sephadex dans 500 ml de PBS 0,01 M dans un flacon de 1 litre. Laisser gonfler le gel pendant environ 2 heures, puis éliminer le surnageant par aspiration. Mélanger ensuite soigneusement le gel avec environ 900 ml de PBS 0,01 M, et laisser déposer la préparation pendant exactement 5 minutes. Enlever le surnageant par aspiration. Répéter cette opération plusieurs fois jusqu'à ce que le liquide surnageant se clarifie en 5 minutes. Cela permet d'éliminer les petites particules de Sephadex dont la présence aurait réduit le débit à travers la colonne. Le gel final peut se conserver pendant longtemps à la température du laboratoire.

Précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium

Toutes les réactions sont effectuées à la température ambiante sans refroidissement préalable des réactifs.

1. Ajouter goutte à goutte la solution saturée de sulfate d'ammonium dans la proportion de 1,0 ml pour 1,5 ml de sérum en remuant constamment.
2. Centrifuger immédiatement à 2000 g pendant 5 minutes dans une centrifugeuse classique de laboratoire.
3. Rejeter le liquide surnageant.
4. Remettre le sédiment en suspension dans l'eau distillée ou du PBS 0,01 M jusqu'à ce que le volume final égale le volume du sérum initial.
5. Répéter les opérations 1-4 jusqu'à ce que le liquide surnageant reste clair (au moins 3 fois).
6. Reprendre le sédiment final dans un volume égal à la moitié de celui du sérum initial.
7. Éliminer le sulfate d'ammonium des globulines par dialyse (voir chapitre 6, annexe, page 86), ou par filtration sur Sephadex. Dans ce cas, pour chaque volume de 10 ml de solution de globulines, utiliser une colonne de gel Sephadex de 200 mm × 15 mm, équilibrer avec du PBS 0,01 M (voir plus haut). Recueillir lorsqu'apparaît une fraction opalescente.
8. Noter le volume et déterminer les protéines totales par la réaction du biuret.

Marquage des globulines

1. Diluer avec du tampon au carbonate-bicarbonate de pH 9, les globulines débarrassées des ions sulfate jusqu'à la concentration de 1 à 2 % de protéines. Lorsque la teneur en protéines n'est que de 1 % ou moins, ajouter une quantité de tampon au carbonate-bicarbonate égale à 10 % du volume total.
2. Ajouter 0,015 à 0,02 mg d'isothiocyanate de fluorescéine par mg de protéine. Agiter le mélange pendant une nuit à 4°C.

Elimination du colorant en excès

On enlève rapidement et commodément la fluorescéine non liée aux protéines en utilisant une colonne Sephadex. Pour chaque volume de 10 ml de globulines conjuguées, il faut une colonne de gel de Sephadex d'au moins 150 mm × 15 mm.

1. Fixer une colonne de verre de longueur appropriée (environ 300 mm × 15 mm) en position verticale.
2. Remplir la colonne avec du gel de Sephadex équilibré avec du PBS 0,01 M (voir plus haut).
3. Laisser le gel se déposer pendant plusieurs heures jusqu'à ce que la colonne de gel soit uniformément tassée.
4. Rincer la colonne avec du PBS 0,01 M et prendre soin que le gel de Sephadex ne devienne jamais sec.
5. Avant utilisation, laisser s'écouler le tampon jusqu'à ce que le niveau atteigne le sommet de la colonne de gel.
6. Verser soigneusement une couche de globulines marquées à la fluorescéine au-dessus de la colonne de Sephadex. Eviter de remuer le gel.
7. Après que les globulines ont pénétré dans le gel, ajouter du PBS 0,01 M au sommet de la colonne. Exercer une pression suffisante pour assurer un débit constant.
8. On obtient ainsi deux bandes visibles de couleur orange. La première fraction, qui se rapproche rapidement du bas de la colonne, représente les globulines marquées à la fluorescéine. La seconde, qui se déplace plus lentement, est formée par le colorant en excès, non conjugué. Recueillir toute la première fraction.
9. Arrêter de recueillir lorsque la coloration de l'éluat pâlit ; répartir en volumes de 1 ml, et conserver à l'état congelé ou lyophilisé.
10. Les colonnes peuvent être réutilisées après que le Sephadex a été débarrassé du résidu de colorant en excès.

Dilution de travail du conjugué

1. Préparer des dilutions en série de raison 2 du conjugué filtré sur Sephadex dans une suspension à 5 % de cerveau normal de mouton (CNM) dans du PBS 0,01 M. Il est recommandé d'utiliser l'intervalle de dilutions de 1 : 5 à 1 : 40 pour les sérums faibles et celui de 1 : 40 à 1 : 60 pour les conjugués de globulines de hamster.
 2. Colorer des frottis contenant l'antigène rabique (voir description chapitre 6). On prendra comme dilution de travail du conjugué la plus forte dilution produisant une fluorescence brillante.
 3. Pour la préparation et la coloration courantes des lames à éprouver et des lames témoins, voir chapitre 6.
-

ÉPREUVE DES PLAGES EN COUCHES MONOCELLULAIRES

L. SCHNEIDER¹

L'épreuve classique des plages (Dulbecco, 1952) n'a pas semblé utile dans le cas du virus rabique (VR). Cette épreuve comporte l'infection de cultures en couche monocellulaire, que l'on recouvre ensuite d'une « surcouche » solide ou semi-solide d'un milieu approprié contenant de la gélose, de l'agarose ou de la méthylcellulose. On a récemment découvert que le remplacement de la gélose par le Sephadex G200, donne une surcouche qui permet d'obtenir la formation de plages par le VR dans des couches monocellulaires (Schneider, données non publiées).

Dans l'épreuve des plages en couches monocellulaires avec le Sephadex (SMP), celui-ci est mis en suspension dans le milieu pour surcouche à une concentration qui permet aux grains de gel de former une couche fine mais complète sur le tapis cellulaire. L'excès de milieu reste au-dessus de la couche de Sephadex de manière que les cellules restent viables. Les grains de Sephadex tendant à se déplacer librement dans le milieu, les boîtes de Petri ne doivent pas être remuées durant la période d'incubation (Schwöbel, 1969).

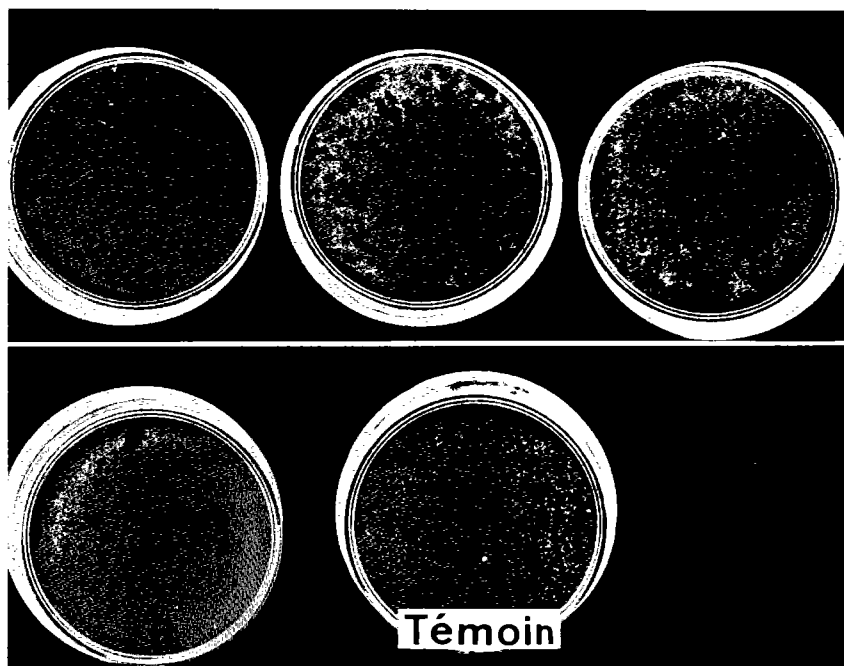
Dans le système tampon, le chlorure de Tris est actuellement remplacé par le Tes (voir ci-après), ce qui permet d'exécuter l'épreuve SMP en l'absence de gaz carbonique (Richter, 1967).

A l'heure actuelle, la formation des plages a pu être obtenue avec plusieurs souches de VR dans des cellules BHK-S13 (voir figure) et trois autres lignées de cellules BHK-21. Le nombre des plages est le même dans tous les systèmes cellulaires, mais leur taille est plus grande dans les cellules S13. Dans tous les systèmes cellulaires essayés, la formation des plages est supprimée par des immunsérums spécifiques.

L'épreuve SMP est une méthode commode, qui peut être exécutée par n'importe quel personnel de laboratoire possédant quelque expérience en matière de culture tissulaire. La facilité de préparation, d'infection et de coloration des cultures en couche monocellulaire, l'incubation sans dioxyde de carbone, et la bonne visibilité des plages, colorées de façon permanente ou même non colorées, constituent des avantages indubitables de cette méthode.

¹ Institut fédéral de Recherche sur les Maladies à Virus des Animaux, Tübingen, République fédérale d'Allemagne.

**PLAGES FORMÉES PAR LE VIRUS RABIQUE (SOUCHE FLURY HEP)
DANS DES COUCHES MONOCELLULAIRES BHK-S13**



WHO 40301

L'épreuve SMP peut être employée pour titrer l'infectivité des souches de VR adaptées aux cultures tissulaires ; pour le clonage du VR, et pour l'épreuve de réduction des plages décrite au chapitre 9, page 115.

Matériel

Milieu de culture

Le milieu de culture pour la prolifération des cellules est un milieu BHK-21 (voir chapitre 9, annexe 1), additionné de tryptose de phosphate (0,3 % p/v), d'hydrolysate de lactalbumine (0,5 % p/v), de sérum normal de veau (10 % p/v), et d'antibiotiques.

Milieu pour « surcouche »

Pour 1 litre de milieu, mélanger les composants suivants :

eau distillée	795 ml
solution saline équilibrée (concentré $\times 10$) ¹	100 ml
acides aminés (concentré $\times 100$) ¹	10 ml
vitamines (concentré $\times 100$) ¹	10 ml
glutamine (concentré $\times 100$) ¹	10 ml

¹ Pour la formule, voir chapitre 9, annexe 1, page 123.

Tes, 1 M ¹	27,5 ml
pénicilline	500 000 UI
streptomycine	200 mg (156 000 UI)
mycostatine	50 000 UI
sérum bovin fœtal	20 ml

Ajuster le pH à 7,2 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 1 M ; il faut environ 25 ml par litre de milieu. On a constaté que ce pH de 7,2 était le meilleur dans les conditions décrites ici.

*Sephadex G 200*². Il est introduit sous forme de poudre sèche, dans des flacons, à raison de 20 g dans chacun, puis stérilisé au four en atmosphère sèche à 180°C pendant 1 heure.

A chaque litre de milieu pour surcouche, ajouter 20 g de Sephadex G 200 stérilisé et laisser gonfler pendant 24 heures à 4°C.

Diluant du virus

Ce diluant est de même composition que le milieu de culture, excepté que le sérum de veau est remplacé par de la sérumbumine bovine (0,3 % p/v), et que l'on ajoute du DEAE-dextrane jusqu'à la concentration finale de 50 µg/ml.

Cellules

Ce sont des cellules BHK-S13 dont l'entretien et les subcultures sont effectués selon la méthode décrite au chapitre 9, page 105. Les cellules BHK-21 d'origine entretenues en vue de la multiplication du VR peuvent être employées à la place des cellules S13.

Méthodes d'obtention des plages

Culture des cellules

1. Trypsiner des cultures confluentes de BHK en couches monocellulaires, provenant de boîtes de Roux de 1 litre, et mettre les cellules en suspension dans le milieu de culture à la concentration de 10⁶ cellules par ml.
2. Répartir la suspension cellulaire diluée dans des boîtes de Pétri en verre ou en plastique (60×15 mm), à raison de 5 ml par boîte. On peut préparer environ 25 boîtes de Pétri à partir d'une boîte de Roux.
3. Incuber à 37°C en atmosphère humide et en présence de 3 à 5 % de dioxyde de carbone. Des couches monocellulaires complètes devraient se former au bout de 48 heures.

¹ 229,2 g d'acide *N*-tris-(hydroxyméthyl)-méthylamino-2 éthane-sulfonique dissous dans 1000 ml d'eau distillée.

² Pharmacia, Uppsala, Suède.

Infection par le virus

4. Enlever par aspiration le milieu de culture des boîtes de Petri, rincer ces dernières à deux reprises avec une solution physiologique tamponnées au phosphate (PBS).

5. Infecter les boîtes en plaçant 0,1 ml d'inoculum viral sur la nappe cellulaire. Disperser par rotation des boîtes. Infecter au moins 2 boîtes par dilution de virus.

6. Laisser le virus s'adsorber sur les cellules en mettant les boîtes à l'étuve à 34–37°C pendant 1 heure. Eliminer l'inoculum restant en rinçant les boîtes au PBS.

7. A chaque boîte de Pétri, ajouter 5 ml de milieu pour surcouche contenant du Sephadex et incuber à 34–37°C en atmosphère humide sans gaz carbonique. Ne pas toucher aux boîtes pendant 5 à 6 jours.

Coloration des plages

8. Retirer les boîtes de l'étuve et fixer le tapis cellulaire en versant soigneusement, sur la couche de Sephadex, 5 ml d'une solution à 2–5 % de formaldéhyde dans l'eau distillée. La fixation est complète au bout de 30 minutes.

9. Rincer les boîtes à l'eau courante du robinet jusqu'à ce que les grains de Sephadex soient complètement éliminés.

10. Ajouter 3 ml de solution-mère de Giemsa non diluée. Colorer pendant au moins 20 minutes.

11. Enlever le colorant, rincer soigneusement à l'eau du robinet et laisser sécher les boîtes à l'air.

12. Retourner les boîtes de Pétri séchées sur une boîte transparente éclairée. Marquer chaque plage au crayon à verre sur le fond de chaque boîte, et compter le nombre de plages par boîte.

13. Calculer le nombre d'unités formatrices de plages (UFP/ml) d'après l'exemple donné dans l'appendice 1, page 343. Pour la méthode de calcul du point 50 % de réduction des plages, voir chapitre 9, page 117.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dulbecco, R. (1952) *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **38**, 747
MacPherson, I. & Stoker, M. (1962) *Virology*, **16**, 147
Richter, A. (1967) *Appl. Microbiol.*, **15**, 1507
Schneider, L. G., Horzinek, M. & Novicky, R. (1971) *Arch. ges. Virusforsch.*, **34**, 360
Schwöbel, W. (1969) *Arbeiten der Universität Hohenheim*, vol. 48, Stuttgart, Ulmer.

CONTROLE DE SÉCURITÉ DU VACCIN ANTIRABIQUE INACTIVÉ PRÉPARÉ EN CULTURES CELLULAIRES

R. NETTER¹ & F. T. PERKINS²

A. VACCINS PRÉPARÉS EN CELLULES DIPLOÏDES HUMAINES

Les normes de fabrication pour les nouveaux vaccins viraux préparés en culture cellulaires sont en général fondées sur les normes relatives au vaccin antipoliomyélitique. En ce qui concerne les vaccins tués, certains agents d'inactivation pouvant laisser subsister des virus vivants, il est nécessaire d'exercer à leur égard la même vigilance qu'à l'égard des vaccins vivants.

De plus, lorsque surviennent de sérieux incidents postvaccinaux, on craint à juste titre de découvrir de nouveaux virus provenant des cultures cellulaires, même si ces dernières ont satisfait aux normes de contrôle. Cette incertitude a poussé de nombreux chercheurs à se tourner, pour la préparation de vaccins, vers des cellules diploïdes humaines, dont il aura été prouvé à l'avance qu'elles sont indemnes de virus (Hayflick & Moorhead, 1961). Des normes relatives à la fabrication et au contrôle de différents vaccins à base de virus vivants ont été proposées lors de diverses réunions scientifiques, et des normes relatives au vaccin antipoliomyélitique (buccal) ont été publiées par l'OMS³.

Le vaccin antirabique inactivé préparé en cellules diploïdes humaines soulève d'abord un problème d'ordre général, en ce sens qu'à ce jour il n'existe pas non plus de normes pour les autres vaccins inactivés préparés en cellules diploïdes humaines ; néanmoins, les dispositions applicables au substrat cellulaire doivent être identiques, que le vaccin final soit une suspension de virus tué ou de virus vivant atténué. De plus, ce vaccin antirabique pose de nombreux problèmes d'ordre particulier qui sont résumés ci-dessous :

¹ Directeur de la Section de Virologie, Laboratoire des Actions de Santé, Boulevard St-Jacques, Paris, France.

² Head, Immunological Products Control Laboratory, National Institute for Biological Standards and Control, Hampstead, Londres, Angleterre.

³ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1972, N° 486, Annexe 1.

1) Pour la production de vaccin, on doit utiliser la souche Pasteur de virus rabique fixe ou une des souches qui en dérivent. De telles souches sont caractérisées par une période d'incubation fixe et brève, après inoculation intracérébrale à l'animal. Par ailleurs, avec le vaccin de type Fermi, le pouvoir pathogène après inoculation par voie parentérale a été réduit à un point tel qu'il était possible de tolérer la présence de virus vivant jusqu'à $10^{2,7}$ DL₅₀ par 0,03 ml¹. Or, à doses élevées, ce virus de meure pathogène pour la majorité des espèces animales et pour l'homme, si bien que sa manipulation exige que soient observées les précautions de sécurité maximales. La souche agréée ne doit jamais avoir été passée sur un animal autre que le lapin, ou sur des cellules rénales de singe, ou dans une lignée cellulaire. Il est souhaitable que cette souche ait été adaptée directement aux cellules diploïdes humaines.

2) Seules les cellules diploïdes humaines qui ont satisfait à tous les critères d'acceptabilité² et qui ont été approuvées par les autorités nationales peuvent être utilisées. Leur pureté préserve celle du vaccin.

3) Les techniques de multiplication du virus rabique utilisées jusqu'ici n'ont pas permis d'en obtenir des titres très élevés. Il est donc indispensable de concentrer le produit, ce qui donne des lots de vaccin assez réduits.

4) Le vaccin doit être inactivé par une méthode approuvée.

Lots de semence

Contrôle des cellules diploïdes

En général, les contrôles effectués sur le substrat cellulaire utilisé pour la production des lots de semence seront les mêmes que dans le cas du vaccin antipoliomyélitique (buccal)¹.

1. Cellules témoins

On préfère 10 % des cellules du passage précédant celui qui est récolté et on les garde comme témoins non inoculés qui seront utilisés pour les épreuves suivantes :

a) *Titration des virus Echo ou Sindbis.* Dans certains pays on ensemence des séries de 5 tubes avec chaque dilution successive du virus. Après une semaine d'incubation à 37°C, le titre exprimé en DICT₅₀ doit être compris dans l'intervalle normal. Lorsqu'une telle épreuve est appliquée, il incombe au Laboratoire national de Contrôle de fournir les suspensions de virus de référence.

b) *Etude du caryotype.* On pratiquera la recherche de la polyploidie sur 300 cellules en métaphase, des numérations exactes sur 100 cellules en

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1973, N° 523 (Sixième rapport du Comité OMS d'experts de la Rage).

² *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1972, N° 486 ; voir aussi Gušić, 1970.

métaphase et une analyse caryotypique complète sur une cellule au moins. Les proportions de cellules présentant des cassures chromosomiques, des anomalies structurales ou une polyploïdie, ne doivent pas dépasser, respectivement 9 %, 4 % et 5 %¹.

c) *Incapacité d'hétérotransplantation.* On effectuera des épreuves pour vérifier que les cellules sont dénuées de capacité d'hétérotransplantation. Par exemple, on inocule 1 million de cellules dans chaque abajoue de 6 hamsters âgés de trois semaines, dont 3 ont été traités à la cortisone. On place les animaux en observation pendant 3 mois et l'on compare leur sensibilité à celle de séries identiques d'animaux auxquels on a inoculé un nombre équivalent de cellules HeLa, KB ou HEP (Hayflick & Moorhead, 1961). On prélève des échantillons pour examen histologique à la fin de cette expérience. On peut utiliser toute autre épreuve d'une sensibilité au moins équivalente ; par exemple, on a constaté récemment qu'on obtenait de bons résultats avec des épreuves effectuées chez des souris et des hamsters sous immuno-suppression médicamenteuse ou produite par un sérum antilymphocytaire.

d) *L'identité de ces cellules* avec les cellules agréées sera établie sur la base des antigènes du système HL-A, en utilisant l'épreuve de cytotoxicité, ou de fixation du complément (Lapeyre et al., 1970 ; Van Lan Dao, 1971-1972) ou toute autre épreuve de sensibilité équivalente.

e) *Epreuve de recherche des virus hémadsorbants, et examen des cellules restantes.* Au moment d'inoculer les cultures avec le virus de semence, on effectuera une épreuve d'hémadsorption sur 4 % des cellules témoins, en utilisant des globules rouges d'homme, de cobaye, de singe ou de poulet. On répètera l'épreuve après avoir observé les cellules pendant 14 jours. Les résultats seront lus i) après une incubation de 30 minutes entre 2° et 10°C ; ii) après une nouvelle période de 30 minutes à la température ambiante, et iii) après 30 minutes encore à 37°C. Il ne doit pas y avoir d'hémadsorption.

f) *Recherche d'agents contaminants : épreuves sur les animaux.* On inoculera par voie intramusculaire, à raison de 1 million de cellules par animal, 10 souris de moins d'un jour, provenant de deux portées différentes, et 10 souris adultes de 18 à 20 g ; à raison de 2 millions de cellules par animal, 5 cobayes pesant environ 350 g, et 5 lapins d'environ 1,5 kg.

Au bout de 30 jours, 80 % au moins des animaux doivent demeurer en bonne santé ; de plus la mort ou la maladie des autres animaux ne doit pas pouvoir être attribuée aux cellules injectées.

g) *Recherche d'agents contaminants : épreuve sur œufs embryonnés.* On inoculera 10 œufs embryonnés de 9 à 11 jours à raison de 1 million de cellules dans la cavité allantoïdienne de chacun. Au bout de trois jours, les liquides allantoïdiens devront être exempts d'hémagglutinines pour les

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1972, N° 486 ; voir aussi Gušić, 1970.

érythrocytes de poulet et de cobaye lorsqu'ils sont incubés entre 2° et 10°C comme à température ambiante.

h) *Recherche d'agents contaminants : épreuves sur cultures tissulaires.* Au moment de la récolte du virus dans les flacons destinés à la production, on prélèvera les liquides surnageants dans les cultures témoins non inoculées et l'on y recherchera la présence d'agents contaminants, selon la méthode décrite en 2 (c) ci-dessous.

2. Cellules utilisées pour la production de virus rabique de semence

a) *Observation directe.* Les cellules doivent avoir une morphologie normale au moment de l'inoculation du virus.

b) *Epreuves de stérilité :* on prélève 30 ml du mélange des liquides surnageants obtenus juste avant l'inoculation du virus, et on les répartit sur des milieux qui permettent le développement des micro-organismes aérobies et anaérobies, des champignons, et des mycoplasmes.

c) *Epreuves sur les cultures cellulaires pour la recherche d'agents contaminants.* Immédiatement avant l'inoculation avec le virus de semence, on prélèvera des échantillons des liquides surnageants et on en inoculera 10 ml dans chacune des cultures suivantes :

cellules rénales d'embryon humain ;

cellules rénales de singe *Cercopithecus* ou *Erythrocebus* ;

cellules rénales primaires de lapin.

La dilution de l'inoculum dans le milieu nutritif ne doit pas dépasser 1 : 4 et la surface de la couche cellulaire sera d'au moins 3 cm² par ml de mélange des liquides. La morphologie des cellules doit demeurer inchangée pendant 14 à 21 jours. A la fin de la période d'observation, on fera une subculture à partir des cultures de *Cercopithecus* ou d'*Erythrocebus*, dans le même système cellulaire, et l'on examinera ces cultures pendant une nouvelle période de 14 jours. Des épreuves de coloration, effectuées le dernier jour, devront démontrer l'absence d'inclusions spécifiques. Une fois par semaine, on pratiquera sur certaines des cultures des épreuves de recherche des virus hémadsorbants à la température de 2° à 10°C, à celle du laboratoire, et à 37°C, en utilisant des érythrocytes d'homme, de cobaye, de singe et de poulet.

Contrôle de la suspension de virus avant clarification

S'il n'est pas possible d'effectuer les épreuves ci-après dès la récolte, les échantillons prélevés seront congelés à une température égale ou inférieure à -60°C, et ne devront pas être congelés et décongelés plus de deux fois.

1. Titre infectant

On utilisera des souris pesant de 15 à 20 g. On inoculera des dilutions successives de la suspension par voie intracérébrale (0,03 ml) à des groupes

d'au moins 5 souris, et par voie intrapéritonéale (0,1 ml) à d'autres groupes. A la fin de la période d'observation de 15 jours, la différence entre la DL₅₀ par voie intracérébrale et la DL₅₀ par voie intrapéritonéale doit être d'au moins 1000 fois.

2. *Epreuves de pureté et d'identité*

On effectuera les épreuves de recherche de certain agents étrangers en mélangeant 9 volumes de la suspension virale avec 1 volume de sérum anti-rabique ayant un titre suffisamment élevé pour neutraliser en totalité la suspension de virus et n'étant pas d'origine humaine ou simienne. Le mélange est incubé pendant une heure et demie à 37°C.

a) *Epreuves sur les animaux*

Souris pesant de 12 à 15 g. On utilisera 20 souris dont chacune recevra 0,25 ml de la suspension de virus neutralisée par voie intrapéritonéale, 0,02 ml par voie intracérébrale, et 0,01 ml dans le coussinet plantaire. On gardera ces animaux en observation pendant 28 jours, et ils doivent rester en bonne santé. La cause de toute mort survenue pendant cette période doit être établie.

Souriceaux à la mamelle. On administrera 0,1 ml de la suspension neutralisée par voie intrapéritonéale et 0,01 ml par voie intracérébrale à 10 souris de moins d'un jour ou à 20 souris de moins d'une semaine. On gardera les animaux en observation pendant 21 jours, et l'on examinera ceux qui meurent ou tombent malades à partir du deuxième jour afin de déterminer si la maladie est due à la suspension de virus.

Cobayes. On injectera 5 ml de la suspension neutralisée par voie intrapéritonéale à chaque animal d'un groupe de 5 cobayes pesant de 350 à 500 g. Les animaux seront gardés en observation pendant 6 semaines ; au moins 4 d'entre eux doivent survivre, et aucun ne doit présenter de signes d'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, ou d'autre maladie attribuable à la suspension de virus.

Lapins. On utilisera 5 lapins pesant 1,5 à 2 kg et chacun sera inoculé par voie intracérébrale avec 0,25 ml de la suspension neutralisée, par voie sous-cutanée avec 2 ml, et par voie intradermique avec 1 ml (10 points d'inoculation et 0,1 ml dans chacun). Les animaux seront gardés en observation pendant 21 jours. Au moins 4 lapins doivent survivre, et aucun d'entre eux ne doit présenter de signes de maladie attribuable à la suspension de virus.

b) *Epreuves sur cultures cellulaires*

Cellules rénales de singes Cercopithecus ou Erythrocebus. On introduit 10 ml de la suspension de virus neutralisée dans des flacons de culture cellulaire de manière que la dilution n'excède pas 1 : 4 ; au bout de 7 jours, on pratique une subculture par passage de 10 ml du mélange des liquides sur-

nageants sur d'autres cellules rénales de singe. Après avoir gardé les cultures en observation pendant 14 jours à 37°C, on effectue les opérations suivantes :

- i) Une épreuve de recherche des virus hémadsorbants, à l'aide d'érythrocytes de cobaye.
- ii) L'inoculation intracérébrale de 0,03 ml de surnageant à 5 souris pesant de 12 à 15 g, suivie d'une observation de 15 jours.
- iii) Le titrage d'un virus connu par comparaison avec des cellules témoins afin d'établir l'absence d'interférence.

Cellules diploïdes humaines. On introduit 10 ml de la suspension de virus neutralisée dans des flacons de culture cellulaire de manière que la dilution n'excède pas 1 : 4 ; au bout de 7 jours, on pratique une subculture par passage de 10 ml du mélange des liquides surnageants sur d'autres cellules diploïdes humaines. Après avoir gardé les cultures en observation pendant 14 jours à 37°C, on effectue les opérations suivantes ;

- i) Une épreuve de recherche des virus hémadsorbants, à l'aide d'érythrocytes de cobaye.
- ii) L'inoculation intracérébrale de 0,03 ml de liquide surnageant à 5 souris pesant de 12 à 15 g, suivie d'une période d'observation de 15 jours.
- iii) Le titrage d'un virus connu par comparaison avec une série témoin afin d'établir l'absence d'interférence.

Cellules rénales primaires de lapin. On introduit 10 ml de la suspension de virus neutralisée dans des flacons de culture cellulaire de manière que la dilution n'excède pas 1 : 4 ; au bout de 7 jours, on pratique une subculture par passage de 10 ml du mélange des liquides surnageants sur d'autres cellules rénales primaires de lapin. Après avoir gardé les cultures en observation pendant 14 jours à 37°C, on effectue les opérations suivantes :

- i) Une épreuve de recherche des virus hémadsorbants, à l'aide d'érythrocytes de cobaye.
- ii) L'inoculation intracérébrale de 0,03 ml de liquide surnageant à 5 souris pesant de 12 à 15 g, suivie d'une période d'observation de 15 jours.
- iii) Le titrage d'un virus connu par comparaison avec une série témoin afin d'établir l'absence d'interférence.

3. *Epreuves de stérilité*

On répartit 30 ml de la suspension de virus non neutralisée sur des milieux qui permettent la croissance des micro-organismes aérobies et anaérobies, des champignons, et des mycoplasmes (voir chapitre 24, page 234).

Lots de production

Cellules témoins non inoculées

Les cellules utilisées pour la production de vaccins doivent provenir de la « banque » de cellules approuvées, dont il a été démontré qu'elles sont exemptées d'agents étrangers et d'hétérotransplantabilité. Néanmoins, pour la production de chaque lot de vaccin, on utilise un substrat cellulaire qui a subi plusieurs passages depuis celui qui sert à établir la banque de cellules. Il est donc important de prouver qu'il n'y a eu aucune contamination du substrat cellulaire particulier qui est utilisé pour la production de chaque lot de vaccin.

Epreuves sur les cellules témoins

On appliquera aux 10 % de cellules témoins prélevées dans chaque lot de cellules utilisées pour la production de vaccin et gardées non inoculées, les mêmes épreuves qu'aux cellules témoins utilisées dans le cas de la production de lots de semence.

Ces épreuves seront relatives à :

- a) L'étude du caryotype (voir 1 (b), page 355).
- b) L'absence d'hétérotransplantabilité (voir 1 (c), page 356).
- c) La recherche des virus hémasorbants (voir 1 (e), page 356).
- d) La recherche des agents contaminants sur les animaux (voir 1 (f), page 356).
- e) La recherche des agents contaminants, sur œufs embryonnés (voir 1 (g), page 356).
- f) La recherche des agents contaminants, sur cultures cellulaires (voir 1 (h), page 357).

Cellules utilisées pour la production de vaccin

On remplacera le milieu de croissance par un milieu d'entretien ne contenant ni protéine d'origine animale, ni sérum, ni antibiotique sensibilisant tel que la pénicilline ou la streptomycine.

Epreuves effectuées sur la suspension de virus avant la clarification

- a) *Souris pesant de 15 à 20 g.* Titrage comparatif par les voies intracérébrale et intrapéritonéale (voir p. 357).
- b) *Epreuve de stérilité bactérienne* (voir p. 357).

On répartit 20 ml dans des milieux qui permettent la croissance des micro-organismes aérobies et anaérobies, de *Mycobacterium tuberculosis*, des champignons et des mycoplasmes.

Contrôle de la suspension de virus après concentration et inactivation

Le virus sera concentré par une méthode approuvée par l'autorité nationale de contrôle. On déterminera la courbe d'inactivation à des intervalles appropriés par titrage du virus sur des souris pesant de 12 à 15 g. Le temps total d'inactivation doit être au moins le double du temps nécessaire pour obtenir la stérilité virale.

Epreuves sur culture cellulaire

a) *Cellules diploïdes humaines*. On introduira 25 ml de la suspension concentrée inactivée dans le milieu d'entretien de cellules diploïdes humaines de manière que la dilution n'excède pas 1 : 4, et que la surface de la couche cellulaire soit au moins de 3 cm² par ml de liquide de mélange. Les cellules seront observées pendant au moins 21 jours. Au bout de 14 et 21 jours, on prélèvera des échantillons de liquide surnageant pour les inoculer par voie intracérébrale à raison de 0,03 ml à 10 souris pesant de 12 à 15 g. Ces souris seront observées pendant 21 jours. A la fin de la période d'observation des cellules, on vérifiera l'absence d'effet cytopathogène et l'on effectuera une épreuve de recherche des virus hémadsorbants à la température de 2° à 10°C, et à celle du laboratoire, à l'aide d'érythrocytes de cobaye.

b) *Cellules rénales de singes Cercopithecus ou Erythrocebus et cellules rénales primaires de lapins*. On introduira 10 ml de la suspension concentrée inactivée dans chacune des cultures de cellules rénales de *Cercopithecus* et *Erythrocebus* de manière que la dilution dans le milieu d'entretien n'excède pas 1 : 4. Les cellules seront observées pendant 14 jours, et l'on effectuera, à la fin de cette période, des épreuves pour vérifier l'absence d'effet cytopathogène, ainsi que celle de virus hémadsorbants en utilisant des érythrocytes de cobaye à la température de 2° à 10°C et à celle du laboratoire.

Préparation et contrôle du produit final en vrac

1. *Agents conservateurs et autres substances ajoutés*

Seul sera ajouté au produit final en vrac un agent conservateur approuvé par l'autorité nationale de contrôle à la concentration utilisée. Aucun antibiotique ne sera ajouté au vaccin antirabique.

2. *Epreuves de stérilité*

Chaque produit final en vrac sera soumis aux épreuves de stérilité conformément aux dispositions de la Partie A, section 5, de la Révision des Normes N° 6 pour les Substances biologiques (Normes générales relatives à la stérilité des substances biologiques)¹.

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1973, N° 530.

Epreuves de contrôle du produit fini

1. *Epreuve d'identité*

Une épreuve d'identité sera pratiquée par une méthode appropriée sur au moins un récipient étiqueté de chaque lot de répartition. L'épreuve d'immunogénicité peut servir d'épreuve d'identité.

2. *Stérilité*

La stérilité de chaque lot de répartition sera contrôlée (voir ci-dessus).

3. *Epreuve d'innocuité*

Dans chaque lot de répartition, on vérifiera l'absence de toxicité anormale au moyen d'épreuves appropriées par injection parentérale à la souris et au cobaye. Ces épreuves seront pratiquées selon des techniques approuvées par l'autorité nationale de contrôle. Les méthodes suivantes sont préconisées :

a) *Souris*. A 10 souris pesant de 10 à 15 g et provenant d'une souche garantie exempte de micro-organismes pathogènes, et en particulier de virus de la chorioméningite lymphocytaire et de virus du polyome, on inocule : 0,02 ml par voie intracérébrale, 0,25 ml par voie intrapéritonéale, et 0,01 ml dans le coussinet plantaire. Les souris seront observées pendant 15 jours, toute mort ou maladie suspecte survenant à partir du deuxième jour doit être étudiée afin de vérifier que le vaccin n'en est pas responsable.

b) *Cobayes (ou lapins)*. A 2 cobayes de 300 à 350 g, ou 2 lapins de 1,25 à 1,5 kg, on injecte par voie intramusculaire la moitié d'une dose humaine par animal. Ces animaux seront observés pendant 15 jours, et ils ne doivent pas perdre de poids pendant cette période.

4. *Autres normes*

Les épreuves d'activité qui doivent être utilisées sont décrites au chapitre 33. Le vaccin doit satisfaire aux épreuves de stabilité pour les vaccins lyophilisés après conservation des échantillons pendant un mois à 37°C (épreuve de dégradation accélérée). Dans certains pays il est stipulé que chaque lot de répartition soit soumis à une mesure de l'humidité résiduelle.

Les normes concernant l'inspection des récipients définitifs, les dossiers, l'étiquetage, la distribution et l'expédition, le stockage et la date limite d'utilisation devront être conformes aux dispositions correspondantes figurant dans la Révision des Normes N° 1 pour les Substances biologiques (Normes générales relatives aux établissements producteurs et aux laboratoires de contrôle)¹.

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1966, N° 323.

B. VACCINS PRÉPARÉS EN CULTURES PRIMAIRES DE CELLULES D'ORIGINE ANIMALE

Nombre de chercheurs s'efforcent de préparer du vaccin antirabique en dehors du tissu nerveux, en utilisant des cultures tissulaires. Des études sont en cours sur des cultures de cellules rénales de veau et de hamster, ainsi que de fibroblastes d'embryon de poulet, et certains des vaccins ainsi obtenus ont déjà été autorisés dans différents pays. L'introduction de tels vaccins rend désirable l'établissement de normes de sécurité tenant compte de toutes les techniques virologiques qui ont été mises au point pendant la dernière décennie.

Quoiqu'il ne soit pas possible de formuler ici des recommandations spécifiques à propos de normes particulières, certains principes généraux doivent être respectés :

1. Le virus de semence

Toute production doit être fondée sur le système du virus de semence d'une souche virale reconnue stable et immunogène pour l'homme. Il doit avoir été prouvé que le virus de semence est exempt d'agents étrangers.

2. Source de tissu pour les cultures cellulaires

Le tissu utilisé pour la préparation de cultures cellulaires doit provenir d'animaux ou d'oiseaux dont il a été démontré qu'ils sont en bonne santé et exempts d'agents pathogènes déterminés, qui devront être précisés pour chaque espèce animale.

3. Épreuves sur le substrat cellulaire

Lorsqu'on utilise du tissu primaire, chaque lot de cultures cellulaires provenant d'un même animal ou d'un mélange de tissu représente un cas particulier en ce qui concerne la contamination inhérente par des agents étrangers. Pendant les 14 dernières années (c'est-à-dire depuis que les premières normes internationales relatives au vaccin antipoliomyélitique inactivé¹ ont été formulées), il y a eu plusieurs changements dans la conception du contrôle des vaccins viraux quant à l'absence de contaminants. Il a été reconnu qu'en présence d'un grand nombre de particules de virus vaccinal, il est extrêmement difficile de déceler une petite quantité d'un agent étranger qui peut être un contaminant inhérent au substrat cellulaire.

En conséquence, les épreuves destinées à s'assurer qu'un contaminant n'a pas été introduit dans la récolte de virus pendant la production sont effec-

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1959, N° 178.

tuées sur un échantillon de 25 % de chaque lot de cellules, conservées comme tissu témoin non inoculé. Ce principe a été adopté dans les normes internationales relatives au vaccin antirougeoleux inactivé¹, et il est quasi certain qu'il le sera aussi dans toutes les futures normes relatives aux vaccins viraux inactivés.

Les épreuves sur les 25 % de cellules témoins comprennent la subculture des liquides surnageants dans plusieurs systèmes cellulaires, de même que l'examen des cellules témoins pour y rechercher la présence de virus hémasorbants par addition de globules rouges d'origine animale et notamment aviaire.

4. Epreuves sur la récolte de virus

Lorsqu'on s'est assuré qu'aucun agent étranger provenant du substrat cellulaire n'a contaminé la récolte de virus, les seules épreuves qu'il est indispensable d'effectuer sur ce virus vivant sont l'inoculation de milieux appropriés pour la détection des bactéries (particulièrement de *Mycobacterium tuberculosis*), des champignons et des mycoplasmes.

5. Epreuves de contrôle de l'inactivation

On doit prendre bien soin de s'assurer que la méthode d'inactivation appliquée aux récoltes de virus clarifiées donnent des résultats reproductibles. Il est capital d'effectuer de nombreuses épreuves de recherche du virus vivant résiduel sur plusieurs lots de production, et de vérifier que le mélange de virus inactivé a conservé son antigénicité. Les détails précis de la méthode d'inactivation doivent être enregistrés et suivis pour tous les lots de production ultérieurs.

6. Epreuves de contrôle du produit final en vrac inactivé

Les épreuves pour la recherche du virus vivant résiduel sont les mêmes que pour la recherche de tout agent étranger qui peut avoir survécu à l'inactivation. Une quantité appropriée de produit final en vrac sera éprouvée dans plusieurs cultures cellulaires, qui doivent toujours comprendre :

- a) le même système de culture cellulaire que celui dans lequel le virus a été obtenu, mais pas le même lot de cellules ;
- b) un système de culture de cellules humaines ; et
- c) un système de culture de cellules de singe.

Le produit final en vrac doit aussi être éprouvé sur des animaux à la mamelle et adultes, ou sur des œufs fécondés, selon les contaminants susceptibles d'être présents dans le substrat cellulaire.

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1966, N° 329.

7. Epreuves de contrôle du produit fini

Tout le vaccin contenu dans les ampoules définitives doit satisfaire aux épreuves maintenant prescrites pour les autres vaccins viraux. Ces épreuves visent à vérifier :

- a) l'identité ;
- b) l'activité ;
- c) l'inocuité ;
- d) l'absence de bactéries, de champignons et de mycoplasmes.

De plus, la stabilité du produit fini doit avoir été démontrée, et les conditions de stockage doivent être formulées en conséquence.

En ce qui concerne l'étiquetage, des dispositions particulières doivent être examinées pour chaque produit.

Pour nombre d'épreuves ci-dessus, les méthodes préconisées figurent dans la section A (page 361).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hayflick, L. & Moorhead, P. S. (1961) *Exp. Cell Res.*, **25**, 585
- Gušić, B., ed. (1970) *Proceedings of a Symposium on Human Diploid Cells, Zagreb, September 1970*, Zagreb, Académie des Sciences de Yougoslavie
- Lapeyre, D., Hors, J., Dausset, J., Colombani, J. & Netter, R. (1970) *HL-A antigens detected by complement fixation reaction in tissue culture human embryonic cells*. In : Gušić, B., ed., *Proceedings of a Symposium on Human Diploid Cells, Zagreb, September 1970*, Zagreb, Académie des Sciences de Yougoslavie, p. 39
-

ÉPREUVE RAPIDE EN CULTURE TISSULAIRE POUR LA DÉTERMINATION DE L'ANTI- CORPS NEUTRALISANT

J. S. SMITH¹, P. A. YAGER¹ & G. M. BAER¹

L'épreuve *in vivo* (sur la souris) mise au point il y a plus de 30 ans (Webster & Dawson, 1935) a été la technique la plus usitée pour titrer les anticorps neutralisant le virus rabique (NV) mais ces dernières années, plusieurs laboratoires ont élaboré à cette fin des réactions *in vitro*. Aux Etats-Unis d'Amérique, le California State Department of Health utilise actuellement une épreuve d'inhibition des foyers de fluorescence (FFIT) : on mélange le virus rabique Flury LEP avec le sérum à éprouver et l'on ajoute ce mélange à une culture de cellules BHK en couche monocellulaire ; au bout de 4 jours, on applique la méthode de coloration aux anticorps fluorescents (AF) pour déceler la présence ou l'absence d'une invasion virale (Lennette & Emmons, 1971). Des épreuves semblables utilisant le virus fixe CVS sur fibroblastes de poulet (King et al., 1965) et le virus ERA sur cellules BHK-21 (Debbie et al., 1972) ont été décrites. Sedwick & Wiktor (1967) ont montré que la technique de réduction des plages utilisant des cellules BHK-21/S13 en suspension dans l'agarose donnait des résultats en bonne corrélation avec ceux de la détermination de l'indice de neutralisation du virus sur la souris (voir chapitre 8, page 97). Nous avons récemment mis au point une épreuve FFIT rapide (RFFIT) qui peut être exécutée en 24 heures seulement et dont les résultats sont en corrélation étroite avec ceux de la détermination de l'indice NV sur la souris pour le titrage des anticorps NV. Dans la RFFIT, on mélange le sérum à expertiser avec du virus rabique adapté aux cultures tissulaires, on incube ce mélange pendant une heure et demie, puis on y ajoute des cellules BHK 21/S13 traités au DEAE-dextrane ; ensuite on laisse se former des couches monocellulaires. Après une incubation de 24 heures, on applique à ces dernières la coloration AF afin d'y rechercher le virus rabique non neutralisé. L'épreuve s'exécute de la façon suivante :

¹ Laboratory Investigations Unit, Viral Zoonoses Section, Center for Disease Control, Public Health Service, United States Department of Health, Education, and Welfare, Lawrenceville, Ga., Etats-Unis d'Amérique.

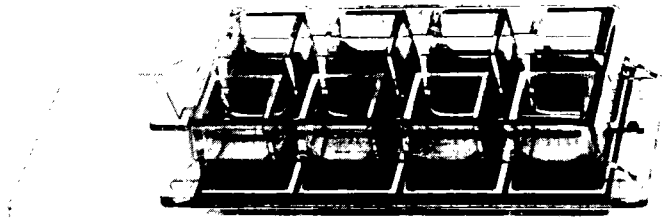
Préparation du virus d'épreuve

Le virus rabique d'épreuve est la souche CVS-11 (Kissling, 1958), cultivée sur cellules BHK-21/S13. La dose d'épreuve optimale est la plus forte dilution de virus qui donne une vive coloration AF dans ces cellules après 24 heures¹; nous avons trouvé que cette dose est de 0,16 UFP/cellule ou 16 000 UFP/0,1 ml de suspension virale.

Mélange sérum-virus

Tous les sérums à expertiser sont inactivés à 56°C pendant 30 minutes. Les sérums congelés et conservés pendant plus de deux mois sont inactivés à nouveau avant l'épreuve. On traite les sérums animaux avec du kaolin afin d'adsorber les inhibiteurs non spécifiques (Hierholzer et al., 1969) : on ajoute à chaque sérum un volume égal de kaolin à 25 %, et l'on garde le

FIG. 1 : PLAQUES LAB-TEK A RÉCIPIENTS POUR CULTURE TISSULAIRE (LAB-TEK TC CHAMBER SLIDES)



mélange à la température ambiante pendant 20 minutes en l'agitant fréquemment ; il est ensuite centrifugé à 800 g pendant 10 minutes à la température ambiante. On considère que le liquide surnageant est une dilution à 1 : 2 du sérum original. On emploie comme témoin le sérum de référence NIH. Les sérums humains peuvent être éprouvés aux dilutions de 1 : 5 et 1 : 50 (dilutions exploratoires), mais pour un titrage plus exact des anticorps, on peut pratiquer des dilutions de raison 5. Ces dilutions sont faites sur des plaques portant de petits récipients pour culture de tissu (Lab-Tek TC Chamber Slides)² (fig. 1) ; on ajoute 0,1 ml de la dilution appropriée du virus d'épreuve à des volumes finals de 0,1 ml de toutes les dilutions de sérum. Les plaques sont alors incubées à 35°C dans une enceinte à humidité contrôlée avec du CO₂ pendant 90 minutes.

¹ Titrée par rapport au sérum de référence NIH, cette dilution doit donner des titres d'anticorps NV comparables à ceux que l'on obtient par détermination de l'indice NV sur la souris.

² Qu'on peut se procurer chez : Lab-Tek Products, Division of Miles Laboratories, Inc., Westmont, Ill., Etats-Unis d'Amérique.

FIG. 2: CELLULES BHK-21/S13 INFECTÉES DE RAGE (PAS D'ANTICORPS)

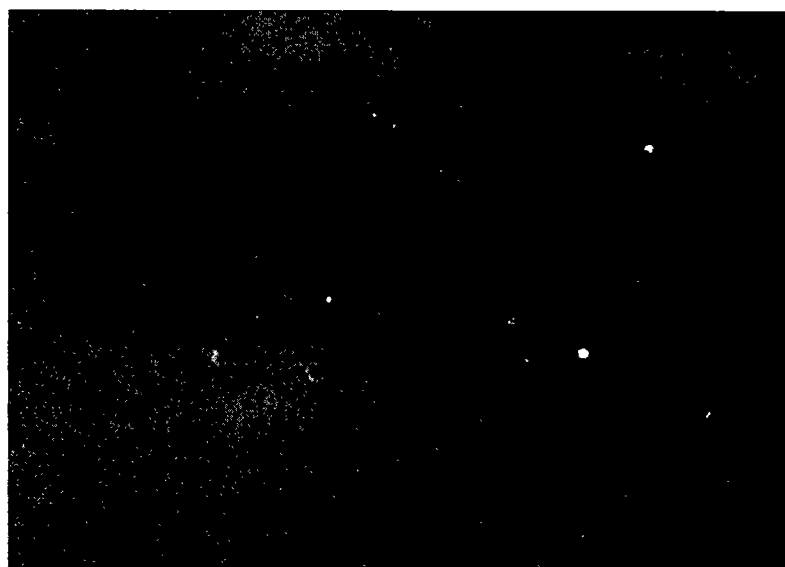
Addition des cellules

Les cultures BHK-21/S13 peuvent être effectuées dans des récipients de plastique ou de verre. Le milieu de culture est le MEM de Eagle, modifié par MacPherson & Stoker (voir chapitre 9, annexe 1, page 123), complété avec 10 % de sérum bovin fœtal inactivé et 10 % de bouillon au tryptose phosphate. Des couches monocellulaires BHK de 1 à 4 jours (passage compris entre le 25^e et le 50^e) sont trypsinées pour servir dans la RFTIT. Immédiatement avant d'être utilisées dans cette épreuve, les cellules sont traitées avec une solution de DEAE-dextrane¹ en milieu de culture (10 ug/ml) pendant 10 minutes à la température ambiante. Des suspensions contenant 1×10^5 cellules/0,2 ml de milieu de culture sont introduites dans chacun des 8 récipients, des Lab-Tek TC Slides, puis ces plaques sont remises dans l'enceinte à CO₂.

Fixation et lecture de l'immunofluorescence

Après une durée d'incubation de 24 heures, on enlève le milieu nutritif, puis on rince les cultures une fois dans une solution physiologique tamponnée au phosphate, et une fois dans de l'acétone à la température ambiante, puis on les fixe pendant 1 minute dans l'acétone à -20°C. La coloration AF (Goldwasser & Kissling, 1958) est exécutée selon la description figurant au

¹ Qu'on peut se procurer chez : Pharmacia, Uppsala, Suède.

FIG. 3 : CELLULES BHK-21/S13 NON INFECTÉES (ANTICORPS PRÉSENTS)

chapitre 6 (page 75) avec un conjugué préparé selon les techniques classiques (voir chapitre 6, page 83), et traité deux fois avec des cellules BHK-S13 normales. Examen au microscope à fluorescence avec des filtres appropriés d'excitation et d'arrêt, la source lumineuse étant une lampe à vapeur de mercure à pression élevée Osram HBO 200. Pour chacun des 8 récipients Lab-Tek de dilution, on observe 20 champs microscopiques au faible grossissement ($160\times$), et le nombre de champs contenant des cellules fluorescentes est porté dans un tableau. Sur les 20 champs observés dans les plaques témoins du virus d'épreuve, 18 à 20 contiennent des cellules fluorescentes (fig. 2). Une réduction de 50 % ou plus du nombre des champs présentant des cellules fluorescentes (fig. 3) indique la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum à éprouver.

Résultats

Nous avons comparé les résultats de la RFFIT et ceux qui ont été obtenus avec l'épreuve classique de détermination de l'indice NV sur la souris (voir chapitre 8, page 97) : la concordance était supérieure à 95 %, 5 % environ des sérums étant négatifs dans l'épreuve NV, mais positifs dans la RFFIT. On n'a pas décelé d'anticorps dans les sérums de personnes non vaccinées. De plus, les titres des anticorps NV obtenus par le RFFIT sont identiques à ceux que fournit la détermination de l'indice de neutralisation du virus sur la souris.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Debbie, J. G., Andrulonis, J. A. & Abelseh, M. K. (1972) *Infection and Immunity*, **5**, 902
- Goldwasser, R. A. & Kissling, R. E. (1958) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **98**, 219
- Hierholzer, J. C., Suggs, M. T. & Hall, E. C. (1969) *Appl. Microbiol.*, **18**, 824
- King, D. A., Croghan, D. L. & Shaw, E. L. (1965) *Canad. vet. J.*, **9**, 187
- Kissling, R. E. (1958) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **98**, 223
- Lennette, E. H. et Emmons, R. W. (1971) *The laboratory diagnosis of rabies : Review and perspective*. In : Nagano, Y. et Davenport, F., ed., *Rabies, Proceedings of Conference on Rabies, sponsored by the Japan-United States Cooperative Medical Science Program*, Tokyo, University of Tokyo Press
- Sedwick, W. D. et Wiktor, T. J. (1967) *J. Virol.*, **1**, 1224
- Webster, L. T. et Dawson, J. R. (1935) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **32**, 570
-

LA RÉACTION DE L'IMMUNOPEROXYDASE POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DU VIRUS RABIQUE

*P. ATANASIU*¹

L'introduction en histochimie des anticorps marqués par des enzymes pour localiser des antigènes (Nakane & Pierce, 1968) a été suivie de l'utilisation en virologie de la réaction par l'immuno-peroxydase (Kurstak et al., 1969 ; Wicker & Avrameas, 1969). Cette méthode a été adaptée pour servir au diagnostic de la rage et à la détection de l'antigène rabique dans les cellules.

On trouvera décrites ci-après les techniques de purification de l'anticorps antirabique par immuno-adsorption, de préparation du conjugué peroxydase-anticorps antirabique, et de coloration directe et indirecte. Les résultats obtenus sont examinés.

Préparation de l'anticorps antirabique immuno-adsorbé

On inocule des souriceaux de 4 jours en injectant à chacun d'eux par voie intracérébrale 100 DL₅₀ de virus rabique de la souche Pasteur. Les cerveaux sont récoltés au bout de 5 jours à l'aide d'une seringue-pistolet branchée sur une pompe à vide. Ils sont broyés et le broyat est dilué avec une quantité égale d'eau distillée. On centrifuge alors le mélange pendant 10 minutes à 1500 g et l'on prélève 10 ml du liquide surnageant pour y doser les protéines par la méthode de Biuret. On ajoute alors de la sérumalbumine bovine, à raison de 4 parties d'albumine pour 1 partie de protéine antigène. On mélange le tout avec 40 ml d'une solution d'acide acétique tamponnée, de pH 5 (acide acétique 0,2M, et acétate de sodium 0,2M) et 8 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5 %. Au bout de 2 heures, le gel obtenu est lavé à plusieurs reprises avec un soluté salin tamponné au phosphate, de pH 7,4 (solution de chlorure de sodium 0,15M contenant du tampon phosphate 0,01M), puis on y ajoute 10 ml de sérum antirabique hyperimmun et l'on agite pendant 1 heure à la température du laboratoire pour permettre à l'immuno-adsorption de se produire. Ensuite, le gel est lavé à nouveau à plusieurs reprises avec un soluté tamponné au phosphate.

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

L'anticorps immuno-adsorbé est récupéré à partir du gel par élution avec un tampon acide (pH 2,8) contenant de l'acide chlorhydrique 0,2N et de la glycine 0,2M; on détermine alors la quantité totale de protéines recueillie. Après neutralisation, on dialyse la solution pendant la nuit, puis on la concentre (Avrameas & Ternynck, 1969); la concentration finale doit être de 5 à 7 mg d'anticorps purifié par millilitre.

Conjugaison de l'anticorps antirabique avec la peroxydase

On ajuste le pH de la solution d'anticorps antirabique purifié à 6,8, par addition d'une solution de phosphate de potassium (K_2HPO_4) 0,1M. Pour chaque ml de solution contenant 5 à 7 mg d'anticorps purifié, on ajoute 10 à 14 mg de peroxydase¹, puis 0,05 ml de glutaraldéhyde à 1%. On agite le mélange pendant 2 heures à la température du laboratoire, puis on dialyse pendant la nuit contre de la solution physiologique de pH 7,4. Le lendemain, on centrifuge la solution pendant 15 minutes entre 1500 et 2000 g. On dilue le conjugué ainsi obtenu au 1 : 10 avant l'utilisation (Avrameas & Ternynck, 1969).

Coloration directe

Le matériel reçu (impressions de cerveau infecté de virus rabique fixe ou sauvage, coupes d'organes congelés, cellules de culture contenant le virus, etc.) est immédiatement fixé par immersion pendant 10 minutes dans l'acétone froide ($-20^{\circ}C$). La préparation séchée, sur lames ou lamelles, est ensuite recouverte du conjugué anticorps-peroxydase dilué à 1 : 10 dans du soluté physiologique, et elle est gardée ainsi en atmosphère humide pendant 3 heures à la température du laboratoire. On lave alors la préparation dans l'eau distillée, puis on la laisse pendant 5 à 10 minutes en contact avec une solution de tétrachlorhydrate de tétraamino-3,3',4,4'-biphényle (à 0,5 g/litre), tamponnée à pH 7,4 par du Tris à 0,1M. Après un nouveau lavage, cette préparation est montée à l'Elvanol² et examinée au microscope photonique.

Coloration indirecte

Cette coloration peut être effectuée sur des frottis-décalques, des coupes congelées de 3 à 5 μm d'épaisseur ou des cultures cellulaires infectées, après fixation et séchage. On recouvre la préparation soit d'un sérum antirabique humain dilué à 1 : 5 ou 1 : 10, soit, de préférence, d'un sérum de lapin anti-

¹ Le Type VI qui convient à cette réaction (RZ approx. 3,0) peut être obtenu chez : Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St Louis, Miss., Etats-Unis d'Amérique.

² Alcool polyvinylique, qui peut être préparé par la méthode de Rodriguez & Deinhardt (1960). On peut se le procurer chez E. I. Du Pont de Nemours & Co., Inc., Wulmington 98, Del., Etats-Unis d'Amérique.

nucléocapside du virus rabique, dilué à 1 : 100. On utilise du tampon barbital pH 7,2 de Coons¹ pour toutes les dilutions et les lavages. La préparation est laissée en contact avec le sérum pendant 30 minutes à la température du laboratoire, puis lavée pendant 15 minutes avec du tampon de Coons dilué, et enfin rincée avec de l'eau distillée.

On traite alors la préparation avec une goutte de sérum de mouton anti-globuline de lapin ou antiglobuline d'homme, marqué à la peroxydase² et dilué avec le tampon de Coons selon le mode d'emploi donné. On laisse en contact pendant 60 minutes à la température du laboratoire. Après lavage, on révèle l'activité de la peroxydase comme dans la technique directe avec la même solution de tétra-aminobiphényle tamponnée et le même temps de contact. On lave à nouveau la préparation, on la monte dans de l'Elvanol et on l'examine au microscope photonique. Des témoins positifs et négatifs sont nécessaires dans les deux techniques de coloration (directe ou indirecte).

Résultats

Dans les impressions de cerveau contenant du virus fixe, l'antigène rabique peut apparaître sous forme de petites et de grandes particules ou sous l'aspect d'une masse formée d'une poussière. Par contre, dans le cas de la rage des rues, on rencontre de gros corpuscules brun-jaunâtre, plus foncés à la périphérie (voir Planche I F, en face de la page 74). On observe la même différence lorsqu'on utilise la technique des anticorps fluorescents (voir Planche II, en face de la page 80).

Dans de rares occasions, on a pu discerner dans les gros corpuscules une structure interne sous forme de condensation plus sombre.

En cultures cellulaires et sur coupes d'organe, l'antigène se voit à un stade très précoce dans le cytoplasme, et plus tard il est réparti dans un groupe de cellules contiguës, donnant l'aspect d'un foyer. Sa taille varie de la limite de la visibilité jusqu'à 10 μ m. Il a toujours la même couleur brun-jaunâtre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Atanasiu, P., Dragonas, P., Tsiang, H. & Harbi, A. (1971) *Ann. Inst. Pasteur*, **121**, 247
Avrameas, S. & Ternynck, T. (1969) *Immunochemistry*, **6**, 53
Kurstak, E., Cote, J. R. & Belloncik, S. (1969) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **268**, 2309
Nakane, P. K. & Pierce, G. B. (1966) *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 929
Rodríguez, G. & Deinhardt, F. (1960) *Virology*, **12**, 316
Wicker, R. & Avrameas, S. (1969) *J. gen. Virol.*, **4**, 465

¹ Solution mère : chlorure de sodium, 85 g ; barbital sodique, 20,6 g ; acide chlorhydrique 1,0 N, 83 ml ; eau distillée, qs pour 5 litres. Diluer avec un volume égal d'eau distillée avant l'utilisation.

² Que l'on peut se procurer chez : Production S.A., Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, (75) Paris 15^e, France.

ADRESSES DES CENTRES OMS DE RÉFÉRENCE POUR LA RAGE

Centres internationaux de Référence

Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, (75) Paris 15^e, France

Pasteur Institute of Southern India, Coonoor 3, India

Institut de la Poliomyélite et des Encéphalites virales, Académie des Sciences
médicales de l'URSS, Kievskoe Šosse 27 km, Moscou V. 27, URSS

The Wistar Institute, Thirty-sixth Street at Spruce, Philadelphia, Pa 19104,
Etats-Unis d'Amérique

Centre régional de référence pour la rage dans les Amériques

Center for Disease Control, Public Health Service, P.O. Box 363, Lawrence-
ville, Ga 30245, Etats-Unis d'Amérique

INDEX

INDEX

- Acétate de zinc, précipitation par, 152, 172, 175, 267
- Activité neuroallergène, 23, 26
épreuves, 303-304
- Activité relative, 291-294
- Aérosols, 15-16, 201, 209
- Antibiotiques
vaccins vivants, 246
virus de semence, 225
Voir aussi Méthodes des cultures tissulaires
- Anticorps, épreuves
adsorption, 300-302
anticorps lytiques, 118
détermination de l'indice de neutralisation, 97-100
diffusion en milieu gélatiné, 155-162
fixation du complément, 121, 127-137
hémagglutination et inhibition de l'hémagglutination, 138-150
hémagglutination passive, 151-154
réduction des plages, 116
titrage radio-immunologique, 188-191
- Antigènes
production de sérum antirabique, 84, 300-312, 313
purification, *voir* Purification des antigènes
- Cellules diploïdes humaines pour la production de vaccin, 265-269, 354-365
- Centres de référence, adresses, 374
- Clonage, 115
- Concentration des virions, 173, 267
- Contamination des spécimens, 52, 53, 91, 96
Voir aussi Désinfection au laboratoire
- Corps de Négri, 42-74, 109
- Cultures tissulaires, méthodes des, 103-126, 265-276, 354-370
clonage, 115
contrôle de sécurité du vaccin, 354-365
cultures primaires, 102, 363-365
formation de plages, 26, 113-117, 350-353
hémagglutination, 121
infectivité, 119
interféron, 122-123
lignées cellulaires continues, 105, 171, 265, 350, 366, 368
- Cultures tissulaires, méthodes des (*suite*)
microscopie électronique, 167-169
milieux pour les, 107, 113-115, 123-125, 268, 272, 274, 276, 368
- Désinfection au laboratoire, 16
- Diffusion en milieu gélatiné, 155-162
- Dose adsorbante (DA₅₀), 301
efficace (DE₅₀), 292-293
- Epreuves d'activité pour le sérum et les immunoglobulines, 323-327
pour les vaccins
adsorption des anticorps, 300-302
cobaye, 295-299
généralités, 24-26
Habel, 284-286
NIH, 287-294
- Epreuves des anticorps fluorescents, 21-22, 73, 75-87
cultures tissulaires, 109, 366-370
marquage, 86-87, 346-349
production du sérum antirabique, 83-87
- Fixation du complément, 127-137
dans les cultures tissulaires, 131
- Habel, test de, 24, 284-285
méthode simplifiée, 286
modification pour les vaccins vivants, 285
- Hémagglutination, épreuves d', 121, 138-154
- Histopathologie, 20, 42-74
préparation des tissus, 42-49, 63, 66-68
technique de coloration, 53-57, 62-71, 73
Voir aussi Spécimens
- Immunisation avant exposition, 17-18
- Immunoglobuline
épreuve d'activité, 323-327
équine, 313-315
humaine, 316-321
normes d'activité, 315, 321, 327
unités internationales, 26, 326-327
- Immunoperoxydase, réaction de l', 371-373

- Inactivation du virus
 phénol, 201, 206-209, 222
 β -propiolactone, 215, 218, 252, 257-259, 267, 269
 rayonnement ultraviolet, 227, 232, 236-242, 267
- Innocuité des vaccins, *voir sous chaque vaccin*
- Interféron, 122-123
- Irradiation ultraviolette, 227, 232, 236-242, 267
- Lyophilisation
 vaccins inactivés, 210, 215, 222, 232, 259
 vaccins vivants, 248, 275
Voir aussi sous les différents vaccins
- Méthodes de calcul, 331-345
 numérations de plages, 343-345
 réduction des plages, 116
 Reed & Muench, 339-342
 Spearman-Kärber, 331-339
Voir aussi Epreuves d'activité de diagnostic
 anticorps fluorescents, 72, 75-87, 109, 366-370
 considérations générales, 20-23
 épreuve rapide en culture tissulaire, 366-370
 fixation du complément, 121, 127-137
 immunoperoxidase, 371-373
 indice de neutralisation, 97-100
Voir aussi Corps de Négri; Histopathologie; Spécimens
 des plages, 111-116, 350-353
 clonage, 115
 numération, 343-345
 réduction des plages, 116-117, 301-302
- Microscopie électronique, 163-170
- Morphologie, *voir* Virion
- Neutralisation, épreuves, 22
 activité du sérum, 323-327
 réduction des plages, 116-117
 sur la souris, 97-100
- Normes pour l'activité des sérums et des immunoglobulines, 327
- Paralyse, *voir* Activité neuroallergène
- Phénol, dans la fabrication du vaccin, 201, 206, 208, 222
 détermination du, 219
- Pouvoir encéphalotogène, épreuve, 217-218, 235, 303-304
- Précautions à prendre au laboratoire, 15-16
- Précipitation en milieu gélifié, 155-162
Voir aussi Purification des antigènes
- Production de vaccin
 animaux à la mamelle,
 cerveau de lapereau, 229-235
 cerveau de raton, 221-223
 cerveau de souris, 219, 224-228
 aviaire
 embryon de canard, 251-264
 embryon de poulet, 243-250
 cerveau de mouton, 208-220
 considérations générales, 23-26, 195-197
 cultures tissulaires
 à usage vétérinaire, 270-276
 pour l'homme, 265-269
 type Fermi, 206-207
 type Semple, 198-205
- β -propiolactone
 dans la production de vaccins, 215, 252, 257-259, 267, 269
 titrage, 218
- Purification des anticorps (sérum antirabique)
 pour l'épreuve AF, 86-87, 346-347
 prophylaxie, 311
Voir aussi Immunoglobuline
- Purification du virus, 151-152, 171-187, 267
- Réactifs de référence, 288, 300, 325
- Reed et Muench, méthode de calcul, 339-342
- Sérum antirabique
 concentration et purification, 311-312
 épreuve d'activité AF, 83-86
 production, 307-312, 313
 teneur en protéines, 311
 unités internationales, 326-327
Voir aussi Immunoglobuline
- Spearman-Kärber, méthode de calcul, 331-339
- Spécimens
 cerveau, extraction et dissection, 31-34, 38-41, 42, 61-66, 95
 emballage et transport, 29-34
 fixation, 37, 66-67
 glandes salivaires, 35-36
 glycérolés, 36-37
 préparation de tissu sur lame, 42-49, 51-53, 62-63, 66-68, 89-92
 stérilité, 52-53, 91, 96

- Stabilisants pour les vaccins, 230, 248, 262-263
- Stérilité du matériel diagnostique, 52-53, 91, 96
Voir aussi sous chaque vaccin
- Test NIH, 24, 287-294
- Titration, méthodes de calcul
Reed & Muench, 339-342
Spearman-Kärber, 331-339
- Titration radio-immunologique des anticorps, 188-191
- Vaccins, épreuves d'activité et de sécurité
adsorption des anticorps, 300-302
considérations générales, 23-26, 279-283
épreuve d'activité neuroallergène, 303-304
épreuve NIH, 287-294
épreuve sur embryon de poulet, 295-299
- test de Habel, 284-285
- vaccins à base de cellules d'origine animale, 363-365
- vaccins préparés en cellules diploïdes humaines, 354-362
- préparations
en cellules diploïdes humaines, 265-269
sur des animaux à la mamelle, 23-26
lapereau, 229-235
raton, 221-223
souriceau, 219, 224-228
sur embryon de canard, 195, 251-264
sur embryon de poulet, 243-250
type Fermi, 23-26, 206-207
type Semple, 23-26, 198-205
- Valeur antigénique, 292-293, 301
- Virion,
concentration, 151, 172-176, 267
constituants, 177-184
propriétés, 13, 163-170
-

