

RAGE

RÉSUMÉ

La rage est une zoonose majeure pour laquelle les techniques sont standardisées au niveau international. Comme il n'y a pas de lésion pathognomonique de la rage, le diagnostic ne peut être porté qu'au laboratoire. Les techniques de diagnostic de laboratoire sont de préférence appliquées au système nerveux central (SNC) extrait de la boîte crânienne. L'analyse doit porter sur plusieurs échantillons du SNC et de la moelle épinière.

Identification de l'agent pathogène : *l'identification de l'agent est faite de préférence au moyen de la technique d'immunofluorescence (IF). Une goutte d'immunoglobuline purifiée préalablement conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine est déposée sur une empreinte (ou un étalement) de tissu cérébral fixé à l'acétone. Des empreintes sont faites de préférence à partir de plusieurs parties du SNC comprenant l'hippocampe, le cervelet et le bulbe rachidien. Pour tester un grand nombre d'échantillons, comme lors d'enquêtes épidémiologiques, une technique immunoenzymatique peut fournir rapidement des résultats. L'IF donne un diagnostic fiable à 98-100 % pour tous les génotypes de virus si un conjugué sensible est utilisé.*

Des cellules nerveuses infectées ont été mises en évidence au moyen d'épreuves histologiques qui révèlent des agrégats de matériel viral (les corps de Negri) dans le cytoplasme des neurones. Cependant, la sensibilité des techniques histologiques est bien inférieure à celle des méthodes immunologiques, surtout si l'autolyse de l'échantillon a commencé. Par conséquent, les techniques histologiques ne peuvent plus être recommandées.

Comme une seule épreuve négative sur matériel frais n'élimine pas toute possibilité d'infection, des épreuves d'inoculation, ou d'autres épreuves, devraient être entreprises en même temps. Des souriceaux nouveaux-nés ou des souris de 3 à 4 semaines sont inoculés par voie intracérébrale avec un mélange de différents tissus du SNC (incluant la moelle épinière) et gardés en observation pendant 28 jours. Pour toute souris mourant entre le 5^e et le 28^e jour, la cause de la mort doit être confirmée par IF. Une alternative possible aux épreuves sur souris est l'inoculation de cellules sensibles en culture avec le même matériel que celui utilisé pour les souris. L'IF réalisée après une période d'incubation adéquate permet de mettre en évidence une éventuelle répllication virale. Chaque fois que cela est possible, l'isolement du virus sur cellules doit remplacer l'épreuve d'inoculation à la souris.

L'identification de l'agent peut être effectuée dans des laboratoires spécialisés en identifiant des variants au moyen d'anticorps monoclonaux, de sondes nucléiques spécifiques ou par une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) suivie d'un séquençage des produits d'amplification. Ces techniques permettent de différencier les souches vaccinales des souches sauvages, elles permettent aussi d'identifier l'origine géographique des souches de terrain. Ces épreuves très sensibles ne devraient être utilisées que par un personnel bien entraîné dans des laboratoires spécialisés.

Épreuves sérologiques : *l'épreuve prescrite pour les échanges internationaux est l'épreuve de séroneutralisation virale (SN) sur culture cellulaire. D'une manière alternative, il est possible d'utiliser une épreuve qui corrèle avec ces épreuves prescrites, en particulier la méthode immuno-enzymatique (ELISA) utilisant les anticorps contre la protéine G ou l'épreuve de neutralisation sur souris. Les résultats sont exprimés en Unités Internationales (UI) ou en unités équivalentes par rapport à un antisérum étalon international.*

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :
les vaccins antirabiques à usage vétérinaire contiennent soit un virus vivant atténué pour l'espèce cible (comme les souches Flury LEP ou HEP, Street-Alabama-Dufferin ou Kelev) ou bien un virus inactivé par des moyens chimiques ou physiques ou bien encore un vaccin recombinant. Le virus est cultivé dans le SNC d'animaux nouveaux-nés, sur oeufs embryonnés ou sur culture cellulaire.

Les vaccins antirabiques sont d'habitude lyophilisés mais des vaccins inactivés, en général adjuvés, peuvent être conservés sous forme liquide.

Avant que des vaccins nouvellement développés ne soient agréés, la durée de l'immunité qu'ils induisent doit être déterminée sur des animaux de l'espèce cible.

Pour des vaccins vivants, la dose virale minimale qui induit la réponse immune recherchée doit être établie.

L'activité des vaccins inactivés est établie et contrôlée sur souris avec une vaccination suivie d'un test intracérébrale selon les tests de l'United States Department of Agriculture ou de la Pharmacopée Européenne. Les produits finaux de ces 2 types de vaccins sont soumis à des tests d'innocuité et d'absence de toxicité.

Les vaccins vivants préparés pour la vaccination orale des animaux sauvages (ou domestiques) doivent subir des tests d'innocuité et d'efficacité chez les espèces cibles et des tests d'innocuité sur les espèces non-cible.

A. INTRODUCTION

La rage est due à un virus neurotrope du genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*, elle est transmissible à tous les mammifères. Comme elle est transmissible à l'homme par inoculation ou par inhalation de particules infectieuses, tout matériel suspect doit être manipulé dans des conditions de sécurité recommandées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (37).

Sept lignées distinctes peuvent être distinguées au sein du genre *Lyssavirus* au moyen de tests de protection croisée ou par analyse génétique (5,14, 21), à savoir : le virus rabique classique (RABV, génotype 1, sérotype 1), le virus Lagos bat (LBV, génotype 2, sérotype 2), le virus Mokola (MOKV, génotype 3, sérotype 3) et le virus Duvenhage (DUUV, génotype 4, sérotype 4). Le virus des chauves-souris européennes (EBLV), lui-même subdivisé en 2 biotypes, EBLV1 (génotype 5) et EBLV2 (génotype 6) et le virus des chauves-souris australiennes (ABLV, génotype 7), récemment isolé en Australie (24), sont aussi des membres du genre *Lyssavirus*, mais ils ne sont pas encore classés en sérotypes. Les virus des sérotypes 2 à 4, EBLV et ABLV sont connus comme des virus apparentés à la rage. L'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcMs) spécifiques de la nucléocapside ou de la glycoprotéine et le séquençage de certaines zones du génome ont permis de subdiviser chaque sérotype en de nombreux sous-types. Les lyssavirus causent une maladie dont la clinique n'est pas différente de la rage classique. Des sites antigéniques conservés sur les protéines de la nucléocapside permettent la reconnaissance de tous les lyssavirus avec des préparations commerciales de conjugué antirabique utilisé dans les épreuves de diagnostic sur tissus cérébral. Pour les virus RABV, DUUV, EBLV et ABLV, des sites antigéniques conservés sur la partie externe de la glycoprotéine permettent une neutralisation croisée et une protection croisée après vaccination antirabique. Il y a peu ou pas de protection croisée contre MOKV ou LBV après vaccination antirabique, de plus la plupart des sérums antirabiques ne neutralisent pas ces lyssavirus.

Le personnel travaillant sur du matériel suspect doit être vacciné contre les lyssavirus et les autres agents pathogènes qui peuvent être présents dans les échantillons soumis pour diagnostic. Le laboratoire doit suivre les règles nationales de bioconfinement et de biosécurité pour protéger le personnel du contact des agents pathogènes. Il doit aussi suivre les recommandations du Chapitre I.1.6., « La biosécurité au laboratoire de microbiologie vétérinaire ».

L'OMS recommande la vaccination préventive du personnel exposé. Le protocole d'immunisation comprend 3 injections aux jours 0, 7 et 28. Le contrôle sérologique de la réponse est fait 1 à 3 semaines après la dernière injection, il est suivi tous les 6 mois pour le personnel de laboratoire et tous les 2 ans dans les autres cas. Un rappel vaccinal est administré lorsque le titre tombe sous 0,5 UI par mL. En l'absence de contrôle sérologique, le régime vaccinal comprend un rappel à 1 an puis tous les 1 à 3 ans.

Comme aucun signe clinique et aucune lésion macroscopique ne peut être considérée comme pathognomonique de la rage chez les animaux domestiques ou sauvages, le diagnostic de la rage repose sur des épreuves de laboratoire. Le diagnostic sérologique de l'infection est rarement utile à cause de la séroconversion tardive et de la mortalité élevée chez l'espèce hôte, cependant, ces données peuvent être utilisées dans des enquêtes épidémiologiques.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

L'examen clinique ne peut conduire qu'à une suspicion de rage parce que les symptômes de la maladie ne sont pas caractéristiques et peuvent varier grandement d'un animal à l'autre (36). Le seul moyen d'établir un diagnostic fiable de rage est d'identifier le virus ou l'un de ses composants spécifiques au moyen d'épreuves de laboratoire.

Comme le virus rabique est rapidement inactivé, les échantillons suspects doivent être envoyés au laboratoire réfrigérés et par le moyen le plus rapide. Les conditions d'expédition font partie de la « chaîne de diagnostic de la rage ».

Plusieurs techniques de laboratoire peuvent être utilisées, elles sont détaillées dans la quatrième édition du manuel de l'OMS « *La rage – Techniques de laboratoire* » (37). Ces méthodes varient en efficacité, spécificité et fiabilité. Elles sont classiquement appliquées à du tissu cérébral, mais elles peuvent aussi être utilisées, bien qu'éventuellement de manière moins efficace, à d'autres tissus (les glandes salivaires par exemple). Dans le cerveau, le virus est particulièrement abondant dans le thalamus, la protubérance annulaire et le bulbe rachidien. L'hippocampe (corne d'Ammon), le cervelet et différentes parties de l'encéphale sont négatifs dans 3,9 à 11 % des cerveaux positifs. La structure de choix est le thalamus qui est positif dans tous les cas. Il est donc recommandé de collecter et de tester plusieurs échantillons de cerveau en incluant la moelle épinière (12). Pour avoir accès à ces parties du cerveau, il est nécessaire de le retirer de la boîte crânienne après son ouverture en salle d'autopsie. Dans certaines conditions, (par exemple sur le terrain ou lors d'enquêtes épidémiologiques importantes), une méthode de prélèvement simplifiée par le trou occipital (11) ou par la cavité orbitale (26) peut être utilisée.

a) Expédition des échantillons

L'expédition de matériel suspect pour diagnostic (têtes, cerveaux ou autres tissus) ne doit pas entraîner de risque de contamination humaine : les cerveaux sont placés dans un contenant rigide et étanche (les têtes sont emballées dans une matière absorbante) selon les recommandations sur le transport des denrées dangereuses de l'Association Internationale du Transport Aérien (IATA). Ces recommandations sont résumées dans le Chapitre I.1.1., « Méthodes de prélèvement ».

Lorsqu'il n'est pas possible de faire un envoi sous froid, d'autres techniques de préservation peuvent être employées. Le choix de la méthode de préservation conditionne l'utilisation des techniques utilisables pour le diagnostic :

- Le formol inactive le virus, les épreuves d'inoculation sont donc inutilisables et le diagnostic ne peut être fait que par IF avec une technique modifiée et moins sensible, par immunohistochimie ou histologie (33, 37) ;
- Le pouvoir infectieux peut être prolongé à température ambiante pendant plusieurs jours en maintenant le cerveau dans un mélange de glycérol à 50 % dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS). Ce mélange glycérol/PBS ralentit la croissance bactérienne et protège par conséquent des effets toxiques et biologiques de la putréfaction. Il ne protège pas contre la baisse de titre due à la température, par conséquent, le virus rabique étant thermolabile, le titre viral va décroître au cours du temps pendant la conservation en glycérol/PBS. Dans les conditions de transport habituelles en milieu tropical, cette protection est efficace pour plusieurs jours. Par conséquent, à chaque fois que cela est possible, les échantillons conservés en glycérol/PBS devraient être réfrigérés. Comme le mélange glycérol/PBS n'inactive pas le virus rabique, toutes les épreuves de laboratoire sont donc utilisables.

b) Collecte des échantillons

En général, le cerveau est prélevé après ouverture de la boîte crânienne en salle d'autopsie, les échantillons pour diagnostic sont prélevés ensuite par dissection. Cette étape peut être dangereuse si le personnel de laboratoire n'est pas entraîné ou sur le terrain. Il est alors possible d'utiliser une des deux méthodes de prélèvement sans ouverture du crâne :

- **Prélèvement par le trou occipital**

Une paille à boisson de 5 mm (11) ou une pipette à usage unique de 2 ml (16) est introduite par le trou occipital en direction d'un œil. Des échantillons sont ainsi collectés dans le bulbe rachidien, la base du cervelet, l'hippocampe et le cortex. Un diagnostic différentiel d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) doit être effectué chez la plupart des bovins « suspects de rage ». La collecte d'échantillons peut être faite

au moyen de l'outil développé pour l'ESB plutôt qu'au moyen d'une paille ou d'une pipette. Les échantillons permettent une reconnaissance assez aisée des zones collectées.

- **Prélèvement par voie rétro-orbitale**

Cette technique (26) utilise un trocard pour perforer le fond de l'orbite, une pipette plastique est alors introduite par le trou. Les parties de cerveau échantillonnées sont les mêmes que celles prélevées par la technique précédente mais en sens inverse.

c) **Épreuves de laboratoire de routine**

Le diagnostic de laboratoire peut se faire à 3 niveaux différents.

- **Identification histologique de lésions cellulaires caractéristiques**

Les corps de Negri sont des agrégats de protéines virales, mais les techniques de coloration traditionnelles ne mettent en évidence qu'une affinité de ces structures pour des colorants acidophiles. Les épreuves immunohistochimiques sont les seules épreuves histologiques spécifiques de la rage.

Un étalement de tissu non fixé peut être coloré selon la technique de Sellar. La réponse est alors obtenue en 1 h. En général, les épreuves histologiques, comme la coloration de Mann, sont effectuées sur des tissus fixés après une étape d'inclusion en paraffine, les résultats sont alors obtenus en 3 jours. Ces techniques ont l'avantage d'être bon marché et de ne pas nécessiter de froid pour la conservation du matériel fixé. Quelle que soit la technique de coloration utilisée, une lame positive montre des inclusions intracytoplasmiques acidophiles. Ces méthodes histologiques, en particulier la méthode de Sellar, ne peuvent plus être recommandées à cause de leur faible sensibilité et devraient être abandonnées.

- **Identification immuno-chimique d'antigène du virus rabique**

i) *Épreuve d'immunofluorescence*

L'épreuve la plus utilisée pour le diagnostic de rage est l'IF, elle est recommandée à la fois par l'OMS et l'OIE. Cette épreuve peut être utilisée directement sur un étalement, elle peut aussi être utilisée pour confirmer la présence de l'antigène rabique dans des cellules ou le cerveau de souris inoculées pour diagnostic. Sur des prélèvements frais, l'IF donne des résultats fiables dans plus de 95 à 99 % des cas. La sensibilité de l'IF dépend de l'échantillon (de son degré d'autolyse et de la manière dont il a été prélevé voir la section B.1.) (1, 9), du type de lyssavirus et de la compétence de l'équipe de diagnostic. Chez des animaux qui ont été vaccinés, la sensibilité de l'épreuve peut être inférieure à cause de la localisation de l'antigène, confiné au tronc cérébral. Pendant le diagnostic direct, les échantillons prélevés dans plusieurs zones du cerveau, y compris le tronc cérébral, sont fixés à froid dans le l'acétone de haute qualité puis colorés avec une goutte de conjugué spécifique. Le conjugué antirabique fluorescent peut être préparé au laboratoire. Les conjugués commerciaux sont soit des conjugués polyclonaux spécifiques du virus entier ou de sa nucléocapside, soit un mélange de différents AcMs. Dans l'épreuve d'IF, les agrégats spécifiques de nucléocapside sont identifiés par leur fluorescence. La spécificité et la sensibilité de ces conjugués antirabiques fluorescents vis-à-vis des variants locaux du virus doit être contrôlée avant leur utilisation.

L'IF peut être utilisée sur des prélèvements conservés en glycérol. Si l'échantillon a été formolé, l'IF peut être réalisée après un pré-traitement de ce dernier par des enzymes protéolytiques (6, 7, 32, 33). Cependant, l'IF réalisée sur échantillons formolés puis traités reste moins fiable et plus lourde que lorsqu'elle est réalisée sur prélèvement frais.

ii) *Épreuves immuno-chimiques*

Les anticorps peuvent être conjugués à une enzyme comme la peroxydase au lieu de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce conjugué peut être utilisé pour un diagnostic direct avec la même sensibilité que l'IF (22), mais avec un risque de résultats non spécifiques faussement positifs. Ce risque est considérablement réduit lorsque les techniciens sont soigneusement entraînés. Il faut aussi souligner que cette technique nécessite une incubation supplémentaire par rapport à l'IF.

Le conjugué peroxydase peut être utilisé dans des épreuves immunohistochimiques sur des coupes de tissus fixés au formol.

La méthode immuno-enzymatique (ELISA) qui détecte l'antigène du virus rabique est une variation des épreuves immuno-chimiques. Il est intéressant lors d'enquêtes épidémiologiques importantes.

- **Détection de la réplication du virus rabique après inoculation**

Ces épreuves détectent l'infectiosité d'une suspension tissulaire pour des cellules en culture ou des animaux de laboratoire. Ils devraient être utilisés à chaque fois que l'IF donne un résultat douteux ou lorsque l'IF est négative et qu'il y a contamination humaine.

- i) *Épreuve d'inoculation à la souris*

Cinq à dix souris de 3 à 4 semaines (soit de 12 à 14 g) ou une portée de souriceaux nouveaux-nés de 2 jours, sont inoculés par voie intracérébrale. Il est recommandé, bien que cela ne soit pas strictement essentiel, d'utiliser des souris indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (IOPS). L'inoculum est le surnageant clarifié d'un broyat à 20 % (poids/volume) de tissus nerveux (cortex, cornes d'Ammon, cervelet, bulbe rachidien) dans un tampon isotonique contenant des antibiotiques. Pour réduire la souffrance animale, les souris doivent être anesthésiées lors de l'inoculation. Les souris sont contrôlées tous les jours pendant 28 jours, toute souris qui meurt pendant la période d'observation est testée par IF. Par exemple, avec un virus de renard, les mortalités commencent 9 jours après l'inoculation. L'utilisation de souriceaux permet d'obtenir des résultats plus rapidement, il est possible de contrôler un souriceau par IF 5, 7, 9 et 11 jours après l'inoculation.

Cette épreuve *in vivo* est relativement coûteuse, en particulier lorsque des souris IOPS sont utilisées, et devrait être remplacée lorsque c'est possible. Elle ne donne pas une réponse rapide (par rapport aux épreuves d'inoculation *in vitro*), mais lorsqu'elle est positive, une grande quantité de virus est isolée d'un cerveau de souris pour le typage de la souche. Un autre avantage de cette épreuve est qu'elle peut être utilisée dans des situations où les conditions matérielles locales ne permettent pas d'utiliser d'autres épreuves (comme les cultures cellulaires).

- ii) *Épreuve sur culture cellulaire*

Des lignées cellulaires de neuroblastomes, comme la lignée CCL-131 de l'American Type Culture Collection (ATCC)¹, sont utilisées pour le diagnostic de routine de la rage. Les cellules sont cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) à 36°C avec 5 % de CO₂. La sensibilité des neuroblastomes a été comparée à celle des cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK-21) (29). Cette lignée de neuroblastomes est sensible aux isolats sauvages sans aucun temps d'adaptation, mais elle devrait être testée vis-à-vis des variants locaux du virus rabique avant d'être utilisée. La présence du virus rabique dans les cellules est mise en évidence par IF. Le résultat est obtenu après au moins 18 h d'incubation (durée d'un cycle de réplication du virus dans les cellules); en général l'incubation est de 48 h (10) et peut atteindre 4 jours.

Cette épreuve est aussi sensible que l'épreuve d'inoculation à la souris. Lorsqu'un service de culture cellulaire existe dans le laboratoire, cette épreuve devrait remplacer l'épreuve d'inoculation à la souris car elle évite l'utilisation d'animaux vivants, elle est moins coûteuse et donne des résultats plus rapidement.

Il est souvent conseillé d'utiliser plus d'une épreuve par échantillon, au moins lorsqu'il y a eu contamination humaine.

- d) Autres épreuves d'identification**

Ces épreuves peuvent être effectuées dans des laboratoires spécialisés (tels que les Laboratoires de référence de l'OIE ou de l'OMS) en utilisant des AcMs, des sondes d'acide nucléique ou la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), suivies du séquençage des produits d'amplification pour identifier le virus (16). Cela permet de différencier les souches vaccinales des souches de terrain et d'établir éventuellement l'origine géographique de la souche.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques sont rarement utilisées lors d'enquêtes épidémiologiques en raison de la séroconversion tardive et du faible pourcentage d'animaux qui survivent à la maladie et qui pourraient donc présenter des anticorps post-infection. L'immunisation orale des réservoirs du virus rabique est une méthode de choix pour le contrôle de la rage des animaux sauvages. Pour le suivi des campagnes de vaccination orale, des épreuves de séroneutralisation virale sur cultures cellulaires sont préférées. Cependant, si des sérums de faible qualité sont analysés, l'épreuve de séroneutralisation sur culture cellulaire peut conduire à des réactions

1 American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, États-Unis d'Amérique.

faussement positives du fait de la cytotoxicité des sérums. Pour de tels échantillons, un test ELISA indirect anti-glycoprotéine du virus rabique s'est montré aussi sensible et spécifique que l'épreuve de neutralisation sur cellules (19).

a) Épreuve de neutralisation virale par anticorps fluorescents : *fluorescent antibody virus neutralisation test* (FAVN) (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

Le principe du FAVN (18) est une neutralisation *in vitro* d'une quantité constante de virus rabique (souche de CVS : « challenge virus standard » adaptée à la culture cellulaire) avant d'inoculer des cellules sensibles au virus rabique : cellules BHK-21 C13.

Le titre du sérum est la dilution pour laquelle on observe 100 % de neutralisation virale dans 50 % des puits lus. Ce titre est exprimé en unité internationale par millilitre (UI/ml) en le comparant à la dilution neutralisant un étalon titré dans les mêmes conditions (sérum OIE d'origine canine ou étalon d'immunoglobulines antirabiques humaines de l'OMS n°2 ou alors les 2). Un témoin interne calibré vis-à-vis des références internationales peut être utilisé.

Cette méthode en microplaques utilise des plaques à 96 puits, et est une adaptation de la technique décrite par Smith *et al.* (30), modifiée par Zalan *et al.* (38) et par Perrin *et al.* (27). Plusieurs publications (17, 18) ont montré que les épreuves FAVN et d'inhibition rapide des foyers fluorescents, « *rapid fluorescent focus inhibition test* » (RFFIT), donnaient des résultats équivalents.

• **Équipement essentiel**

Un incubateur humide à 37°C avec 5 % de CO₂, une étuve sèche à 37°C, une hotte à flux laminaire ou PSM, un microscope permettant de faire de la fluorescence avec le FITC équipé d'un objectif de 10 et d'un oculaire de 10. Le grossissement global du système optique est compris entre 100 et 125 à cause de l'agrandissement supplémentaire dû à certains équipements intercalés dans l'épi-fluorescence.

• **Réactifs chimiques et biologiques**

Tampon PBS, pH 7.2, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺, conservé à 4°C,

Trypsine EDTA,

Acétone pour analyse (diluée à 80 % dans de l'eau désionisée), conservée à 4°C,

Du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur,

Un conjugué antirabique couplé à la fluorescéine,

Cellules : BHK-21 C13 (ATCC CCL-10),

Virus : CVS-11 (ATCC VR 959) qui peut être obtenu de l'ATCC ou du Laboratoire de référence de l'OIE pour la rage de Nancy en France (voir le tableau de la partie 3 de ce *Manuel terrestre*). Les tubes sont conservés à -80°C.

L'étalon OMS d'immunoglobulines antirabiques d'origine humaine, lot numéro 2 contenant 30 UI par ampoule² (reconstitué avec 5 ml d'eau distillée ou désionisée stérile et conservé à -20°C, une dilution amenant à 0,5 UI/ml est réalisée dans de l'eau désionisée avant utilisation), ou plutôt le sérum standard de l'OIE d'origine canine (Laboratoire de référence pour la rage de l'OIE, Nancy, France [voir la table de la partie 3 de ce manuel] conservé à -20°C et dilué pour obtenir 0,5 UI/ml dans de l'eau stérile désionisée ou distillée selon le titre du lot). Il est recommandé que pour établir un témoin interne, les laboratoires utilisent un sérum positif ou un pool de sérums d'origine canine qui ont été testés vis-à-vis de l'étalon de l'OIE.

Sérum naïf : Ce pool lyophilisé de 10 sérums négatifs de chiens est conservé à 4°C et reconstitué avec 0,5 ml d'eau désionisée stérile ou d'eau distillée.

• **Production de CVS**

i) *Pousse des cellules* : les cellules BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) qui servent à produire la souche CVS (ATCC VR 959, CVS 11), sont trypsinées durant la phase de croissance rapide, c'est-à-dire lorsque les cellules sont dans la phase exponentielle de leur courbe de croissance. Si le tapis est totalement confluent, un nouveau passage doit être effectué. Les cellules de la suspension cellulaire ne doivent pas être agglomérées; pour ensemercer un flacon de 75 cm², il faut 2x10⁷ cellules. Les cellules sont récupérées dans un volume de 20 à 30 ml de milieu pour cultures cellulaires contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté.

2 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Royaume-Uni.

- ii) *Infection des cellules* : la multiplicité d'infection (nombre de particules infectieuses par cellule) est ajustée entre 0,1 et 0,5. Le flacon qui contient la suspension cellulaire et le virus est incubé pendant 60 min entre 35,5 et 37°C. Ce flacon est délicatement agité toutes les 10 à 15 min.
 - iii) *Multiplication du virus* : la suspension de cellules infectées est ensuite centrifugée à 800 **g** pendant 15 min et le culot cellulaire est resuspendu délicatement dans un milieu de culture cellulaire contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté. Le virus est récolté 2 jours plus tard.
 - iv) *Récolte et stockage* : le surnageant est centrifugé à 800 **g** pendant 15 min à 4°C. Si plusieurs flacons ont été utilisés, les différents surnageants centrifugés sont mélangés puis aliquotés et congelés et conservés à -80°C. Le titre infectieux de la récolte est établi 3 jours plus tard.
- **Titration du virus en DICT₅₀ (Dose de virus infectant 50 % de la culture tissulaire)**

Cette méthode de titrage se fait sur microplaque avec des cellules BHK-21 C13 (ATCC CCL-10).

Différentes étapes de cette procédure peuvent être adaptées aux conditions de sécurité et aux pratiques de travail du laboratoire, mais les points suivants ne doivent pas être modifiés :

- inoculation d'un tapis cellulaire de 24 h,
 - dilutions au 1/10 en série avec 0,9 ml de diluant et 0,1 ml de suspension virale,
 - six réplicats de 50 µl par dilution,
 - incubation de 72 h,
 - lecture qualitative (c'est-à-dire, puits positif ou négatif),
 - dans tout titrage, un tube de virus témoin identique est titré et le titre de ce virus témoin est inclus dans une carte de contrôle qui permet la validation du titrage en cours,
 - le calcul se fait selon la méthode graphique des néoprobit ou la méthode de Spearman-Kärber.
- i) *Suspension cellulaire* : la veille du titrage, une suspension cellulaire contenant 10⁵ cellules par ml est préparée dans un milieu contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, et 200 µl de ce milieu sont distribués dans les puits d'une plaque à 96 trous. La plaque est ensuite incubée 20 h entre 35,5 et 37°C avec 5 % de CO₂.
 - ii) *Dilution du virus* : des dilutions en série sont effectuées dans des tubes de 5 ml en utilisant un milieu pour culture cellulaire sans sérum de veau foetal comme diluant. Des dilutions au dixième de 10⁻¹ à 10⁻¹² sont préparées (0,9 ml avec 0,1 de la dilution précédente).
 - iii) *Infection des cellules* : le milieu contenu dans les puits de la microplaque est éliminé au moyen d'un système d'aspiration. Cinquante µl de chaque dilution virale sont distribués par puits. Six réplicats sont effectués par dilution. La microplaque est ensuite incubée pendant 1 h entre 35,5 et 37°C avec 5 % de CO₂. Puis 200 µl de milieu de culture cellulaire avec 5 % de sérum de veau foetal, sont ajoutés.
 - iv) *Incubation* : incuber 3 jours entre 35,5 et 37°C avec 5 % de CO₂.
 - v) *Coloration et calcul du titre* : le tapis cellulaire est coloré par IF comme il est indiqué ci-dessous. La lecture est qualitative, chaque puits qui présente une fluorescence spécifique est considéré comme positif. Le calcul du titre se fait :
 - par la méthode graphique des néoprobit (2) ou
 - par la formule de Spearman-Kärber :

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

x_0 = - (log₁₀ de la plus faible dilution ou les puits sont positifs)

d = log₁₀ du pas de dilution, un dans le cas présent

n_i = nombre de réplicats, six dans le cas présent

r_i = nombre de puits positifs

Figure 1. Disposition des microplaques pour l'épreuve FAVN. Les puits dans lesquels le sérum à titrer non dilué est ajouté sont repérés par « 50 µl ». Les puits dans lesquels 50 µl de la dilution du virus d'épreuve sont ajoutés sont grisés. Les dilutions sont données en log₁₀.

Plaque 1 : témoin

	H	G	F	E	D	C	B	A	
Titrage du virus d'épreuve									1
									2
									3
									4
Sérum étalon OMS ou OIE 0,5 UI/ml	50 µl					50 µl			5
	50 µl					50 µl			6
	50 µl					50 µl			7
	50 µl					50 µl			8
Témoin positif interne	50 µl								9
	50 µl								10
	50 µl								11
	50 µl								12
log (dilution)	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	2.87	3.35	Cellules	

Sérum canin négatif

Plaque 2 : sérums à titrer

log dilution		0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	4.23	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	4.23
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sérum 1	A	50 µl						50 µl					
	B	50 µl						50 µl					
	C	50 µl						50 µl					
	D	50 µl						50 µl					
Sérum 2	E	50 µl						50 µl					
	F	50 µl						50 µl					
	G	50 µl						50 µl					
	H	50 µl						50 µl					

Sérum 3
Sérum 4

• **Protocole**

- i) Les microplaques sont utilisées selon le schéma de la figure 1. La première plaque est utilisée pour le titrage du CVS (lignes 1 à 4), et pour les témoins, sérum étalon et sérum négatif. La plaque n°2 et les suivantes sont utilisées pour les titrages des sérums.
- ii) Le milieu est ajouté dans les puits comme suit : dans la plaque 1, lignes 1 à 4 et puits A9 à A12 : ajouter 150 µl par puits, dans la plaque 2 et les suivantes, lignes 6 et 12 : ajouter 200 µl par puits ; pour tous les autres puits : ajouter 100 µl.
- iii) Les sérums à tester sont décomplémentés par chauffage pendant 30 min à 56°C. Comme indiqué dans la figure 1, 50 µl de chaque sérum à tester non dilué sont mis dans 4 puits adjacents.
- iv) Les dilutions des sérums sont effectuées dans les microplaques selon la procédure suivante :

Le sérum OIE, le sérum OMS, le témoin interne et le sérum négatif : avec une pipette multicanaux 50 à 200 µl, mélanger les puits de la première dilution en effectuant au moins 8 aspirations et refoulements, transférer 50 µl d'une colonne à la suivante, jusqu'à ce que la dernière soit atteinte. Eliminer 50 µl de la dernière colonne.

Les sérums à tester (dans toutes les plaques) : comme précédemment, transférer 50 µl d'une colonne à l'autre jusqu'aux colonnes 5 et 11 (soit la dilution $10^{-2,39}$). Avec une pipette multicanaux de 5 à 50 µl, transférer 10 µl de la colonne 5 et de la colonne 11 aux colonnes 6 et 12 respectivement (de la dilution $10^{-2,39}$ à la dilution $10^{-4,23}$). Avec une pipette multicanaux réglée à 100 µl, mélanger les colonnes 6 et 12 et éliminer 180 µl. Ajouter ensuite 70 µl de milieu dans ces colonnes. Cette dernière étape n'est pas toujours compatible avec un grand nombre d'analyses. Des procédures alternatives peuvent être utilisées pour atteindre ou dépasser la dilution finale recommandée, ce qui peut nécessiter un réarrangement de la plaque.

- **Ajout du virus**

- i) Le stock de CVS est conservé dans des microtubes de 1 ml à -80°C . Un tube est décongelé rapidement sous l'eau courante froide, et placé dans de la glace fondante.
- ii) Une dilution du contenu de ce tube est effectuée pour obtenir 100 DICT₅₀ dans 50 µl. Cinquante µl de cette dilution sont ajoutés à chacun des puits contenant les dilutions de sérum (voir figure 1). Pour le titrage des virus, 50 µl sont ajoutés dans les puits H1 à H4 (plaque 1). Ensuite, transférer 50 µl de colonne en colonne (plaque 1, lignes 1 à 4). Rejeter 50 µl de la dernière colonne (plaque 1, puits A1 à A4). Aucun virus n'est mis dans les puits A9 à A12 de la première plaque (témoin cellulaire).
- iii) Incuber les microplaques à 37°C dans un incubateur humide avec 5 % de CO_2 pendant 1 h.
- iv) *Ajout des cellules* : trypsiner une culture de cellules BHK-21 presque confluyente de 3 jours. Remettre en suspension les cellules pour obtenir une suspension de 4×10^5 cellule/ml dans du DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté. Ajouter 50 µl de cette suspension cellulaire par puits.
- v) Incuber les microplaques 48 h à 37°C dans un incubateur humide avec 5 % de CO_2 .

- **Fixation et coloration**

- i) Après la période d'incubation de 48 h, le milieu est rejeté et les microplaques sont rincées 1 fois en PBS, pH 7,2, et 1 fois dans de l'acétone à 80 %. Les microplaques sont ensuite fixées dans l'acétone à 80 % à température ambiante pendant 30 min (sans couvercle), puis séchées à température ambiante pendant au moins 1 h.
- ii) Ajouter 50 µl de conjugué fluorescent antirabique, à sa dilution de travail, à chacun des puits, agiter délicatement les microplaques pour répartir le conjugué et incuber à 37°C pendant 30 min. Eliminer le conjugué fluorescent et rincer les microplaques 2 fois au PBS. L'excès de PBS est rejeté en retournant rapidement les microplaques sur un papier absorbant.

- **Lecture et interprétation des résultats**

- i) La surface totale de chaque puits est observée. La méthode de lecture est qualitative (en plus ou moins) : si le puits ne contient aucune cellule fluorescente, le résultat est négatif, si une ou plusieurs cellules fluorescentes sont observées, le résultat est positif.
- ii) Les témoins sont lus en premier. D'abord le témoin cellules, puis le titre du CVS, le sérum négatif et l'étalon (étalon OMS ou sérum OIE), les titres sont calculés selon la méthode de Spearman-Kärber ou la méthode graphique des néoprobit (2).
- iii) Les résultats du titrage du CVS (DICT₅₀), du sérum négatif (D₅₀, [dose médiane]), de l'étalon positif (D₅₀) sont rapportés chacun sur leur propre carte de contrôle. Les résultats des témoins de l'épreuve en cours sont comparés aux résultats obtenus lors des épreuves précédentes utilisant le même lot témoin. L'épreuve est validée si les valeurs obtenues pour les 3 témoins de l'épreuve en cours ne sont pas statistiquement différentes de la moyenne de toutes les valeurs obtenues dans les épreuves conduites avec cette technique.
- iv) Le résultat de l'épreuve correspond au titrage du virus non neutralisé après incubation avec le sérum de référence ou les sérums à titrer. Ces titres sont calculés avec la méthode graphique des néoprobit (2) ou la formule de Spearman-Kärber (37). La comparaison des titres mesurés du sérum à tester avec celui obtenu avec l'étalon positif de titre connu permet la détermination du titre neutralisant des sérums analysés en UI/ml.

b) L'épreuve d'inhibition rapide des foyers fluorescents (*Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT*) pour la détermination des anticorps neutralisants (épreuve prescrite pour les échanges internationaux)

• **Protocole standard (La rage : techniques de laboratoire OMS, 1996 ; [37])**

• **Préparation du stock de semence de virus**

- i) Trypsiner un flacon de culture cellulaire de 150 ml de 3 jours de neuroblastomes murins (MNA)³. Ces cultures poussent mieux dans un milieu acide, complété avec des vitamines (34). Une lignée cellulaire similaire (CCL-131) peut être obtenue sur demande à l'ATCC (voir note de bas de page 1).
- ii) Resuspendre 3×10^7 cellules dans un tube de 50 ml à fond conique dans 2,7 ml de milieu essentiel minimum d'Eagle contenant 10 % de sérum de veau fœtal (EMEM-10).
- iii) En utilisant les procédures de sécurité classiques de la rage, ajouter 1×10^7 unités infectieuses de CVS-11 (ATCC, VR959) et agiter sur un vortex une fois. Incuber les cellules et le virus 15 min à 37°C, mélanger les cellules une fois pendant cette incubation.
- iv) Ajouter 10 ml de EMEM-10, mélanger, et centrifuger les cellules à 500 **g** pendant 10 min.
- v) Éliminer le surnageant. Reprendre les cellules dans 30 ml de milieu de croissance et transférer l'ensemble dans un flacon de 150 ml.
- vi) Agiter doucement le flacon pour homogénéiser la suspension cellulaire, puis préparer 3 plaques de culture cellulaire à 8 chambres en pipétant 0,2 ml de suspension cellulaire dans un puits de chacune des lames.
- vii) Incuber le flacon et les lames à 37°C dans un incubateur humide avec 0,5 % de CO₂. Le flacon doit être incubé fermé.
- viii) Vingt, 40 et 64 h après l'infection; fixer à l'acétone et colorer une lame au moyen de la technique d'immunofluorescence (23) pour suivre la multiplication du virus. Le surnageant doit être récolté 24 h après que 100 % des cellules aient été infectés (classiquement 40 h après l'infection).
- ix) Transférer le surnageant dans un tube de 50 ml et centrifuger à 4 000 **g** pendant 10 min.
- x) Distribuer le surnageant en aliquots de 0,5 ml et congeler à -70°C.

• **Titration du virus semence**

- i) Décongeler un aliquot du virus semence et préparer une série de dilutions au 1/10 (de 10⁻¹ à 10⁻⁸) dans du EMEM 10.
- ii) Distribuer 0,1 ml de chaque dilution dans un puits d'une lame de culture à 8 chambres. Ajouter 0,2 ml d'une suspension de neuroblastomes dans du EMEM-10 (5×10^4 cellules par 0,2 ml) à chaque puits.
- iii) Mélanger les cellules et le virus par agitation douce de la lame, puis incuber à 37°C dans un incubateur humide à 0,5 % de CO₂ pendant 40 h.
- iv) Fixer à l'acétone et colorer la lame par la technique d'immunofluorescence. L'infection du virus doit être observée à la dilution 10⁻⁶ du virus, ce qui signifie que le titre du virus est au moins de 10⁻⁶ unités infectieuses par 0,1 ml. Préparer suffisamment de stock de semence pour éviter des passages en série trop fréquents.

• **Préparation du stock d'utilisation**

- i) Infecter 3×10^7 cellules de neuroblastomes avec 10⁷ unités infectieuses de virus semence (voir ci-dessus).
- ii) Récolter le surnageant 24 h après que les cellules aient été totalement infectées (classiquement après 40 h).
- iii) Distribuer le surnageant en aliquots de 0,5 ml et stocker à -70°C.

3 Disponible sur demande auprès de : Rabies Laboratory, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, États-Unis d'Amérique.

- **Titration du virus d'utilisation**

- i) Décongeler un aliquot du virus d'utilisation et l'utiliser pour préparer des dilutions en série (de 10^{-1} à 10^{-6}) dans du EMEM 10.
- ii) Distribuer 0,1 ml de chaque dilution dans chaque puits d'une lame de culture cellulaire à 8 chambres. Ajouter 0,2 ml de suspension de neuroblastomes contenant 10^5 cellules par 0,2 ml dans du EMEM 10.
- iii) Mélanger cellules et virus par agitation douce de la lame puis incuber à 37°C dans une étuve humide à 0,5 % de CO_2 pendant 20 h.
- iv) Fixer à l'acétone et colorer la lame en utilisant la technique d'immunofluorescence.

La lame de culture à 8 chambres correspond à 25-50 champs microscopiques différents lorsque l'on observe le tapis à un grossissement compris entre 160 et 200. Une unité pour le RFFIT est définie comme une dilution à laquelle 50 % de champs microscopiques observés sur le tapis contiennent au moins un foyer de cellules infectées (dose formant 50 % de foyer, DFF₅₀). Le virus d'utilisation doit contenir au moins 1×10^4 FFD₅₀ par 0,1 ml (c'est-à-dire que le puits correspondant à la dilution 10^{-4} de virus doit contenir au moins un foyer de cellules infectées dans la moitié des champs microscopiques lus). Un stock de ce titre peut alors être dilué à $10^{-2,3}$ pour obtenir une dose d'épreuve de 50 FFD₅₀.

- **Sérum de référence**

Un sérum de référence national ou international dilué pour obtenir un titre de 2,0 UI/ml doit être inclus dans chaque épreuve. Le sérum de référence utilisé au Center for control disease and prevention (CDC) est la première préparation internationale d'immunoglobulines antirabiques (35), qui peut être obtenue auprès du NIBSC (voir note de bas de page 2). Le sérum de référence est conservé sous forme d'aliquots congelés correspondant chacun à une semaine d'épreuve. Chaque épreuve doit aussi inclure un sérum positif de référence de titre 0,5 UI/ml et un témoin négatif de titre inférieur à 0,1 UI/ml préparé par le laboratoire.

- **Sérums à tester**

Les échantillons de sérum sont chauffés 30 min à 56°C avant l'épreuve de façon à inactiver le complément. Si les sérums sont congelés, ils doivent être réchauffés après décongélation. Des dilutions en série des sérums à tester peuvent être préparées dans une lame à 8 chambres. Les dilutions de 1/5 et 1/50 sont suffisantes pour une évaluation en routine de l'efficacité de la vaccination et peuvent être effectuées comme suit :

- i) Préparer une dilution à 1/2,5 en ajoutant 0,1 ml de sérum inactivé à 0,15 ml de EMEM-10 dans une des lames. Mélanger par agitation douce de la lame.
- ii) Transférer 0,05 ml de la dilution 1/2,5 à un second puits contenant 0,45 ml de EMEM-10. Conserver 0,1 ml dans le puits de la dilution 1/2,5.
- iii) Mélanger le second puits et ne conserver que 0,1 ml.
- iv) Ajouter 0,1 ml du virus d'épreuve (contenant 32-100 FFD₅₀) à toutes les dilutions de sérums.
- v) Mélanger et incuber à 35°C en atmosphère humide avec 0,5 % de CO_2 pendant 90 min.

- **Ajout des cellules**

- i) Pendant la période d'incubation, trypsiner un flacon de neuroblastomes de 3 à 5 jours.
- ii) Remettre les cellules en suspension dans du EMEM-10 pour obtenir 1×10^5 cellules par 0,2 ml.
- iii) Distribuer 0,2 ml de suspension cellulaire dans chaque chambre de culture et incuber à 35°C en atmosphère humide avec 0,5 % de CO_2 pendant 20 h.

- **Fixation à l'acétone et coloration en immunofluorescence**

- i) Après 20 h, sortir les lames de l'incubateur et transférer le milieu dans une solution virucide.
- ii) Rincer les lames une fois en PBS puis fixer 10 min à température ambiante avec de l'acétone froid (-20°C).
- iii) Laisser les lames sécher 10 min avant de distribuer le conjugué fluorescent. Le conjugué peut être préparé dans du EMEM-10 ou du PBS ; il n'est pas nécessaire d'absorber le conjugué avec des tissus ou des cellules sains. La dilution de travail du conjugué doit être déterminée par titrage. Les lames sont colorées 20 à 30 min à 37°C puis rincées avec du PBS puis de l'eau distillée.
- iv) Lire en fluorescence.

- **Calcul des titres neutralisants**

Le virus résiduel est détecté par lecture en fluorescence. Le point final de neutralisation du sérum est défini comme la plus haute dilution du sérum où 50 % des champs observés contiennent une ou plusieurs cellules infectées (c'est-à-dire une réduction de 97 % de l'inoculum viral). Cette valeur peut être obtenue par interpolation mathématique. De manière alternative, un titre neutralisant à 100 % peut être déterminé en notant la plus haute dilution du sérum pour laquelle 100 % du virus d'épreuve est neutralisé et qui ne présente aucune cellule infectée dans aucun des champs microscopiques observés. Dans les 2 méthodes de titrage, le titre en anticorps du sérum testé (en UI/ml) est obtenu par comparaison avec le titre de la référence incluse dans chacune des épreuves. Il est aussi possible d'effectuer un RFFIT sur des cellules BHK-21 au lieu de neuroblastomes. Un protocole modifié a été publié (37).

c) Séroneutralisation sur souris

Le principe de cette épreuve est la neutralisation *in vitro* d'une quantité constante de virus rabique (50 DL₅₀ dans 0,03 ml de CVS) par des quantités variables du sérum à titrer pendant une incubation de 90 min à 37°C. Le mélange sérum/virus (0,03 ml) est inoculé dans le cerveau de souris de 3 semaines. Le titre du sérum est la dilution finale de sérum dans le mélange virus/sérum qui protège 50 % des souris (la mortalité est de 100 % en l'absence de neutralisation). Ce titre peut être exprimé en unités internationales par comparaison avec le titre d'un étalon inclus dans la même réaction.

Pour effectuer l'épreuve, décongeler une ampoule de CVS et préparer une suspension virale contenant 100 DL₅₀ dans 0,03 ml (en prenant en compte le fait que cette suspension sera diluée au ½ par addition du même volume de la dilution à tester). La quantité de virus utilisée réellement pendant l'épreuve (on accepte 30 à 300 DL₅₀ dans 0,03 ml) est contrôlée par le titrage sur 4 dilutions de la suspension virale, chaque dilution est inoculée à 5 souris. Le sérum à tester est chauffé à 56°C pendant 30 min pour inactiver le complément.

Un sérum étalon doit être inclus pour vérifier les conditions du titrage. La différence maximale acceptable entre le résultat attendu et le résultat mesuré pendant le titrage est de 10^{0,5}. La dilution la plus élevée ne doit pas neutraliser le virus. Le diluant est le même que celui utilisé pour la préparation virale.

On ajoute à chaque dilution de sérum un volume identique de suspension virale contenant 100 DL₅₀ dans 0,03 ml. Le mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant 90 min, puis placé dans la glace fondante pour réduire l'inactivation du virus due à la température. La réaction est arrêtée par immersion dans la glace fondante. Pendant l'inoculation, les tubes qui ne sont pas utilisés sont placés immédiatement à 4°C.

Pour chaque dilution, 5 souris sont inoculées par voie intracérébrale avec 0,03 ml du mélange sérum/virus. La mortalité est enregistrée pendant 21 jours après inoculation, et les morts qui surviennent dans les quatre premiers jours sont considérées comme non-spécifiques (due au choc, à l'infection, etc.). Le titre du sérum est exprimé en unités internationales par comparaison avec celui d'un étalon de titre connu.

d) Méthode immuno-enzymatique

Ce test ELISA indirect permet la détection qualitative des anticorps antirabiques de chiens ou de chats après vaccination. Selon les recommandations de l'OMS (36) ; 0,5 UI/ml est le titre minimum qui représente un niveau d'immunité protégeant d'une infection rabique. Bien que cet ELISA indirect soit moins sensible que le FAVN ou le RFFIT, il peut être utilisé comme une épreuve de dépistage rapide (à peu près 4 h) qui ne nécessite pas la manipulation de virus rabique vivant, et qui permet de déterminer si des chiens ou des chats possèdent des anticorps. A cause de la faible sensibilité du test, les résultats négatifs doivent être confirmés par FAVN ou RFFIT.

La réaction se déroule en 3 étapes :

1. Chaque échantillon de sérum à tester est placé dans un puits d'une microplaque sensibilisée avec des antigènes rabiques inactivés. Les anticorps présents dans l'échantillon se lient aux antigènes viraux fixés à la surface du plastique.
2. Après un temps de lavage, un conjugué protéine A/peroxydase est ajouté. Le conjugué se lie aux immunoglobulines qui ont été capturées formant un complexe (antigène rabique)-(anticorps antirabiques)-(protéine A/peroxydase).
3. L'excès de conjugué est éliminé par une étape de lavage. L'enzyme liée au complexe est révélée en ajoutant le substrat qui change de coloration. Après l'arrêt de la réaction, les densités optiques sont mesurées.

- **Préparation de l'antigène**

La souche de virus rabique G5, 52 Wistar (dérivée de Pasteur) est entretenue sur des cellules NIL2 provenant de cultures embryonnaires de hamsters de peu de passages. La récolte de virus est clarifiée pour éliminer les débris cellulaires par filtration sur gel et la suspension est inactivée à la bétapropiolactone. La sensibilisation des plaques est effectuée avec une dilution contenant 4,1 µg/ml d'antigènes.

- **Réactifs⁴**

Microplaque comprenant 6 barrettes de 16 puits sensibilisées avec l'antigène rabique. A utiliser dans les 4 semaines après ouverture du sachet, qui doit être refermé après chaque usage ;

Conjugué : Protéine A/péroxydase (10 fois concentré). Diluer au 1/10 dans le diluant conjugué et utiliser dans les 24 h suivant la dilution ;

Substrat de peroxydase tamponné ; 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine ;

Sérum témoin négatif, sérum indemne d'organisme pathogène dilué dans un stabilisant commercial produit par Surmodics (Stabilzyme MN 55344-3523 USA) ;

Un sérum témoin positif, sérum de chien vacciné hyper immun dilué dans un stabilisant commercial produit par Surmodics (Stabilzyme MN 55344-3523 USA) ;

Diluant sérum, tampon PBS, pH 7,8, avec 0,28 % (poids/volume) de caséine et 0,055 % (volume/volume) de Triton x 100 ;

0,55 % (poids/volume) PEG, 0,056 % (poids/volume) SDS, 1 % (poids/volume) PVP, 0,42 % (poids/volume) Tétronic et 1 % (volume/volume) de sérum bovin inactivé à la chaleur ;

Solution de lavage, tampon Tris/NaCl, pH 7,5, contenant 1 % de Tween 20 ;

Diluant de conjugué, tampon Tris, pH 8 ;

Solution d'arrêt, acide sulfurique à 4 N avec 0,02 % (poids/volume) de thiomersal.

Les réactifs dilués doivent être conservés à 5°C ± 3°C. Placer tous les réactifs à température du laboratoire pendant au moins 1 h avant l'utilisation.

- **Échantillons**

La réaction est effectuée sur des sérums inactivés par la chaleur (30 min à 56°C) dilués à 1/100. Un test préalable du sérum international de l'OIE titrant 6,7 UI/ml est nécessaire (disponible auprès du Laboratoire de référence de l'OIE pour la rage, Nancy, France).

Les échantillons de sérum doivent être conservés à 5°C ± 3°C. Pour un stockage prolongé, les échantillons de sérums doivent être congelés à -20°C.

- **Prédilution des sérums**

Suivre strictement la procédure indiquée ci-dessous. Utiliser des témoins négatifs et positifs en double puits lors de chaque test et/ou pour chaque plaque.

- i) Établir avec soins la distribution et l'identification des témoins et des échantillons selon le protocole suivant.
- ii) Préparer le sérum à tester. Les dilutions sont effectuées dans le diluant échantillon de la manière suivante : les échantillons sont d'abord prédilués à 1/10 dans une microplaque vierge (10 µl d'échantillon dans 90 µl de diluant échantillon).
- iii) Pour le titrage du sérum, les dilutions du sérum OIE doivent être effectuées, soit dans des tubes, soit dans une microplaque vierge, en commençant avec la dilution initiale de 1/10, les dilutions en série suivantes sont effectuées : 1/30, 1/100, 1/300, 1/1 000 et une dilution finale à 1/3 000. Cette série de dilutions du sérum OIE doit être incluse dans chaque test et/ou sur des microplaques avec les mêmes dilutions comprises entre 1/10 et 1/3 000.

Le tableau suivant est recommandé pour préparer les séries de dilution appropriée :

4 Disponible auprès de Synbiotics Europe S.A.S., 2 rue Alexander Fleming, 69367 Lyon Cedex 07, France

dilution OIE	Préparation
1/10	10 µl du sérum de référence OIE + 90 µl de diluant échantillon
1/30	10 µl du sérum de référence OIE + 290 µl de diluant échantillon
1/100	10 µl de la dilution 1/10 + 90 µl de diluant échantillon
1/300	10 µl de la dilution 1/30 + 90 µl de diluant échantillon
1/1 000	10 µl de la dilution 1/100 + 90 µl de diluant échantillon
1/3 000	10 µl de la dilution 1/300 + 90 µl de diluant échantillon

Cette gamme de dilutions du sérum OIE doit être présente sur chaque plaque.

• **Protocole**

- i) *Distribution des témoins* : distribuer 90 µl de diluant échantillon, et ajouter 10 µl des témoins négatifs dans les puits A1 et A2, et 10 µl des témoins positifs dans les puits B1 et B2.
- ii) *Distribution des échantillon et de l'étalon OIE* : distribuer 90 µl de diluant échantillon et ajouter 10 µl de chaque pré-dilution à 1/10 de sérum ou de chacune des dilutions du sérum OIE dans les puits à tester et mélanger soigneusement.

Les échantillons et le sérum OIE doivent être testés en double cupule. Les plans de distribution suivant sont recommandés :

Dosage des anticorps (dilution finale)

	1	2	3	4
A	N 1/10	N 1/10	S1 1/100	S1 1/100
B	P 1/10	P 1/10	S2 1/100	S2 1/100
C	OIE 1/100	OIE 1/100	S3 1/100	S3 1/100
D	OIE 1/300	OIE 1/300	S4 1/100	S4 1/100
E	OIE 1/1 000	OIE 1/1 000	S5 1/100	S5 1/100
F	OIE 1/3 000	OIE 1/3 000	S6 1/100	S6 1/100
G	OIE 1/10 000	OIE 1/10 000	S7 1/100	S7 1/100
H	OIE 1/30 000	OIE 1/30 000	S8 1/100	S8 1/100

Les barrettes doivent toujours être placées sur le cadre de telle façon que le laveur et le lecteur puissent être utilisés. Couvrir les puits d'un film adhésif, coupé à la longueur nécessaire par rapport au nombre de barrettes utilisées. Mélanger, manuellement ou en utilisant un agitateur, par agitation douce de la plaque.

- iii) Incuber la plaque pendant 1 h ± 5 min à 37°C ± 3°C.

- iv) Dilution des réactifs :

Tampon de lavage : diluer la solution concentrée à 1/10 en eau distillée ou déminéralisée.

Conjugué : diluer le conjugué concentré à 1/10 dans le diluant conjugué, 2 ml sont nécessaires par barrette, c'est-à-dire, 0,2 ml de conjugué concentré sont ajoutés à 1,8 ml de diluant conjugué.

- v) Retirer avec précaution le film adhésif et laver 4 fois.
- vi) Ajouter 100 µl de conjugué dilué dans tous les puits et mettre un nouveau film adhésif.
- vii) Incuber 1 h ± 5 min at 37°C ± 3°C.
- viii) Retirer délicatement le film adhésif et laver 4 fois.
- ix) Ajouter 100 µl de substrat peroxydase par puits. Ne pas couvrir à cette étape. Mélanger par agitation douce la plaque de façon manuelle ou avec un agitateur pour homogénéiser le mélange.

- x) Incuber pendant 30 ± 5 min à température du laboratoire ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), à l'abri de la lumière.
- xi) Ajouter 50 μl de la solution d'arrêt par puits. Mélanger délicatement par agitation manuelle ou sur un agitateur à microplaques. S'assurer qu'aucune bulle n'est présente dans les puits. Essuyer avec soin le fond des puits.
- xii) Mesurer la densité optique (DO) en double longueur d'ondes à 450 et 630 nanomètres ou en simple longueur d'ondes à 450 nanomètres (dans la bande jaune).

- **Quantification des anticorps : expression et interprétation des résultats**

Calcul du titre au moyen d'une courbe de régression

- i) Calculer la valeur de la DO moyenne de chaque dilution du sérum OIE.
- ii) Calculer le logarithme naturel (\ln) de chaque densité optique moyenne et le logarithme naturel du titre de chacune des dilutions du sérum OIE (de 6,7 à 0,0223 UI/ml), sans prendre en compte le facteur initial de dilution 1/100.
- iii) Mettre en correspondance la densité optique sur l'axe des ordonnées en fonction du logarithme naturel du titre en anticorps sur l'axe des abscisses pour tracer la courbe de référence du sérum OIE.
- iv) A partir des données obtenues pour le sérum OIE, faire une régression linéaire entre le logarithme naturel des concentrations en anticorps (exprimée en unités ELISA par ml) et le logarithme naturel des densités optiques pour établir le modèle mathématique correspondant.

Le logarithme naturel du titre en anticorps en unités ELISA par ml = $a + b \times \ln \text{DO}$

- v) Pour chaque sérum testé, calculer la valeur de la DO moyenne puis le titre en anticorps en unités équivalentes par millilitre (UE/ml) à partir de l'équation suivante :

$$\text{Titre du sérum testé (UE/ml)} = e^{(a + b \times \ln \text{DO})}$$

- **Validation du test**

Les résultats de chaque test ou de chaque plaque sont validés :

- si la densité optique obtenue pour le témoin positif (DO P) est supérieure ou égale à 0,3, et
- si la densité optique obtenue avec le témoin négatif (DO N) est inférieure à $0,50 \times \text{DO P}$.
- le coefficient de corrélation entre le logarithme naturel des DO et le logarithme naturel des titres en anticorps du sérum OIE est supérieur à 0,95.

- **Exemples**

$$\begin{array}{l} \text{Témoin positif :} \\ \text{DO puits } B_1 = 0,610 \quad \text{DO puits } B_2 = 0,690 \quad \Rightarrow \quad \overline{\text{DO P}} = 0,650 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Témoin négatif :} \\ \text{DO puits } A_1 = 0,190 \quad \text{DO puits } A_2 = 0,210 \quad \Rightarrow \quad \overline{\text{DO N}} = 0,200 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{Échantillon 1: DO puits 1} = 1,790 \quad \text{DO puits 2} = 1,750 \quad \Rightarrow \quad \overline{\text{DO}} = 1,770 \\ \text{Échantillon 2: DO puits 1} = 0,350 \quad \text{DO puits 2} = 0,390 \quad \Rightarrow \quad \overline{\text{DO}} = 0,370 \end{array}$$

Validation du test

$\text{DO P} = 0,650 > 0,300$ and $\text{DO N} = 0,200 < 0,50 \times 0,650 = 0,325$, le test est alors validé.

- **Résultats et interprétation (titrage quantitatif des anticorps)**

Si le titre calculé est $\geq 0,6$, l'animal est considéré comme ayant séroconverti après vaccination.

Si le titre calculé est $< 0,6$, l'animal est considéré comme n'ayant pas suffisamment d'anticorps. Comme l'ELISA est une épreuve de dépistage, une épreuve FAVN ou RFFIT de confirmation doit être effectuée sur de tels sérums au titre inférieur à 0,6.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Les vaccins antirabiques préparés à partir de la souche originale de Pasteur en 1985 et des souches dérivés (Pasteur Virus, Challenge Virus Standard, Pitman-Moore, etc.), et les souches isolées plus récemment (Flury, Street-Alabama-Dufferin [SAD], Vnukovo and Kelev) protègent contre toutes les souches de génotypes 1 isolées jusqu'ici. Les vaccins antirabiques conventionnels peuvent ne pas induire de protection croisée suffisante contre les autres lyssavirus ; aucune protection n'est fournie contre le virus Mokola (31). Les principes qui gouvernent la préparation des vaccins antirabiques inactivés sont identiques que ces vaccins soient utilisés chez l'homme ou chez l'animal, bien que des adjuvants puissent être ajoutés aux vaccins vétérinaires.

Chez l'animal, les vaccins vivants sont aussi efficaces par voie orale et peuvent être distribués sous forme d'appâts pour immuniser des animaux sauvages (ou domestiques). Un vaccin vivant recombinant (par exemple un recombinant vaccine-glycoprotéine rabique) a aussi montré son efficacité (25).

Les lignes directrices pour la fabrication des vaccins vétérinaires sont données au Chapitre I.1.7., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices qui sont données ici et dans le Chapitre I.1.7. sont générales par essence et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

Les standards qui s'appliquent aux vaccins à virus vivant modifié par passage sur animal, oeuf ou culture cellulaire pour réduire la virulence sur espèces cibles sont différents de ceux qui s'appliquent aux vaccins à virus inactivés. Les 2 types de vaccins ont leurs avantages et leurs inconvénients (5), mais ils peuvent tous deux être utilisés pour immuniser l'animal pour une période de 1 à 3 ans. Les vaccins à virus vivant atténué ne sont pas acceptés dans certains pays. On ne peut pas les utiliser pour protéger des animaux non vaccinés qui ont été exposés à l'infection (13). L'efficacité du traitement post-exposition par vaccination n'a été montrée que chez l'homme et dans certains cas, il est même fortement recommandé d'administrer des immunoglobulines antirabiques.

Toute manipulation du virus pendant la préparation et le test des vaccins doit se faire en stricte conformité avec les précautions de sécurité recommandées par l'OMS (36, 37), l'OIE (Chapitre I.1.6.) et les réglementations et les recommandations nationales.

1. Gestion des semences virales

a) Caractéristiques de la semence virale

Toute souche faisant partie du sérotype 1 et qui a montré qu'elle protégeait contre des souches sauvages de virus rabique (trouvées actuellement dans le pays où le vaccin va être utilisé) est utilisable. La souche de virus utilisée doit avoir les caractéristiques biologiques bien connues (par exemple sa pathogénicité) ainsi que des propriétés antigéniques connues (typage par des anticorps monoclonaux). Si la souche doit être utilisée comme vaccin vivant, le stock de semence doit démontrer qu'il n'entraîne aucune rage clinique. Au moins 2 animaux (de préférence 5 à 6 par groupe) de chaque espèce susceptible de recevoir ce vaccin et, autant que possible, toute espèce qui pourrait être en contact avec le vaccin ou un animal vacciné doit être testé. Ceci peut être fait par inoculation dans un nerf ou en zone péri-nerveuse une dose équivalente à 10 fois la dose qui sera utilisée dans le produit final. Les animaux sont observés pendant au moins 90 jours à la recherche de toute réaction anormale due à ce stock semence.

b) Méthode de culture

Le stock principal de semence doit être préparé et conservé à une température inférieure ou égale à -70°C. Des sous-cultures de ce stock sont utilisées pour la fabrication. La réplication virale est contrôlée par titrage pendant la croissance du virus.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Avant qu'un vaccin soit agréé, la preuve de l'efficacité du produit doit être établie par épreuve sur animaux vaccinés et pour chaque espèce cible. L'épreuve doit être effectuée à la fin de la période pour laquelle le producteur veut obtenir la licence du vaccin. La cinétique des anticorps est aussi suivie de façon à établir une corrélation entre le titre sérique et la résistance à l'épreuve.

L'efficacité des vaccins produits est établie par des études sur chaque espèce cible vaccinée comme il est recommandé. Le niveau de protection à la fin de la période d'immunité est testé par mesure des anticorps neutralisants spécifiques et par épreuve avec un virus rabique. Les conditions expérimentales de cette épreuve doivent mimer les conditions naturelles de l'infection mais, d'un point de vue pratique, il est plus facile d'obtenir 100 % de mortalité des témoins avec une souche de virus rabique connue plutôt qu'avec une

souche isolée localement. Chez des animaux vaccinés avec un virus inactivé, le pourcentage de séroconversion et le niveau moyen des anticorps permettent une bonne estimation de la survie à l'épreuve (3).

La corrélation entre l'efficacité sur l'espèce cible et la valeur antigénique telle qu'elle est estimée sur souris doit être établie (voir section C.4.c. plus bas).

Pour les besoins d'agrément de vaccin, des tests de sécurité doivent être faits sur espèces cibles. Dans le cas de vaccins vivants (y compris les recombinants) utilisés pour les campagnes de vaccination orale, les tests d'innocuité doivent aussi être effectués sur les espèces vivant dans la zone de vaccination et qui peuvent se trouver exposées au vaccin (5).

La stabilité du vaccin est établie en testant des lots après stockage prolongé, en général 1 à 2 ans. Un processus de vieillissement accéléré par stockage une semaine à 37°C est parfois utilisé. La durée de conservation du vaccin annoncée par le producteur est contrôlée par les autorités d'agrément nationales. En général, elle est de 12 à 18 mois pour les vaccins liquides et peut éventuellement atteindre 24 mois pour les vaccins lyophilisés.

2. Méthode de fabrication

Quelle que soit la méthode adoptée, une attention particulière doit être portée à la qualité du substrat. Les oeufs tout comme les animaux doivent être indemnes d'organismes pathogènes spécifiques, les cultures cellulaires telles que des lignées de BHK, doivent être conformes aux exigences internationales de stérilité et d'innocuité.

a) Chez l'animal

Le virus est inoculé par voie intracérébrale et le tissu nerveux est conservé lorsque l'animal a été euthanasié en phase terminale de la rage. Le virus est inactivé par des moyens physiques, telle que l'irradiation aux ultra-violets, ou par des méthodes chimiques, telle que l'addition de phénol ou de bêta-propiolactone. Les vaccins doivent être préparés sur de jeunes animaux (souris, agneaux, etc.) pour obtenir de grosses quantités de virus et pour diminuer le contenu du vaccin en myéline et réduire ainsi les possibles réactions secondaires. Dans certains cas, le virus n'est pas totalement inactivé, comme par exemple dans les vaccins phénolés de type Fermi, mais de tels vaccins ne sont plus recommandés actuellement.

b) Sur œufs

Une souche adaptée par passage sur oeufs est inoculée sur des oeufs embryonnés qui sont ensuite incubés 5 à 6 jours à 38°C. Le virus est le plus souvent récolté sous forme de tissus embryonnaires infectés, et est généralement lyophilisé et utilisé comme un vaccin vivant. De tels exemples de vaccins comprennent la souche Flury à faibles passages et la souche bien préférable Flury à passages élevés sur oeufs qui est beaucoup plus sûre chez les espèces animales telles que le chat.

c) Sur cultures cellulaires

Les cellules sont infectées avec des souches de virus rabique adaptées à la culture cellulaire et incubées entre 35 et 36°C. La récolte peut ensuite être utilisée dans des vaccins vivants (vaccins Flury et SAD) ou pour produire des vaccins inactivés après ajout de phénol (vaccin Semple) ou d'autres produits chimiques telles que la bêta-propiolactone.

La culture cellulaire peut aussi être utilisée pour cultiver des virus porteurs (comme le virus de la vaccine) qui expriment le gène codant la glycoprotéine du virus rabique (25).

Pendant la fabrication, la réplication du virus sur un des substrats mentionné plus haut est contrôlée pour effectuer la récolte au moment le plus approprié, d'habitude 4 à 6 jours après inoculation des animaux, des oeufs ou des cultures cellulaires. La récolte virale est mise en suspension dans une solution tampon à la dilution qui va donner un pouvoir antigénique optimal au produit final. Si nécessaire, la suspension est inactivée ou lyophilisée. Un adjuvant est recommandé pour les vaccins préparés à partir de virus inactivé, comme pour les vaccins polyvalents.

3. Contrôle en cours de fabrication

Cela consiste à suivre la pousse du virus pour obtenir un titre optimal et à s'assurer de l'absence de contamination microbienne indésirable.

Pour les vaccins à virus vivants, la cinétique de multiplication du virus doit être établie de façon à obtenir un titre viral terminal qui corresponde à la protection désirée chez l'espèce cible.

Pour les vaccins à virus inactivés, les propriétés immunogènes du produit final peuvent être évaluées par des épreuves *in vitro* (ELISA, immunodiffusion en gel, épreuve de liaison des anticorps ou coloration des cellules infectées). Ces évaluations indiquent le meilleur moment de récolte du virus sur les cultures cellulaires.

4. Contrôle des lots

a) Stérilité

Les tests de contrôle de stérilité et d'absence de contamination des matériels biologiques peuvent être trouvés au Chapitre 1.1.5., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

Les tests d'innocuité des lots de vaccin à virus inactivé sont effectués par inoculation de culture cellulaire ou de souris par voie intracérébrale pour mettre en évidence des virus viables. Pour les vaccins à virus vivant, un test d'innocuité doit être effectué sur chaque lot de vaccin sur espèce cible. Au moins 3, et de préférence 5 à 6 animaux de l'espèce cible reçoivent une dose équivalente à 10 fois la dose recommandée pour l'utilisation du produit par la voie d'administration classique du produit. Les animaux sont observés 90 jours pour mettre en évidence toute réaction secondaire.

c) Activité

La quantité de virus présente dans les vaccins vivants atténués et les vaccins recombinants est déterminée par titrage. Une fois que la corrélation a été établie entre l'activité du vaccin sur l'espèce cible et le titre viral, le titrage de virus devient un indicateur fiable d'efficacité du vaccin. Cela est effectué sur cultures cellulaires ou par inoculation intracérébrale à des animaux nouveaux-nés (chez la souris, cela n'est possible que pour quelques virus atténués). Les vaccins recombinants devraient être testés pour l'expression de la protéine rabique jusqu'à ce que la stabilité de cette expression soit assurée au long du processus de fabrication. Le titre du vecteur peut alors être utilisé comme reflet fiable de l'efficacité du vaccin.

Pour des vaccins à virus inactivés, la corrélation entre l'activité pour l'espèce cible et la valeur antigénique déterminée sur la souris est un indicateur fiable de l'activité du vaccin. L'efficacité du vaccin est établie aux USA par le test des NIH (National Institutes of Health). Ailleurs, le test de la Pharmacopée Européenne est largement adopté.

Des groupes d'au moins 10 souris, âgées de 3 à 4 semaines, sont vaccinés une fois avec des doses décroissantes du vaccin selon la Pharmacopée Européenne (20), ou avec 2 doses à une semaine d'intervalle, selon le test des NIH (37). Un nombre suffisant de dilutions de vaccins est comparé pour estimer la dilution à laquelle 50 % des souris sont protégées contre une épreuve intracérébrale 14 jours plus tard (20, 37).

Un vaccin de référence internationale de l'OMS est disponible (voir note de bas de page 2) pour calibration des standards nationaux, de telle façon que les résultats des tests de pouvoir antigène puissent être exprimés en unités internationales. Le test n'est pas valide sauf si :

- i) Pour le vaccin à tester et la préparation de référence, la dilution protégeant 50 % des souris est située entre la plus faible et la plus forte dilution du vaccin.
- ii) Le titrage du virus d'épreuve montre que dans 0,03 ml de suspension on a au moins 25 DL₅₀ pour la souris. La dose d'épreuve doit se situer entre 12 et 50 DL₅₀ pour que le test soit validé.
- iii) L'intervalle de confiance ($p = 0,95$) pour le test ne doit pas être inférieur à 25 et supérieur à 400 % de l'efficacité estimée : les analyses statistiques doivent montrer une courbe et une pente significative et aucune déviation significative en linéarité ou en parallélisme dans les corrélations dose-réponses.

Le vaccin passe le test si son activité mesurée n'est pas inférieure à 1 UI par dose, ou si son activité est démontrée à la fin de la période d'immunité pour laquelle l'agrément est demandé, avec la plus faible dose prescrite.

Un test simplifié peut aussi être utilisé pour trier quels vaccins sont susceptibles d'avoir une valeur antigénique ≥ 1 UI par dose (4). Ce test utilisé comme épreuve de dépistage est un bon moyen de réduire le nombre de souris utilisées dans les tests de contrôle de l'activité des vaccins.

d) Durée de l'immunité

La durée de l'immunité doit être établie pour l'agrément du vaccin sur les espèces cibles avec un protocole de vaccination défini. Après quoi, le test n'est plus réalisé pour chaque lot (voir la section C.4.c. plus haut).

e) Stabilité

La durée de conservation proposée doit être vérifiée par des tests appropriés. Ces expérimentations comprennent des tests de stabilité biologique et physico-chimiques et doivent être effectués sur un nombre suffisant de lots de vaccins conservés dans les conditions recommandées.

La thermostabilité des vaccins à virus vivants présentés sous forme liquide est en général faible. Les vaccins à virus inactivés lyophilisés, ont une stabilité en général de 2 ans à 4°C.

f) Agents de conservation

Les vaccins à virus inactivés contiennent des agents de conservation (formol, merthiolate). La nature et la quantité de ces agents de conservation doivent répondre aux exigences des réglementations nationales.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AUBERT M.F.A. (1982). Sensibilité et fidélité du diagnostic de rage au laboratoire. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **5**, 369–376.
2. AUBERT M.F.A. (1982). Une méthode simple de calcul des titres des suspensions virales, vaccinales ou séroneutralisantes: la méthode graphique. (A simple method for calculating titres of virus, vaccine or serum-neutralising suspensions: the graphic method.) *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **1**, 828–833.
3. AUBERT M.F.A. (1992). Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **11**, 735–760.
4. AUBERT M.F.A. & BLANCOU J. (1982). Test simplifié de contrôle d'activité des vaccins antirabiques à virus inactivés. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **1**, 811–822.
5. BAER G.M. (1991). *The Natural History of Rabies*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 620 pp.
6. BARNARD B.J.H. & VOGES S.F. (1982). A simple technique for the diagnosis of rabies in formalin-preserved brain. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 193–194.
7. BARRAT J. (1992). Experimental diagnosis of rabies. Adaptations to field and tropical conditions. Proceedings of the International Conference on Epidemiology, Control and Prevention of Rabies in Eastern and Southern Africa. Lusaka, Zambia, 2–5 June 1992, 72–83.
8. BARRAT J. (1993). ELISA systems for rabies antigen detection. Proceedings of the Southern and Eastern African Rabies Group International Symposium. Pietermaritzburg, South Africa, 29–30 April 1993, 152–155.
9. BARRAT J. & AUBERT M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Revue Méd. Vét.*, **146**, 561–566.

10. BARRAT J., BARRAT M.J., PICARD M. & AUBERT M.F.A. (1986). Diagnostic de la rage sur culture cellulaire, comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation à la souris. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **11**, 207–214.
11. BARRAT J. & BLANCOU J. (1988). Technique simplifiée de prélèvement, de conditionnement et d'expédition de matière cérébrale pour le diagnostic de rage. *Doc. WHO/Rab. Res./88.27*.
12. BINGHAM J. & VAN DER MERWE M. (2002). Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods*, **101**, 85–94.
13. BLANCOU J., SORIA BALTAZAR R., MOLLI I. & STOLTZ J.F. (1991). Effective postexposure treatment of rabies-infected sheep with rabies immune globulin and vaccine. *Vaccine*, **9**, 432–437.
14. BOURHY H., KISSI B. & TORDO N. (1993). Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, **194**, 70–81.
15. BOURHY H., ROLLIN P.E., VINCENT J. & SUREAU P. (1989). Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzymes immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 519–523.
16. BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage; Metodos de laboratorio para el diagnostics de la rabia; Laboratory methods for rabies diagnosis. Commission des Laboratoires de référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur, Paris, France, 197 pp.
17. BRIGGS D.J., SMITH J.S., MUELLER F.L., SCHWENKE J., DAVIS R.D., GORDON C.R., SCHWEITZER K., ORCIARI L.A., YAGER P.A. & RUPPRECHT C.E. (1998). A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals*, **26**, 347–355.
18. CLIQUET F., AUBERT M. & SAGNE L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, **212**, 79–87.
19. CLIQUET F., SAGNE L., SCHEREFFER J.L. & AUBERT M.F.A. (2000). ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*, **18**, 3272–3279.
20. COUNCIL OF EUROPE (1997). Vaccinum rabiei inactivatum ad usum veterinarium. Inactivated Rabies Vaccine for Veterinary Use. European Pharmacopoeia, Third Edition. Monograph 0451. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France, 1776–1777.
21. FEKADU M., SHADDOCK J.H., SANDERLIN D.W. & SMITH J.S. (1988). Efficacy of rabies vaccines against Duvenhage virus isolated from European house bats (*Eptesicus serotinus*), classic rabies virus and rabies-related viruses. *Vaccine*, **6**, 533–539.
22. GENOVESE M.A. & ANDRAL L. (1978). Comparaison de deux techniques utilisées pour le diagnostic de la rage: l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase. *Rec. Med. Vet.*, **154** (7–8), 667–671.
23. GOLDWASSER R.A. & KISLING R.E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, 219–223.
24. HOOPER P.T., LUNT R.A., GOULD A.R., SAMARATUNGA H., HYATT A.D., GLEESON L.J., RODWELL B.J., RUPPRECHT C.E., SMITH J.S. & MURRAY P.K. (1997). A new lyssavirus – the first endemic rabies-related virus recognised in Australia. *Bull. Inst. Pasteur*, **95**, 209–218.
25. KIENY M.P., LATHE R., DRILLIEN R., SPEHNER D., SKORY S., SCHMITT D., WIKTOR T., KOPROWSKI H. & LECOQ J.P. (1984). Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, **312**, 163–166.
26. MONTANO HIROSE J.A., BOURHY H. & SUREAU P. (1991). Retro-orbital route for brain specimen collection for rabies diagnosis. *Vet. Rec.*, **129**, 291–292.
27. PERRIN P., LAFON M., VERSMISSE P. & SUREAU P. (1985). Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps antirabiques neutralisants en cultures cellulaires. *J. Biol. Stand.*, **13**, 35–42.

28. PERRIN P., ROLLIN P.E. & SUREAU P. (1986). A rapid rabies enzyme immuno-diagnosis (RREID) useful and simple technique for the routine diagnosis of rabies. *J. Biol. Stand.*, **14**, 217–222.
29. RUDD R.J. & TRIMACHI C.V. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 145–168.
30. SMITH J.S., YAGER P.A. & BAER G.C. (1973). A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO*, **48**, 535–541.
31. VON TEICHMAN B.F., DE KOKER W.C., BOSCH S.J., BISHOP G.C., MERIDITH C.D. & BINGHAM J. (1998). Mokola virus infection: description of recent south African cases and a review of the virus epidemiology. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **69**, 169–171.
32. UMOH J.U. & BLENDEN D.C. (1981). Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin fixed tissue after treatment with trypsin. *Bull. WHO*, **59**, 737–744.
33. WARNER C.K., WHITFIELD S.G., FEKADU M. & HO H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome *in situ* in formalin-fixed tissues. *J. Virol. Methods*, **67**, 5–12.
34. WIKTOR T.J., DOHERTY P.C. & KOPROWSKI H. (1977). In vitro evidence of cell-mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 334–338.
35. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDS. THIRTY-FIFTH REPORT (1985). World Health Organisation Technical Report Series No. 725. WHO, Geneva, Switzerland.
36. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON RABIES. EIGHTH REPORT (1992). World Health Organisation Technical Report Series No. 824, 84 pp.
37. WORLD HEALTH ORGANISATION (1996). Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. WHO, Geneva, Switzerland.
38. ZALAN E., WILSON C. & PUKITIS (1979). A microtest for quantitation of rabies virus. *J. Biol. Stand.*, **7**, 213–220.

*
* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour la rage (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : www.oie.int).