

SUR LA PREPARATION ET LA CONCENTRATION DU SERUM ANTIRABIQUE EN IRAN

par

H. MIRCHAMSY (1)

Au printemps de 1957, l'Institut Razi était chargé par les autorités sanitaires du pays de prendre les mesures nécessaires pour mettre au point la préparation du sérum antirabique concentré sur une échelle assez large afin de répondre aux besoins de l'Institut Pasteur de l'Iran, responsable depuis sa fondation du traitement des personnes mordues par des animaux suspects de rage dans tout le pays.

Il faut se rappeler que le sérum antirabique, accusé d'être sans valeur et tombé dans l'oubli, est considéré maintenant comme un agent prophylactique très précieux grâce aux recherches des expérimentateurs tels que Covell, Habel, Koprowski et Hoyt et surtout à la suite de l'expérience unique dans son genre de l'Institut Pasteur d'Iran (6) effectuée sous les auspices de l'O.M.S. Cette expérience a montré d'une manière sûre la valeur de ce sérum dans le traitement prophylactique de la rage chez l'homme. Il était donc nécessaire de préparer ce sérum pour traiter un nombre considérable de gens blessés chaque année par des animaux enragés dans les différentes régions du pays.

Le présent travail résume les travaux concernant la préparation de ce sérum et les résultats obtenus.

Avant d'exposer les méthodes de préparation du sérum antirabique concentré que nous avons utilisées, nous donnerons un bref aperçu des travaux

(1) *Extrait de la Revue Immuno.* t. 26, n° 1-2, P: 59, 1962.

les plus importants publiés sur le mode de préparation et l'efficacité de ce sérum.

I. — TRAVAUX ANCIENS

A notre connaissance, il n'existe pas de produit biologique dont l'effet thérapeutique ait, depuis plus d'un-demi siècle, fait l'objet de tant de controverses.

En 1889 et 1891, Babès, Lepp et Cerchez (4,5) ont montré l'effet virulicide du sérum antirabique *in vitro*. Ces mêmes auteurs ont constaté que le sang des chiens immunisés protège les animaux infectés. Tizzoni, Schwarz (68) et Semple (66), confirment les constatations de Babès. Mais Marie, en 1907, prépare un sérum de pouvoir neutralisant assez fort qui n'a qu'une influence retardatrice sur l'évolution de la rage chez les petits animaux d'expérience. Il finit dans d'autres publications par conclure que le sérum antirabique est sans valeur thérapeutique (48, 49). Reinlinger en 1907 (63), de son côté, attribue un certain effet favorable au sérum antirabique de mouton. Par contre, Kraus et Holobut (44) en 1909, insistent sur l'inefficacité de ce sérum, quel que soit son mode d'administration. Parmi les auteurs anciens, Fermi (19, 20) est le premier qui a préparé un sérum antirabique sur le cheval dans les meilleures conditions; d'après lui, un bon sérum antirabique a un pouvoir rabicide net. L'effet virulicide et neutralisant du sérum antirabique a été ensuite démontré par plusieurs autres chercheurs. Citons en particulier les travaux de Kondo (37) en 1922, de Loeffler et ses collaborateurs (46) en 1932, de Proca et ses collaborateurs (57, 58, 59, 60) en 1934-1937, de Cruveilhier et Viala (II) en 1937 et de Jonnesco en 1939 (35), qui démontrent la survie d'un nombre important d'animaux d'expérience injectés, avant ou après la contamination, avec du sérum antirabique d'ovins. Ces auteurs injectent des quantités importantes de sérum à l'homme pour obtenir un résultat favorable.

Le motif de l'insuccès dans le traitement de la rage expérimentale par le sérum a été étudié par plusieurs chercheurs. D'une manière générale, on attribue cet insuccès au manque de pénétration du sérum à travers la barrière hémato-encéphalique dans le tissu cérébral. Ponomareff et Tchechkoff (54) ont évacué une partie du liquide cérébrospinal remplacé immédiatement par du sérum et ont réussi ainsi à traiter des animaux infectés avec des doses léthales de virus.

D'après Loeffler et Schweinburg (47), le sérum antirabique peut traverser la barrière hémato-encéphalique, si l'on fait précéder l'injection de sérum par une injection de Theocin (Theophyllin sodium acetate, sol. 3 p.

100, 4 ml par kg). Ces auteurs ont pu traiter un grand nombre de lapins infectés avec des doses mortelles de virus de la rage.

TRAVAUX RECENTS

Les travaux récents dans le domaine du traitement prophylactique de la rage avec le sérum commencent avec les recherches de Covell et ses collaborateurs (9, 10), qui utilisent en Inde le sérum antirabique de mouton, concentré partiellement avec le sulfate d'ammonium et constatent que la vaccination pasteurienne précédée par deux doses de ce sérum (20 ml par dose) injectées dans les deux jours qui suivent la contamination, protègent beaucoup mieux le singe et l'homme que la vaccination seule. Au cours des années 1935-1936, ces auteurs ont traité plusieurs milliers de personnes mordues et ont constaté que la mortalité dans le cas de l'association du sérum au traitement pasteurien est de l'ordre de 1,75 p. 100 tandis que chez les sujets traités avec le vaccin seul, la mortalité s'élève à 2,35 p. 100. Parallèlement, Hoyt et ses collaborateurs (30, 31) et Yen (74) aux Etats-Unis, ont obtenu les mêmes résultats chez les petits animaux d'expérience.

Habel (25), dans son mémoire remarquable de 1945, constate que le sérum antirabique concentré de lapin, employé seul, protège mieux les petits animaux de laboratoire que le vaccin seul. Le traitement au sérum d'après Habel donne de bons résultats quand on l'injecte au même lieu que le virus au cours des 72 heures qui suivent l'injection. De même, Koprowski et ses collaborateurs (39, 40, 41) estiment qu'une dose de sérum antirabique (lapin, concentré) injectée 24 heures après la contamination du hamster ou du cobaye avec le virus des rues protège ces animaux contre l'infection, tandis que 14 injections de vaccin phéniqué commençant 24 heures après la contamination ne peuvent guère sauver ces animaux de l'infection. De même, le sérum administré 96 heures après l'infection est sans effet chez ces animaux.

La durée d'observation des petits animaux de laboratoire, soumis au traitement sérum-vaccin, doit être assez longue, surtout quand on infecte ces animaux avec le virus des rues. D'après les auteurs indiens (I) cette durée doit être fixée à 30 jours.

Le délai entre la contamination et l'administration de sérum est le point le plus délicat dans la réussite de cette thérapeutique. Des chiens ou des cobayes infectés avec le virus des rues par Koprowski et ses collaborateurs (42), puis traités 24 heures plus tard avec le sérum homologue sont sauvés de l'infection; cette durée dans le cas des souris blanches est fixée à 6 heures.

D'après Veeraraghaven et ses collaborateurs (62) le sérum homologue protège le cobaye contre l'infection avec le virus des rues, tandis que le sérum

concentré de cheval prolonge seulement l'incubation sans empêcher l'évolution fatale de la maladie.

L'utilisation de sérum chez les personnes mordues a été couronnée de succès au cours de ces dernières années. Sellers (65) a traité 68 personnes sévèrement blessées par des animaux enragés avec le sérum et le vaccin, il n'a observé aucun cas de rage, seulement des cas légers de réaction au sérum.

En Iran, Ghodsi (22) décrit la haute mortalité des gens gravement blessés par des loups enragés et traités par la vaccination pasteurienne et attire l'attention sur la nécessité d'améliorer le traitement prophylactique de la rage, dans le cas des morsures sévères causées par des loups ou d'autres bêtes féroces ou quand les blessures sont près des centres nerveux.

L'insuccès du traitement dans ces cas est, d'après Remlinger (64), le point faible de la méthode de Pasteur. Heureusement, peu de temps après, Baltazard et ses collaborateurs (6) en Iran emploient le sérum antirabique (lapin, concentré) chez un groupe de 29 personnes mordues par un loup enragé. D'après Baltazard, la mortalité dans les cas de blessures graves traitées avec le vaccin seul dépasse 40 p. 100. Elle est irrégulière quand on effectue une dose de sérum avant la vaccination et finalement la mortalité est nulle si l'on injecte deux doses de sérum avant la vaccination. Ils ont même observé qu'un garçon fortement blessé sur le crâne par un loup enragé, le virus étant probablement inoculé par voie intracrânienne, a été sauvé de l'infection à la suite de 6 injections de sérum, suivies de la vaccination classique. Habel et Koprowski (27), qui ont collaboré avec les auteurs iraniens pour étudier, au cours du traitement, les variations en anticorps spécifiques chez les groupes de sujets mordus par des loups, constatent que dans le sérum de 5 personnes traitées par le vaccin seul, il n'y a pas trace d'anticorps avant le 19^e jour. Trois sujets sur 5 moururent de rage. Douze sujets exposés de la même manière et traités par le sérum et le vaccin présentent dans leur sérum, dès les premiers jours du traitement, des quantités notables d'anticorps. Un seul ayant reçu une dose de sérum et ensuite la série de vaccin phéniqué est mort de rage.

En Turquie, Tuncman (70, 71) utilisant le sérum antirabique brut de mouton semble avoir obtenu des résultats satisfaisants. En effet, d'après cet auteur, au cours des années 1953-1956, l'association du vaccin tissulaire phéniqué et du sérum a réduit la mortalité à 0,67 p. 100 chez les sujets mordus.

Le sérum antirabique ayant un effet remarquable, un groupe d'experts de l'O.M.S. pour la rage a étudié, chez des séries de personnes non mordues, les variations sérologiques dues à l'emploi du sérum et du vaccin. D'après les recherches de ces experts (2), des gens non exposés à la morsure et ayant reçu une dose de sérum riche en anticorps (sérum de cheval, purifié de Lederlee, titre égal au sérum de référence international), puis 12 injections

quotidiennes de vaccin phéniqué ont présenté des anticorps dès le début jusqu'à la fin de l'expérience qui dura 28 jours. Ces auteurs ont également montré (3) qu'une injection de sérum supprime la réponse sérologique à 3 injections de vaccin Flury par voie intradermique à 5 jours d'intervalle.

Par contre, une dose de sérum n'a nullement affecté le résultat d'une série complète de vaccination quotidienne par le vaccin phéniqué; mais deux doses de sérum ont une action inhibitrice indiscutable sur la production d'anticorps. Ces études ont un grand intérêt pratique; en effet, elles montrent qu'il faut recommander une injection de sérum, plus 14 doses de vaccin phéniqué dans les cas de morsures graves (28). L'administration du nombre des doses de vaccin dans le cas de l'emploi du sérum, proposé par Habel (26) dans le but de diminuer l'effet paralytique du vaccin, ne peut donc être envisagée que dans des cas très limités.

Hosty et ses collaborateurs (29) injectent la gamma-globuline de sujets vaccinés à plusieurs reprises avec le vaccin antirabique, au lieu du sérum concentré de cheval, et constatent qu'après 21 jours il reste encore une quantité notable d'anticorps dans leur circulation sanguine alors que le niveau des anticorps chez les gens injectés avec le sérum antirabique de cheval descend plus rapidement. L'emploi de sérum et vaccin en combinaison a donné récemment des résultats négatifs à Konishi (38). Cet auteur emploie le vaccin inactivé par les rayons ultraviolets et le sérum antirabique de lapin.

Le vaccin et le sérum sont injectés aux souris blanches à intervalle de temps variable. On fait varier également la dose de sérum et on éprouve les souris avec le virus fixe par voie intracérébrale.

La résistance des souris injectées avec le vaccin et le sérum est beaucoup moindre que celle des témoins injectés avec le vaccin seul. Dans le cas de l'association de vaccin et sérum, la production d'anticorps est arrêtée. D'après l'auteur, l'injection de sérum 5 jours avant la vaccination inhibe la résistance et l'élaboration des anticorps. De même, l'injection de sérum antirabique 3 à 7 jours après la vaccination n'a aucun rôle sur la marche du développement de l'immunité.

Nikolitsch et ses collaborateurs (51) déclarent également que l'emploi du sérum antirabique, même de haute valeur protectrice, ne peut empêcher l'apparition de la rage chez les animaux infectés.

ANIMAL DE CHOIX POUR LA PREPARATION DU SERUM ANTIRABIQUE

a) Ovins. — La préparation du sérum antirabique chez le mouton.

effectuée depuis le début de ce siècle jusqu'à nos jours, provoque toujours des complications d'ordre technique. Notons tout d'abord que le pouvoir rabicide de tels sérums en comparaison avec le sérum antirabique de cheval est bas (19, 36). Il y a en outre, comme l'a indiqué Remlinger (63), un fléchissement brusque et inexplicable du titre du sérum malgré l'injection d'énormes quantités de virus. Les accidents d'anaphylaxie d'autre part interviennent souvent quand on emploie le sérum d'ovins; Borger (8), utilisant la chèvre comme productrice de sérum, constate que ces accidents ne sont pas rares. Koprowski et Cox (41) ont également observé des accidents sériques à la suite de l'emploi des sérums d'origine ovine chez plus de 20 p. 100 des sujets mordus. Les accidents sont parfois très graves (52), surtout si le sérum n'est pas soumis à la purification. Il semble également que le sérum antirabique de mouton perde vite ses qualités neutralisantes. Proca et ses collaborateurs (58), en attribuant un certain pouvoir préventif au sérum frais de mouton, ont observé que les meilleurs sérums, surtout en présence d'antiseptiques tels que le phénol, le salicylate ou le formiate de soude, perdent leur caractère virulicide.

En étudiant les travaux anciens, on peut conclure que la plupart des auteurs qui ont employé le sérum brut d'ovins, n'ont pas obtenu des résultats satisfaisants. Cet échec est en partie le résultat du manque d'aptitude nécessaire de ces animaux, à élaborer l'anticorps spécifique et ensuite de l'absence d'un protocole convenable et d'un antigène actif pour l'hyperimmunisation des animaux. Parmi les travaux relativement récents, Ercegovac (17) en Yougoslavie a préparé sur le mouton un sérum assez puissant dont 1 millilitre neutralise 1000,000 LD de virus pour le rat.

b) Bovins. - - On a essayé de préparer le sérum antirabique chez les bovins sans obtenir un résultat satisfaisant. Shortt et ses collaborateurs (67) ont hyperimmunisé le buffle, mais avec un résultat négatif.

c) Lapin. — Le lapin a été largement utilisé ces dernières années, par les auteurs américains, pour la préparation de sérum antirabique concentré (25, 40). L'inconvénient du sérum de lapin est clair; on ne peut pas le préparer sur une grande échelle, il cause en outre, chez 20 p. 100 des sujets traités, des réactions d'anaphylaxie (41).

d) Equidés. — Semple (66) est le premier à notre connaissance qui ait préparé en 1903 un sérum antirabique de haute valeur chez le cheval. Fermi, en 1909, utilise lui aussi le cheval avec des résultats remarquables. Tous les auteurs sont d'accord sur l'aptitude du cheval à produire un sérum antirabique puissant. Dans des conditions rigoureusement identiques Kōdrnja (36) a montré que le sérum de cheval est plusieurs fois plus actif que celui de mouton; en outre, la plupart des auteurs comme Hosty, Hunter, Koprowski,

Cox, etc., sont d'accord sur la rareté des réactions sériques, surtout quand le sérum de cheval est soumis à la purification.

L'âne aussi est utilisé avec des résultats moins favorables. En Turquie, Berke et Turkay (7), préparent le sérum sur l'âne. L'indice de neutralisation de leur sérum est 200 quand on le compare avec l'étalon international ayant un titre de 1000.

e) L'Homme. — Le sérum homologue, comme nous l'avons déjà mentionné, a donné des résultats supérieurs au sérum hétérologue dans le traitement prophylactique de la rage expérimentale.

Le sérum homologue a également l'avantage de supprimer les accidents sériques qui sont parfois très sérieux, se référant à ces avantages, Hosty et ses collaborateurs (29) ont immunisé 34 volontaires avec 5 injections de vaccin préparé avec des œufs incubés de canard. La gamma globuline obtenue par le fractionnement du mélange des plasmas humains s'est montrée plus avantageuse que le sérum du cheval, en ce qui concerne la durée de persistance de l'anticorps neutralisant dans la circulation sanguine des sujets traités. Cependant, il est difficile de préparer le sérum antirabique chez l'homme sur une échelle suffisante.

METHODES D'IMMUNISATION DES CHEVAUX

Malgré la diversité observée dans le protocole d'immunisation des différents auteurs, on peut grouper les méthodes actuelles comme suit:

- 1^o Méthode de l'Institut Pasteur de Paris.
- 2^o Méthode de l'Institut de Kasauli, Central Researches, Inde.
- 3^o Méthode de l'Institut Toscano, Siena.
- 4^o Méthodes diverses.

Le schéma essentiel de chaque méthode sera donné ici.

I. — METHODE DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS (45)

Les chevaux sont immunisés par voie sous-cutanée. Ils reçoivent d'abord, au cours d'une première série d'injections, le virus rabique phéniqué. Après cette première immunisation au moyen du vaccin phéniqué, les chevaux reçoivent du virus fixe non atténué. Enfin, suivant le taux atteint au cours de l'immunisation, les injections sont continuées avec adjonction éventuelle de substances adjuvantes.

Une fois le taux convenable atteint, les chevaux sont réinoculés tous les mois puis saignés à nouveau.

Protocole d'immunisation

Première série: virus fixe phéniqué.

- Première injection : 40 ml
 - 8 jours après : 80 ml
 - 8 jours après : 120 ml
- } cerveau de lapin phéniqué à 5 p. 100

Deuxième série: virus fixe frais.

On entreprend la deuxième série immédiatement après un repos de 8 jours.

1^e injection : I/2 cerveau de lapin (virus fixe frais) en suspension dans 50 millilitres d'eau distillée.

2^e injection : I cerveau de lapin entier dans 100 millilitres d'eau distillée.

3^e injection : 2 cerveaux de lapin entiers dans 150 millilitres d'eau distillée.

On pratique, 8 jours après, une saignée de contrôle. Suivant les résultats et le titre obtenu, on arrête l'immunisation ou on répète la 2^e série en y adjoignant un supplément d'antigène injecté par voie intramusculaire avec des substances adjuvantes. Différentes substances adjuvantes peuvent être employées, en particulier l'alun de sodium à la concentration de 4 p. 100 dans la suspension injectée ou des dérivés des huiles minérales avec un produit émulsionnant ajouté à concurrence de 1/3 de la fraction de l'injection qui est pratiquée par voie intramusculaire. Le taux définitif du sérum antirabique est normalement ainsi atteint entre le 2^e et le 3^e mois.

Entretien de l'immunisation

A ce moment, on pratique une saignée de récolte et on laisse le cheval au repos un mois. Par la suite, les chevaux immunisés reçoivent tous les mois 2 cerveaux de lapin (virus rabique fixe frais) injectés comme pour la 3^e injection de la 2^e série. Les chevaux sont saignés 8 jours après cette injection de rappel. Ils sont laissés au repos complet un mois par an.

II. — METHODE DE L'INSTITUT DE KASAULI (INDE) (15)

Les chevaux sont d'abord immunisés avec le vaccin phénolé et ensuite avec le virus fixe vivant additionné d'adjuvants. On injecte 14 jours consécutifs 5 centimètres cubes de vaccin phénolé. On injecte ensuite chaque mois et pendant 8 mois une dose de virus vivant incorporé dans des adjuvants

(Falba, Bayol F.). On donne un repos de 3 mois, puis on injecte de nouveau une fois par mois et pendant 3 mois une dose de virus vivant fixe additionné des adjuvants mentionnés. A ce stade, si le sérum a un titre élevé, on saigne le cheval.

III. — METHODE DE L'INSTITUT TOSCANO, SIENNE (12)

La production de sérum hyperimmun se fait chez le cheval. L'antigène employé par les auteurs est le vaccin phéniqué de Fermi (virus Sassari) fraîchement préparé et injecté par voie sous-cutanée à la dose de 10 à 20 millilitres pendant I mois. Une saignée effectuée 7 à 8 jours après la dernière injection de la première série montre que le titre en anticorps n'est pas encore élevé, bien que l'anticorps soit nettement présent chez tous les sujets vaccinés. On obtient un sérum dont le titre virulicide est double, triple, ou même plus en donnant aux animaux une période de repos d'un mois en effectuant une seconde série d'injections. Après une nouvelle période de 2 à 3 mois et une autre série d'inoculations de vaccin, on obtient un sérum très puissant dont I millilitre est capable de neutraliser un million ou plus de doses léthales pour le cobaye. D'après ces auteurs la production d'un bon sérum antirabique chez un cheval neuf semble cependant très lente, demandant plusieurs périodes de repos alternant avec des séries d'immunisation.

De même que dans la production des sérums antitoxiques, on rencontre des animaux qui sont de très bons producteurs de sérums à côté de sujets médiocres ou même réfractaires. Toute proportion gardée, la marche de la production d'un sérum antirabique est très semblable à celle du sérum antitétanique. Il est ainsi possible de préparer en un seul temps un puissant sérum mixte antitétanique et antirabique par inoculation simultanée à l'animal des antigènes correspondants.

Pour obtenir le maximum de titre d'anticorps chez le cheval, on a essayé à plusieurs reprises l'hydroxyde d'alumine et l'hydroxyde de fer; on a également comparé les injections d'antigène de 2 à 7 jours mais avec des résultats négatifs. Les auteurs insistent sur la durée de repos entre les séries successives d'inoculation afin d'obtenir le meilleur sérum.

IV. — METHODES DIVERSES

HABEL (25) immunise les lapins par injection intradermique, 2 fois par semaine et pendant II semaines; il obtient ainsi un sérum de haute valeur. Lorsqu'on arrête les inoculations, le titre tombe mais il se rétablit quand on injecte de nouveau deux doses de l'antigène.

Hosty et ses collaborateurs (29) immunisent l'homme par 5 injections, espacées de 4 jours, de vaccin préparé sur œufs incubés de canard. La 6^e injection se fait après 46 jours et l'injection finale le 288^e jour. Esquival et ses collaborateurs (18) préparent des chevaux avec de bons résultats au moyen de 5 à 6 séries d'injections de vaccin. Chaque série d'injections dure de 15 à 30 jours: on injecte d'abord du vaccin type Kelsner, puis du virus fixe vivant. L'injection se fait par voie sous-cutanée, intramusculaire et en partie intradermique. D'après ces auteurs, l'inoculation intradermique améliore nettement la production du sérum antirabique.

Gomes (23) prépare un sérum assez actif sur le cheval. Cet auteur injecte des doses croissantes de vaccin phénolé et après 20 jours il commence à injecter le virus vivant jusqu'à 72 jours.

Tout récemment, Torrado et Crescini (69) prétendent avoir immunisé le cheval par deux injections seulement de 20 millilitres du vaccin type Kelsner avec un bon résultat.

PREPARATION EN IRAN DU SERUM ANTIRABIQUE

MATERIEL ET METHODES

Pour la préparation du vaccin type Semple, nous employons soit la souche fixe de Pasteur utilisée à l'Institut Pasteur d'Iran pour la préparation du vaccin ou celle reçue de Dr. Kaplan (*), soit la souche Sassari due à la courtoisie du Pr d'Antona (**).

On emploie des chevaux et des mulets réformés de l'Armée, âgés de 12 à 16 ans. Pour l'hyperimmunisation des animaux, on applique d'abord la méthode de l'Institut Pasteur de Paris que l'on remplace finalement par la méthode de d'Antona et Falchetti. L'épreuve du pouvoir de protection des sérums se fait par la méthode adoptée par l'O.M.S. (43, 53) comme test officiel. On prépare les mélanges sérums-virus de sorte que dans 0,03 ml de l'inoculum intracérébral il y ait, après neutralisation d'une heure à 37° C, au moins 100 DL 50 de virus vivant. On emploie comme sérum de référence le sérum international étalon. Le calcul du pouvoir de protection final des sérums se fait suivant la méthode de Reed et Muench (62).

(*) *Nous remercions le Dr Kaplan, chef de la section vétérinaire à l'O.M.S., Genève, pour l'envoi des virus et du sérum étalon.*

(**) *Nous remercions MM. les Prs d'Antona et Falchetti pour leur accueil cordial pendant notre visite de l'Institut Toscano*

On emploie des souris blanches pesant 10-14 grammes, des deux sexes et âgées à peu près d'un mois.

L'étude électrophorétique des sérums se fait sur un appareil genre Grassmann et Hanig avec bande de papier Whatman n° I, de dimensions 28,5×3,9 cm. On utilise comme tampon le véronal sodique-acétate de soude à pH 8,6 et une force ionique égale à 0,1.

Le détail complet de notre technique d'électrophorèse sur papier a été donné ailleurs (50).

RESULTATS

METHODE DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

Première expérience

Cinq chevaux de 12 ans préparés avec la technique de l'Institut Pasteur de Paris, que nous avons décrite précédemment, ont des titres très bas; en effet, à la fin de l'hyperimmunisation la dilution au 1/50 du sérum de 2 chevaux sur 5 était capable de neutraliser 100 DL 50 de virus; chez les 3 autres, on a pu déceler une trace d'anticorps.

METHODE DE L'INSTITUT TOSCANO LÉGEREMENT MODIFIÉE

Deuxième expérience

Le but de cette expérience est de comparer l'aptitude du cheval et du mulet pour la production du sérum antirabique. On a voulu ensuite étudier les variations globuliniques du plasma au cours de l'immunisation.

On immunise 6 chevaux et 7 mulets de 12 à 15 ans. On utilise comme vaccin une suspension à 5 p. 100 de cerveau de mouton enragé (virus Sassari) dans le tampon phosphaté de Kaplan, phénolée à 0,5 p. 100 et conservée selon les cas 24 à 48 heures à 37° C. Les animaux sont simultanément immunisés contre le tétanos avec quelques injections d'anatoxine tétanique purifiée et adsorbée sur phosphate d'alumine (P.A.T.T.).

Voici le schéma de l'immunisation:

JOURS	MATERIAL
I	20 ml vaccin phéniqué + 10 ml P.A.T.T.
2 - 20 (= 19 j)	20 ml vaccin phéniqué chaque jour
21	30 ml de vaccin phéniqué + 25 ml P.A.T.T.
22 - 40 (= 19 j)	30 ml vaccin phéniqué chaque jour
41	45 ml vaccin phéniqué + 40 ml P.A.T.T.
42 - 56 (= 15 j)	45 ml vaccin phéniqué par jour

REPOS : 60 JOURS

116	30 ml vaccin phéniqué + 30 ml P.A.T.T.
117 - 126 (= 10 j)	30 ml vaccin phéniqué par jour
127	45 ml vaccin phéniqué + 45 ml P.A.T.T.
128 - 136 (= 9 j)	45 ml vaccin phéniqué seul
137	30 ml suspension 5% virus vivant + 60 ml P.A.T.T.
138 - 134 (= 6 j)	30 ml suspension (5% virus Sassari vivant)
156	Première saignée.

On recherche, dans tous les sérums, le taux de l'anticorps neutralisant antirabique et le titre en antitoxine tétanique. Les sérums sont également soumis à l'électrophorèse sur papier. Il va sans dire qu'on a étudié avant l'immunisation les courbes électrophorétiques ainsi que le pouvoir antirabique et antitétanique du sérum de tous les animaux. Il faut ajouter qu'on n'a pas pu déceler chez les animaux neufs de traces d'anticorps rabiques, mais, grâce à la vaccination régulière dans l'armée, ces animaux possèdent un taux suffisant d'antitoxine tétanique. Nous nous bornerons à indiquer dans le tableau I les variations en bêta-2 et gamma-globuline. Les autres globulines ne montrent pas une variation notable; en outre, à la suite de l'immunisation, on observe chez tous les animaux une diminution importante du taux d'albumine, ce qui est normal.

Le tableau I résume les effets de l'immunisation.

TABLEAU I

VARIATIONS DES FRACTIONS GLOBULINIQUES CHEZ LES CHEVAUX ET LES MULETS HYPERIMMUNISÉS CONTRE LA RAGE

N ^{os} DES ANIMAUX	AVANT IMMUNISATION		APRÈS IMMUNISATION		DILUTION FINALE DU SÉRUM NEUTRALISANT 100 DL, 50	ANTI-TOXINE TÉTANIQUE U.A./ml <i>in vivo</i>
	β 2 globuline % sérum	γ-globuline % sérum	β 2-globuline % sérum	γ-globuline % sérum		
<i>Chevaux</i>						
4	—	33,33	15,32	30,64	1/300	100
6	6,12	30,61	13,49	26,98	1/10	60
7	—	31,70	9,61	22,11	1/600	100
10	7,95	28,40	13,11	26,22	1/10	45
12	7,89	27,84	12,50	22,42	1/10	110
13	12,50	28,70	14,40	26,27	0	50
<i>Mulets</i>						
16	7,52	34,43	17,64	29,40	1/1 100	230
18	—	32,50	12,50	25,00	1/1 000	200
19	—	30,23	18,42	26,31	1/1 100	200
20	—	30,68	22,62	19,35	1/600	330
21	—	32,96	23,88	31,34	1/1 600	240
22	—	31,39	16,28	29,75	1/1 100	200
23	—	27,95	17,50	22,50	1/2 000	240

De ce tableau, on peut tirer les conclusions suivantes:

1^o Les sérums des mulets sont plus riches en anticorps virulicides et antitoxique que les sérums des chevaux.

2^o Parallèlement, la fraction bêta 2-globuline, absente chez la plupart des mulets neufs, est plus abondante chez les mulets immunisés que chez les chevaux immunisés.

3^o Cette coïncidence est significative et nous permet d'évaluer l'évolution de l'élaboration des anticorps antirabiques; en effet, on connaît à l'heure actuelle deux méthodes pour évaluer le pouvoir rabicide des sérums. La première méthode est le titrage par la fixation du complément qui n'est guère qu'une méthode approximative et qui n'a aucun rapport précis, comme il a été indiqué par les travaux de Covell (9) et Shortt (67), avec le pouvoir neutralisant évalué par le test de séro-protection.

La deuxième technique est la séroprotection sur souris blanches ou cobayes qui donne des résultats sûrs mais qui est longue et coûteuse. Nous sommes d'après cette expérience en plein accord avec d'Antona et Falchetti qui ont trouvé à côté des chevaux bons producteurs d'anticorps rabiques de mauvais producteurs et même des chevaux réfractaires.

Nous avons continué l'hyperimmunisation de ces 6 chevaux après un long repos selon les recommandations de d'Antona et Falchetti avec une certaine amélioration du titre du sérum, sans qu'il y ait une augmentation significative de la fraction bêta 2-globuline. Par contre, à la suite du repos et des séries d'injections, le pouvoir neutralisant du sérum des mulets augmente d'une manière sensationnelle; de même, la teneur en bêta 2-globulines augmente proportionnellement à l'augmentation du titre antiviral. Pour étudier mieux l'aptitude du mulet comparativement à celle du cheval et de l'âne, le rapport entre l'augmentation de la fraction bêta 2-globuline et la valeur neutralisante des sérums et finalement pour voir l'effet de l'immunisation associée antirabique-antitétanique, l'expérience suivante a été réalisée:

Expérience n° 3. — Dix mulets de 12-15 ans et 4 ânes de 7 ans sont immunisés comme suit :

Groupe A: 5 mulets (R. 24 à R. 28) et 2 ânes (R. 34 et R. 36) sont immunisés d'après le protocole de l'expérience n° 2.

Groupe B: 5 mulets (R. 29 à R. 33) et 2 ânes (R. 38 et R. 39) sont immunisés d'après le même protocole sans injecter l'antigène tétanique.

Il va sans dire qu'on réduit chez l'âne le volume de l'inoculum, c'est à-dire qu'au lieu des doses journalières de 20, 30 et 45 millilitres, on injecte 10, 20 et 30 millilitres de vaccin phéniqué ou de suspension de virus vivant.

Les résultats obtenus sont groupés dans les tableaux II et III.

De cette expérience, on peut conclure qu'à la suite de l'hyperimmunisation avec l'antigène rabique, une globuline dont la mobilité est semblable à celle de la bêta 2-globuline augmente dans le sang du mulet; l'augmentation de cette globuline coïncide avec l'élaboration d'une quantité importante d'anticorps rabiques. L'association de l'antigène tétanique semble également stimuler l'élaboration des anticorps rabiques.

En effet, on peut conclure que, dans des conditions rigoureusement identiques, le mulet est plus apte à élaborer les anticorps rabiques que le cheval ou l'âne.

Les courbes électrophorétiques I à 6, illustrent les variations globuliniques chez les animaux au cours de l'hyperimmunisation antirabique.

ETUDE DES VARIATIONS GLOBULINIQUES EN RELATION AVEC LE TITRE ANTIRABIQUE

On étudie par électrophorèse le sérum des mulets, fournisseurs de

TABLEAU II

VARIATIONS GLOBULINIQUES CHEZ LE MULET A LA SUITE DE L'IMMUNISATION ANTIRABIQUE SEULE OU ASSOCIÉE AVEC L'IMMUNISATION ANTITÉTANIQUE

N ^{os} DES MULETS	ANTIGÈNES	AVANT IMMUNISATION			APRÈS IMMUNISATION			DILUTION FINALE SÉRUM NEUTRALISANT 100 I.D. 50	ANTITOXINE TÉTANIQUE U.A. /ML in vivo
		Albumine %	β 2-globuline %	γ globuline %	Albumine %	β 2-globuline %	γ globuline %		
24	Rabique et tétanique	43,94	—	26,14	18,00	17,00	30,00	1 / 1 000	250
25		38,39	11,60	27,67	17,91	26,86	31,34	1 / 1 500	300
26		47,38	6,01	23,69	24,59	17,21	30,32	1 / 3 000	250
27		44,76	5,71	27,61	23,68	21,71	28,94	1 / 3 000	300
28		42,98	7,01	23,68	22,40	27,20	25,60	1 / 4 000	350
29	Rabique seul	40,98	10,65	15,50	27,53	21,01	23,18	1 / 1 000	2,0
30		37,50	4,68	28,90	30,30	18,93	22,72	1 / 1 000	3,75
31		39,51	6,45	29,32	29,32	16,54	27,06	1 / 1 500	2,25
32		43,91	8,13	24,39	27,73	18,48	28,57	1 / 1 000	4,25
33		43,75	6,25	26,56	25,53	18,12	28,85	1 / 3 000	3,5

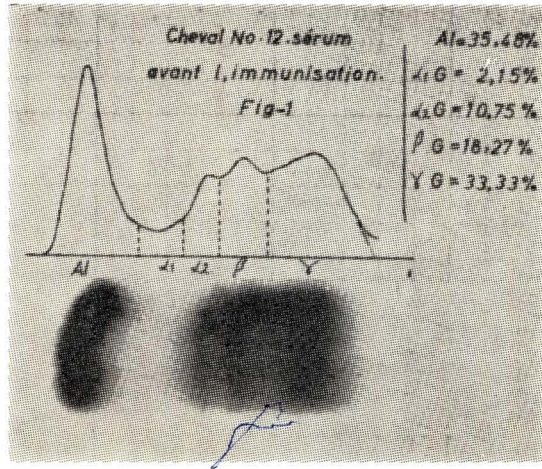
Le titre en antitoxine tétanique est le résultat de la vaccination antitétanique pratiquée à l'arrivée des animaux au laboratoire.

TABLEAU III

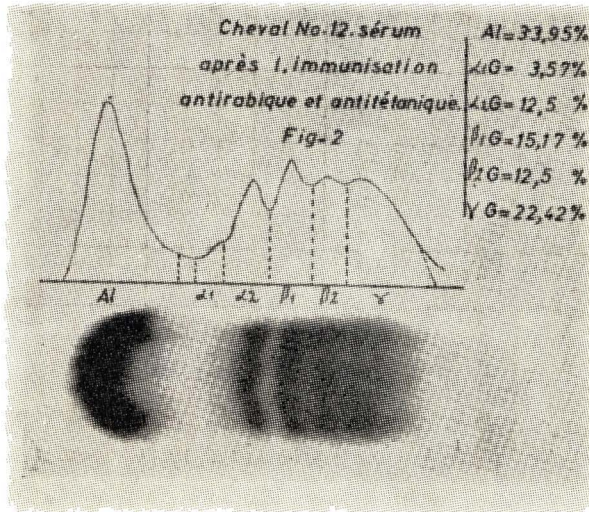
VARIATIONS GLOBULINIQUES CHEZ L'ANE A LA SUITE DE L'IMMUNISATION ANTIRABIQUE SEULE OU ASSOCIÉE AVEC L'IMMUNISATION ANTITÉTANIQUE

N ^{os} DES ANES	ANTIGENES	AVANT IMMUNISATION				APRÈS IMMUNISATION					DILUTION FINALE SÉRUM NEUTRALISANT 100 LD 50	ANTITOXINE TÉTANIQUE U.A./ML <i>in vivo</i>
		Albu- mine %	β 1-glo- buline %	β 2-glo- buline %	γ-glo- mine %	Albu- buline %	β 1-glo- buline %	β 2-glo- buline %	β 3-glo- buline %	γ-glo- buline %		
34.	Rabique et tétanique	27,58	13,79	—	40,51	26,66	22,50	—	—	33,33	1 / 1 000	150
36.		33,33	5,83	6,66	41,66	24,39	5,69	9,75	10,56	34,95	1 / 370	75
38.	Rabique seul	22,22	20,37	—	35,18	24,82	16,31	—	—	36,87	1 / 40	2,25
39.		28,57	11,60	9,82	35,71	26,71	7,63	13,74	—	35,11	1 / 200	2,00

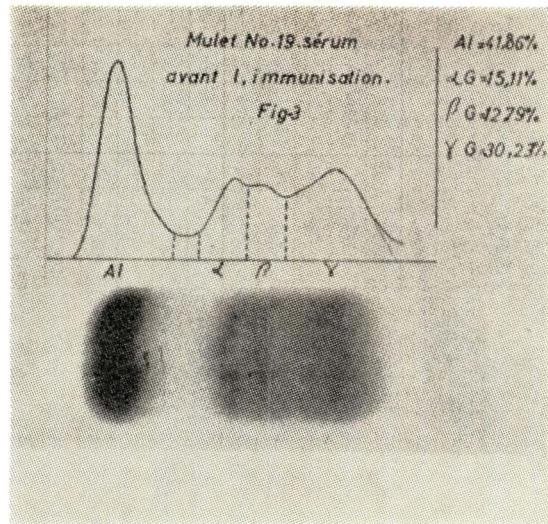
sérum antirabique, en même temps qu'on recherche la valeur de ces sérums par la séroprotection sur souris blanches.



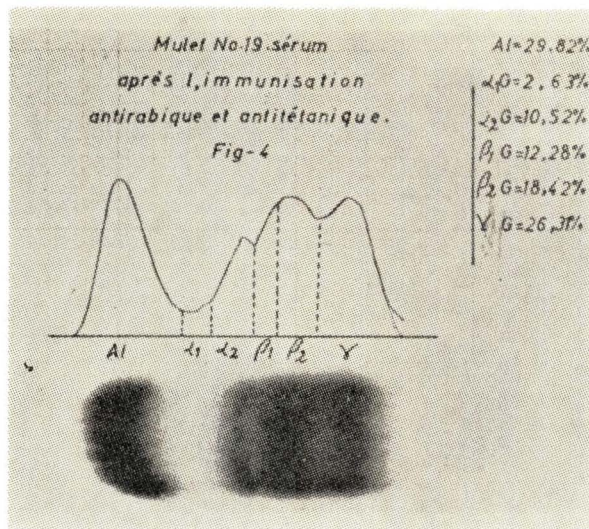
D'une manière générale, au cours de l'hyperimmunisation et surtout après des repos et de nouvelles immunisations, on constate une diminution



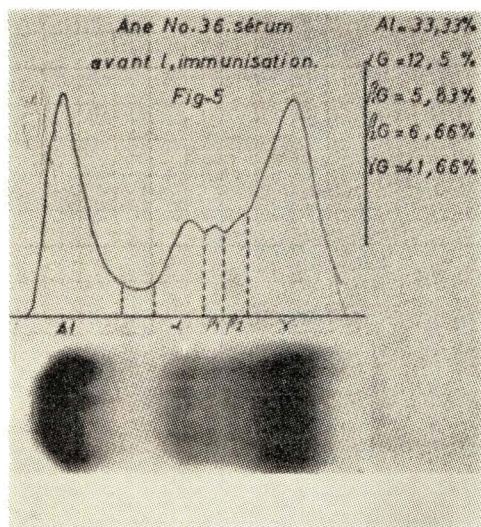
appréciable de l'albumine. De même, la fraction gamma-globulinique diminue lentement et d'une manière peu sensible; par contre, à la suite du dédou-



blement de la gamma-globuline, une nouvelle fraction, pauvre à l'état normal et d'une mobilité entre la bêta -I- et la gamma-globuline augmente de telle



sorte qu'elle constitue 17 à 25 p. 100 des fractions de sérum chez les mulets hyperimmunisés.



A ce moment, le pouvoir rabicide est considérable, ce qui nous permet de penser que l'anticorps antirabique chez le mulet accompagne cette fraction.

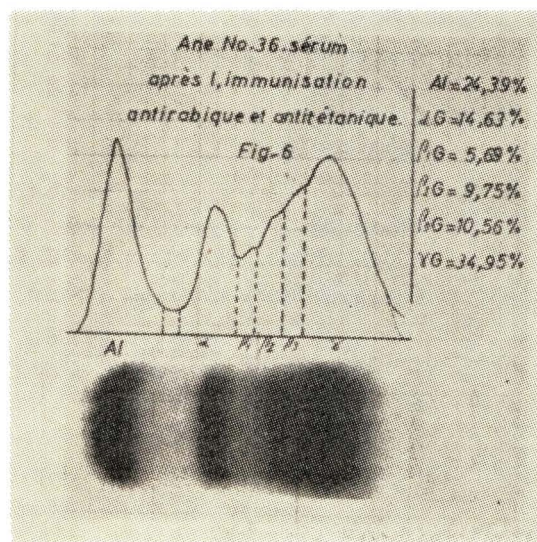


TABLEAU IV
VARIATIONS ÉLECTROPHORETIQUES DU SÉRUM DE MULETS ET TITRE ANTIRABIQUE

N ^{os} DES MULETS	AVANT IMMUNISATION				APRÈS IMMUNISATION DE BASE				40 SEMAINES APRÈS IMMUNISATION				80 SEMAINES APRÈS IMMUNISATION			
	Albumine %	β 2-globuline %	γ -globuline %	Titre antirabique	Albumine %	β 2-globuline %	γ -globuline %	Titre antirabique	Albumine %	β 2-globuline %	γ -globuline %	Titre antirabique	Albumine %	β 2-globuline %	γ -globuline %	Titre rabique
16.	32,25	7,52	34,43	o	30,00	12,20	32,17	1/400	26,47	17,64	29,40	1/110	23,18	19,56	28,98	1/5 000
20.	43,18	o	30,68	o	37,22	10,17	26,41	1/250	30,64	22,62	19,35	1/600	26,61	25,17	21,85	1/6 000
21.	36,26	o	32,96	o	31,14	10,31	32,72	1/650	20,88	23,88	31,34	1/1.600	23,12	23,12	23,94	1/5 500
22.	39,55	o	31,39	o	33,34	11,21	30,45	1/470	27,64	16,28	29,75	1/1 100	25,56	17,29	28,57	1/2 000
23.	40,86	o	27,95	o	38,56	11,47	26,92	1/350	33,33	17,50	22,50	1/2 000	27,39	25,34	22,60	1/4 000

Le titre est la dilution finale qui neutralise 100 I.D. 50 de virus.

La dilution au 1/1 000 du sérum de référence international neutralise 100 I.D. 50 de virus.

appelée fraction γ ou β 2-globuline et que la gamma-globuline chez l'animal hyperimmunisé ne renferme qu'une faible quantité d'anticorps. Le tableau IV illustre les variations déjà mentionnées. Il faut se rappeler qu'on observe rarement chez le mulet des fluctuations dans le titre antiviral, malgré les injections successives d'antigènes; ce phénomène s'observe d'autre part chez les animaux producteurs d'autres sérums antitoxiques ou antimicrobiens.

EFFET TOXIQUE DES SUBSTANCES NERVEUSES SUR LES MULETS ET EMPLOI D'ANTIGENES PAUVRES EN TISSU CEREBRAL

Un défaut essentiel attribué aux vaccins antirabiques à base d'émulsion cérébrale est celui de la possibilité de manifestations paralytiques qui surviennent quand on continue à inoculer ces vaccins.

KRAUS a observé, par exemple, 200 cas de symptômes nerveux chez 2,000 personnes traitées avec ces vaccins. REDEWILL et UNDERWOOD (61) ont observé 1 cas sur 1,194 personnes et GREENWOOD (24), 1 sur 5,814 personnes. Ces réactions sont également observées chez les animaux d'expérience ou producteurs de sérum.

Nous avons perdu 4 mulets sur 40 au cours de l'hyperimmunisation à la suite de complications neuroparalytiques. Dans un cas, l'animal était atteint d'une paralysie ascendante; chez les 3 autres sujets, on observait une paraplégie. Pour obvier à cet inconvénient, on a cherché à préparer des vaccins pauvres en matière nerveuse. PONOMAREFF et SOLOVIEFF (55), constatent que le surnageant de la suspension à 10 p. 100 en eau physiologique de cerveau de lapin, mélangé avec de la paraffine et centrifugé, donne un liquide opalescent qui contient une grande partie du virus. Un cheval préparé par ces auteurs avec ce virus purifié produit un sérum de haute valeur rabicide.

Nous avons essayé de préparer des mulets avec d'autres antigènes que le vaccin phéniqué de Semple; voici le résumé de cette expérience:

Expérience n° 4. — Deux séries de 4 mulets sont préparées comme suit :

Série A: vaccin phéniqué préparé avec le surnageant de l'émulsion de cerveau de mouton enragé dans l'eau distillée, selon la formule préconisée par D'SILVA et ses collaborateurs (16).

On applique le protocole de l'immunisation de l'expérience n°. 2 et on utilise également l'antigène tétanique.

Série B: vaccin préparé selon la méthode de GERALDA (21) avec

bêta-propiolactone, mais sans soumettre aux rayons ultraviolets, suivant le même protocole que la série A.

Dans les deux séries, le pouvoir rabicide des sérums augmente lentement et il faut 2 à 4 séries d'injections après l'immunisation de base pour obtenir, chez les 8 mulets, un sérum dont la dilution au 1/1100 puisse neutraliser 100 LD 50.

CONCENTRATION ET PURIFICATION DU SERUM ANTIRABIQUE

Nos connaissances sur les méthodes de concentration du sérum antirabique sont limitées. La plupart des auteurs qui ont envisagé le problème se contentent de dire que l'anticorps neutralisant est probablement localisé sur les fractions pseudo-globuliniques et en partie sur la fraction euglobulinique et, par conséquent, les méthodes actuelles de concentration et de purification des sérums antitoxiques, y compris la digestion enzymatique de Pope (56), peuvent être appliquées à la purification et à la concentration du sérum antirabique (13). D'après HABEL (25) l'anticorps antirabique chez le mouton se trouve sur la fraction euglobulinique; il a essayé de concentrer le sérum de mouton par fractionnement au sulfate d'ammonium. La technique de HABEL pour la concentration du sérum de lapin est simple: il chauffe le mélange des sérums de plusieurs lapins à 40 °C, y ajoute du sulfate anhydre de soude à raison de 16 p. 100, puis chauffe le mélange plusieurs heures à 37 °C et le centrifuge. Le précipité est dialysé une nuit dans l'eau courante, puis le dialysat est filtré sur des filtres genre Berkefeld. KOPROWSKI et ses collaborateurs (40) utilisent, soit la méthode de Habel, soit le fractionnement du plasma par le méthanol et concentration de la fraction chargée de gamma-globulines. Le produit final contient 7 p. 100 de protéines.

DEVI et ses collaborateurs (15) ont publié en détail les résultats de leurs recherches sur la concentration du sérum antirabique. Ces auteurs ont essayé quatre méthodes, toutes basées sur le fractionnement au sulfate d'ammonium; finalement ils ont adopté une technique dont voici le principe:

— 1 780 millilitres de plasma sont dialysés 4 jours dans 8 sacs dans l'eau froide, le contenu des sacs et l'eau de lavage sont mélangés, précipités au point isoélectrique, mis dans 2 fois leur volume d'eau distillée additionnée de 0,2 p. 100 de crésol, gardée la nuit à froid; le surnageant enlevé, le précipité centrifugé, le mélange de surnageant et de centrifugat est neutralisé avec 20 p. 100 de carbonate de sodium; le pH ajusté à 7,2, on y ajoute un volume égal de solution de sulfate d'ammonium. Après une heure, on filtre le précipité, on presse et dialyse.

On l'isotonise avec une solution de NaCl; le pH est ajusté à 7,3, le

produit est clarifié sur pulpe de papier puis sur Seitz. On obtient ainsi un produit coloré en vert, contenant 18,08 p. 100 d'extrait sec avec un coefficient de concentration égal à 8 et un rendement de 62 p. 100.

Pour enlever le pigment, on utilise le charbon animal (B.D.H.); le produit final est incolore mais le rendement tombe à 30 p. 100.

WANG et LIN (73) en 1957 ont purifié le sérum antirabique par digestion pepsique; 200 millilitres de sérum préparé sur un cheval chinois de petite taille ont été purifiés et concentrés selon la méthode légèrement modifiée des laboratoires de la Santé Publique de Lansing-Michigan (U.S.A.). Cette méthode, appliquée par nous en 1953 (14) en collaboration avec DELSAL pour la préparation des sérums antidiphthérique et antitétanique, consiste en une digestion pepsique, accompagnée d'une thermocoagulation en présence de sulfate d'ammonium, puis en un traitement à l'alun pour enlever les pigments.

D'après ces auteurs, le produit final ramené à 1/14 du volume initial est 6,3 fois concentré en anticorps rabicides, par rapport au sérum brut: le rendement est de 44,7 p. 100.

Il va sans dire que le but principal dans la concentration et la purification des sérums antitoxiques, antimicrobiens ou antiviraux est d'une part l'élimination de l'albumine et autres protéines inertes qui sont à l'origine des accidents sériques et d'autre part la concentration des globulines portant les anticorps spécifiques.

Au point de vue pratique, on doit choisir un procédé assez simple qui puisse donner un produit pur d'une haute concentration en matière spécifique et surtout avec un rendement raisonnable.

Nous avons essayé plusieurs méthodes avec des produits finaux plus ou moins purs et des rendements variables. Nous nous bornons à présenter ici seulement les deux techniques principales que nous avons appliquées sur des lots de 25 à 50 litres de sérum antirabique.

Ces techniques sont:

1° La technique modifiée de WADSWORTH (Standard Methods, 1947).

2° La digestion enzymatique de Pope, formule du «Michigan Department of Health» variante de l'Institut Razi (14) ou celle de WANG et LIN (73).

TECHNIQUE DE WADSWORTH

On mélange 50 litres de plasma oxalaté de 3 saignées de mulets. On détermine le titre du mélange; on y ajoute 0,1 p. 100 de CaCl₂, on chauffe

une heure à 56 °C, puis on filtre sur des filtres presses.

Le sérum défibriné ainsi obtenu est dilué à parties égales avec l'eau distillée puis on ajuste le pH à 8,0.

I° PRECIPITATION. — Avec une solution saturée de sulfate d'ammonium (S.S.S.), on ramène la concentration de la solution à 29 p. 100. La formule suivante facilite les calculs:

$$x = \frac{CV}{100 - x}$$

x = volume de S.S.S.

C = concentration en sulfate désirée.

V = volume du sérum dilué.

Le mélange est chauffé une heure à 56° C, puis on filtre sur filtre presse.

2° PRECIPITATION. — Les anticorps spécifiques sont précipités à ce stade en augmentant la teneur en sulfate d'ammonium à 48 p. 100. On applique ici la formule suivante:

$$x = \frac{C2 - C1}{100 - C2}$$

x = volume de S.S.S.

V = volume de sérum dilué à 29 p. 100 S.S.S.

C1 = concentration initiale de S.S.S.

C2 = concentration désirée de S.S.S.

Le précipité recueilli sur filtre presse est desséché et dialysé.

Dépigmentation. — La décoloration du sérum à ce stade se fait par addition de 80 p. 100 d'hydroxyde d'alumine et chauffage du mélange une heure à 56°C. On sépare après une nuit le sérum clair par centrifugation.

Concentration finale du sérum. — On mélange le sérum décoloré à parties égales avec la S.S.S. puis, après deux heures, on ramène la concentration en sulfate à 55 p. 100. On laisse une nuit à la température du laboratoire, puis on filtre le mélange sur papier Whatman n° 50; le précipité sera desséché à l'étuve, puis il sera soumis à la presse hydraulique; finalement, on dialyse le sérum.

Le produit final est isotonisé, on y ajoute également du phénol à raison de 0,3 p. 100.

On le filtre ensuite, après clarification, dans des appareils genre Alfa-

Laval, ou après centrifugation sur des plaques stérilisantes Seitz. Le sérum étant trop visqueux, on peut le diluer au 1/2 pour faciliter la filtration.

DIGESTION ENZYMATIQUE DE POPE (56)

Depuis 1950, nous appliquons la digestion enzymatique de Pope, technique de «Biologic Products Section of the Michigan Department of Health», pour la purification de nos sérums antitoxiques. Le détail de cette technique a été publié ailleurs (14). Dans cette technique, la dépigmentation se fait à l'alun suivant la méthode de Wadsworth. Il y a peu de temps que nous utilisons pour la décoloration l'hydroxyde d'alumine au lieu d'alun, ce qui donne également un produit incolore sans être douloureux, alors que les sérums traités à l'alun sont souvent douloureux.

Nous avons appliqué cette technique ainsi que celle de WANG et LIN (digestion enzymatique de Pope et dépigmentation à l'alun) à la purification du serum antirabique. Le tableau V montre les résultats obtenus. De même, les courbes électrophorétiques n^{os} 7, 8, 9 et 10 illustrent l'état des produits finaux.

En étudiant ces courbes et le tableau V, on voit que le fractionnement au sulfate d'ammonium fournit un produit suffisamment pur et concentré, la fraction Bêta 2-globuline renfermant la plus grande quantité d'anticorps est concentrée et par conséquent, le rendement de la purification est normal; par contre, à la suite de l'application de la digestion enzymatique, la fraction Bêta 2-globuline est éliminée, par contre la g.-globuline est concentrée, mais le titre antirabique ainsi que le rendement sont bas.

D'après ce tableau, le plasma antirabique, soumis à la concentration par fractionnement au sulfate d'ammonium, donne un produit 3 à 6 fois plus concentré en anticorps neutralisants par rapport au sérum brut avec un rendement de 40 à 62 p. 100. Par contre, la digestion enzymatique de Pope donne des produits du même ordre de concentration mais avec un rendement de 5,6 à 22 p. 100. Ces données nous permettent de penser qu'en traitant le sérum hyperimmun des équidés hyperimmunisés contre la rage il ne faut pas penser à concentrer seulement la g.-globuline qui ne renferme pas totalement les anticorps antirabiques; par contre, tout procédé comme le fractionnement au sulfate d'ammonium qui permet de récupérer la g.-globuline en même temps que la Beta 2-globuline est à conseiller.

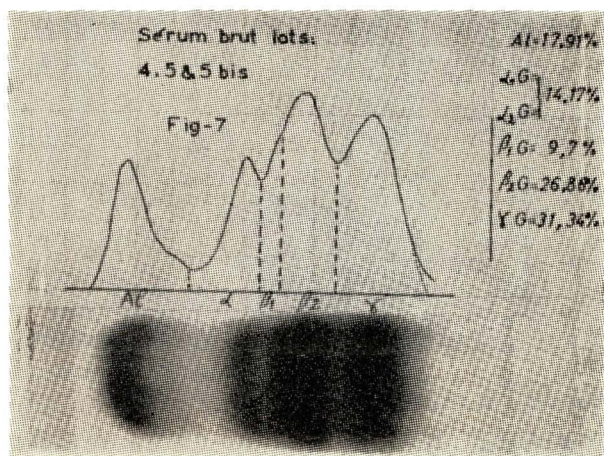
La teneur en protéine totale des plasmas traités au sulfate d'ammonium semble être grande mais si on tient compte du titre des produits finaux on se rend compte que la dilution de ces produits à 20 U. par millilitre,

TABLEAU V

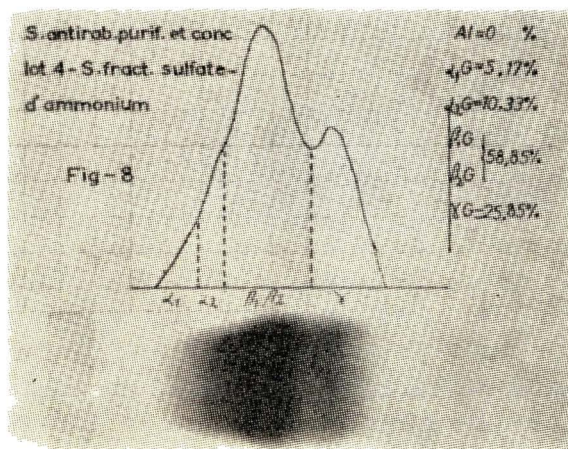
CONCENTRATION ET PURIFICATION DU SÉRUM ANTIRABIQUE

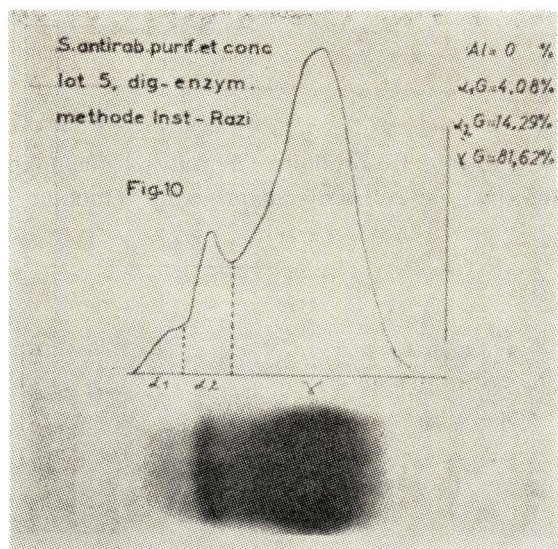
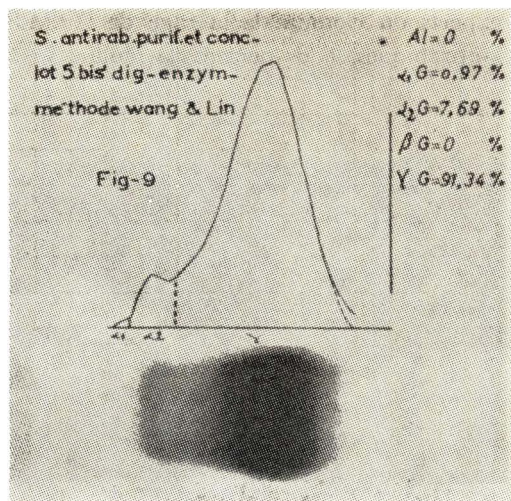
LOT N°	MÉTHODE DE CONCENTRATION	VOLUME PLASMA (ml)	TITRE DU PLASMA		VOLUME FINAL (ml)	TITRE FINAL		PROT. TOTAL (g/%)	EXTRAIT SEC (g/%)	RÉSULTAT	
			Anti- rabique U.I./ml	Anti- téta- nique U.I./ml		Anti- rabique U.I./ml	Anti- téta- nique U.I./ml			Anti- rabique (%)	Anti- téta- nique (%)
1	Razi enzym.	25 000	80	50	1 250	320	500	9,60	13,05	20	50
2	Razi enzym.	25 000	80	50	1 100	400	750	12,7	14,93	22	65
3	Fract. sulf. am.	75 000	200	175	7 200	1 044	1 000	15,82	18,80	50	54
4	Fract. sulf. am.	100 000	200	150	9 500	1 200	900	11,38	13,00	57	57
5	Fract. sulf. am.	90 000	180	220	21 000	850	900	12,62	17,50	62	54
6	Fract. sulf. am.	75 000	150	160	8 250	750	700	11,75	17,60	55	48
7	Fract. sulf. am.	100 000	104	180	14 000	300	700	12,36	16,92	40	54
8	Wang enzym.	17 000	104	180	500	198,5	2 450	8,62	11,8	5,6	40
9	Razi enzym.	17 000	104	180	500	444	2 450	11,81	15,3	12,5	40

adoptée par les experts du Comité de la rage de l'O.M.S. comme pouvoir légal des sérums antirabiques, nous permet de réduire la teneur en protéine



totale autour de 5 p. 100. Ce produit renferme également, comme le tableau V l'indique, une quantité suffisante d'antitoxine tétanique.





EFFICATE

Les résultats de l'efficacité de notre sérum antirabique seront publiés plus tard par nos collègues de l'Institut Pasteur de Téhéran. Notons tout simplement que plus de 1,000 personnes, divisées en groupes plus ou moins

importants et blessés par des loups ou d'autres animaux suspects de rage ont déjà été traités avec nos sérums. Dans beaucoup de cas on a pu confirmer la présence de virus rabique chez l'animal mordeur soit par l'examen de laboratoire, soit à la suite de l'évolution de rage chez des blessés des mêmes groupes, arrivés trop tard pour le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Téhéran. Sur ceux traités avec sérum et vaccin, suivant les suggestions de l'O.M.S., aucun cas de rage ne s'est déclaré.

COMPLICATION DU TRAITEMENT ANTIRABIQUE

Le Comité d'experts de l'O.M.S. (53) a confirmé la fréquence des accidents sériques (réaction de type retardé) qui varient de 0 à 20 p. 100 à la suite de l'emploi de sérum antirabique de cheval purifié et concentré.

D'après la statistique de l'Institut Pasteur de l'Iran, 10 p. 100 des gens traités ont montré des réactions sériques légères guéries en deux jours avec les traitements habituels.

L'enquête ultérieure nous a montré que ces sérums très concentrés (10 à 12 fois plus actifs que le sérum de référence international) sont riches en protéines (à peu près 18%); les lots utilisés renfermaient également une trace d'albumine.

DISCUSSION

Pour préparer un sérum antirabique de pouvoir protecteur élevé, il faut se rappeler que, dans la production des anticorps, la qualité d'antigène, sa concentration, le rythme et la voie d'injection, la santé et l'aptitude de l'animal à élaborer l'anticorps en question, ainsi que la rapidité de l'absorption de l'antigène, sont des éléments parmi d'autres qui jouent le rôle principal.

En ce qui concerne l'antigène rabique, on emploie souvent un vaccin tissulaire qui contient une quantité relativement faible de virus dévitalisé par un antiseptique comme le phénol et inclus dans une énorme quantité de substance nerveuse. Ainsi les injections hebdomadaires ou mensuelles, surtout dans la période de l'immunisation de base, ne peuvent pas apporter une quantité suffisante d'antigène au système réticulo-endothélial chargé de synthétiser les anticorps antirabiques. On sait en effet qu'une partie du virus emprisonné à l'intérieur du tissu nerveux sera résorbée par l'organisme avant d'imprégner le système de défense animal. Une autre partie de l'antigène sera acheminée vers les centres nerveux en poursuivant la même route que le virus vivant; c'est enfin une troisième partie qui joue le rôle de pro-

téine étrangère et entre en contact avec la circulation sanguine pour préparer les anticorps. Ainsi, tout moyen qui ralentit la résorption du virus peut aider à l'élaboration de l'anticorps.

Les méthodes basées sur l'inoculation intradermique de l'antigène, l'addition des substances retardant la résorption telles que l'alun, Falba Bayol et hydroxyde d'alumine JACOTOT (34) et surtout l'inoculation journalière de l'antigène au cours de l'immunisation de base et dans la période d'hyperimmunisation sont des méthodes recommandées pour obtenir à coup sûr un sérum de valeur thérapeutique élevée. Nous pensons avoir réalisé grâce à la méthode de l'Institut Toscano la production sur une grande échelle du sérum antirabique. L'animal idéal pour la production de ce sérum est le mulet; nous avons démontré qu'il a une aptitude beaucoup plus grande que ses parents les juments et les ânes. Plus de 100 mulets ont été soumis à l'hyperimmunisation, tous ont montré un taux d'anticorps remarquable, certains aux dilutions de 1/5 000 à 1/7 000 neutralisant 100 LD 50.

Il nous semble nécessaire d'associer l'antigène tétanique à l'antigène rabique; nous croyons que cette association a un effet synergique. Ce procédé a l'avantage de mettre les sujets mordus par des animaux enragés à l'abri du tétanos; les plaies étant souvent infectées, l'emploi de ce sérum antitétanique est nécessaire.

Nous avons démontré que les anticorps neutralisants sont en grande partie localisés dans la Bêta 2-globuline; il y a un rapport direct entre le taux de cette globuline et le titre antiviral des sérums. Actuellement, nous profitons de ce phénomène au cours de l'immunisation des mulets, ce qui facilite énormément la routine de production du sérum antirabique; on compare le taux de cette globuline avec l'équivalent sur le même sujet avant l'immunisation; quand ce taux atteint un certain niveau, on saigne les animaux.

Nous croyons que les méthodes proposées pour la purification et la concentration du sérum antirabique peuvent être appliquées quand il s'agit de la fabrication à grande échelle du sérum. La méthode enzymatique de Pope qui concentre la g.-globuline n'est pas recommandée; par contre, le fractionnement au sulfate d'ammonium donne des produits très concentrés et purifiés avec un rendement raisonnable (50 à 60%).

RESUME

En appliquant la méthode d'hyperimmunisation de l'Institut Toscano, on arrive à préparer un sérum antirabique de haute valeur protectrice. Le mulet est l'animal de choix, beaucoup plus apte que le cheval ou l'âne à élaborer les anticorps antirabiques.

L'augmentation du taux des anticorps neutralisants a un rapport direct avec l'augmentation du taux de la Bêta 2-globuline dans le sérum sanguin; ainsi l'étude électrophorétique permet-elle aisément de suivre l'évolution de l'hyperimmunisation.

Il semble que l'association des antigènes rabique et tétanique a un effet synergique.

La méthode de choix, pour la purification du sérum antirabique, est le fractionnement au sulfate d'ammonium suivi de la dépigmentation par l'hydroxyde d'alumine. La digestion enzymatique de Pope donne un produit plus pur mais de rendement très bas.

Je remercie mon collègue le D^r A. KOROUR pour sa collaboration précieuse dans l'étude électrophorétique de ce travail.

SUMMARY

Rabies antiserum obtained from mules was found to have a much higher titre than that produced in horses or donkeys under similar conditions. The method of d'ANTONA and FALCHETTI was applied. In mule the rabies antibodies reach their peak titer within a short time after the injection of the antigen.

Electrophoretic studies showed that a component, whose mobility corresponds to that of Bêta 2-globulin appears in the circulation as the result of immunization. For the matter of convenience the relative increase in the Beta 2-globulin peak was taken as a rough estimation of the rabies antiserum, instead of the usual *in vivo* neutralization technique.

The simultaneous injection of tetanus toxoid with that of rabies antigen seems to enhance the formation of rabies antibodies.

Methods for the purification and concentration of the rabies antiserum are discussed. One method consists of salting out with ammonium sulfate followed by depigmentation with aluminium hydroxide. This method is mainly applied in cases of large scale production. The method of enzyme digestion gives a more pure quality, with a poorer yield than that of the salting out ammonium sulfate.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AHUJA (M.L.), D'SILVA (C.B.), BROOKS (A.G.) et THOMAS (A.K.) — *Ind. J. Med. Res.*, 1951, **39**, 433.
- (2) ATANASIU (P.) et coll. — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1956, **14**, 593.
- (3) ATANASIU (P.) et coll. — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1957, **17**, 911.
- (4) BABES (V.) et LEEP (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1899, **3**, 384.
- (5) BABES (V.) et CERCHEZ (Th.). — *Ann. Inst. Past.*, 1901, **5**, 625.
- (6) BALTAZARD (M.), BAHMANYAR (M.) et coll. — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1955, **13**, 747.
- (7) BERKE (Z.) et TURKAY (M.). — *Turk Ijyeni ve Tecrubi Biyoloji Dergisi*, 1955, **15**, 317.
- (8) BORGER. — *Bull. Inst. Past.*, 1910, **8**, 134.
- (9) COVELL (G.), MCGUIRE (J.P.), STEPHENS (E.D.) et LAHIRI (B.N.). — *Ind. J. Med. Res.*, 1936, **24**, 373.
- (10) COVELL (G.) — *Ind. J. Med. Res.*, 1937, **24**, 923.
- (11) CRUVEILHIER (L.) et VIALA (C.). — *Ann. Inst. Past.*, 1937, **59**, 207.
- (12) D'ANTONA (D.) et FALCHETTI (E.). — *VI^e Congrè Intern. Microbiol. Rome*, 1953, **3**, 319.
- (13) D'ANTONA (D.) et FALCHETTI (E.). — *Org. Mond. Santé, Racc. Technique de Lab.*, n^o 23, 1955.
- (14) DELSAL (J.-L.) et MIRCHAMSY (H.). — *Rev. Immunol.* 1953, **17**, 110.
- (15) DEVI (P.), D'SILVA (C.B.) et AHUJA (M.L.). — *Ind. J. Med. Res.*, 1956, **44**, 157.
- (16) D'SILVA (C.B.), BROOKS (A.G.) THOMAS (A.K.) et AHUJA (M.L.). — *Ind. J. Med. Res.*, 1951, **39**, 423.
- (17) ERCEGOVAC (D.T.). — *Acta Vct., Belgrade*, 1952, **2**, 67.
- (18) ESQUIVEL (R.B.), SAFLEITAS (M.J.) ETCHEVERRY (J.B.) et PALATNIK (M.) — *Excerpta Medica*, 1956, **9**, 281.
- (19) FERMI (C.). — *Centralb. f. Bakt.*, 1909, **49**, 452.
- (20) FERMI (C.). — *Centralb. f. Bakt.*, 1909, **52**, 576.
- (21) GERALDA (L.A.). — *J. Immunol.*, 1958, **80**, 198.
- (22) GHODSI (M.). — *Ann. Inst. Past.*, 1947, **73**, 900.
- (23) GOMES (A.). — *Excerpta Medica*, 1958, **11**, 710.
- (24) GREENWOOD (M.). — *Bull. Health Org. League of Nations*, 1946, **12**, 301.
- (25) HABEL (K.). — *Publ. Health Rep.*, 1945, **60**, 545.
- (26) HABEL (K.). — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1954, **10**, 781.
- (27) HABEL (K.) et KOPROWSKI (H.). — *Bull. Org. Mond. Santé.*, 1955, **13**, 773.
- (28) HABEL (K.). — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1957, **17**, 933.

- (29) HOSTY (T.S.), KISSLING (R.E.), SCHAEFFER (M.), WALLACE (G.A.), et DIBLE (E.H.). — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1959, **20**, 1111.
- (30) HOYT (A.), FISK (R.) et MOORE (J.F.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1935, **32**, 1560.
- (31) HOYT (A.), FISK (R.) et MOORE (F.J.). — *J. Inf. Dis.*, 1936, **59**, 152.
- (32) HOYT (A.) et GURLEY (M.K.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1938, **38**, 40.
- (33) ISHI (K.). — *Jap. J. Sci. Biol.*, 1952, **5**, 159.
- (34) JACOTOT (H.). — *Ann. Inst. Past.*, 1947, 73.
- (35) JONNESCO (D.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1145.
- (36) KODRNJA (E.). — *Off. Intern. Epiz.*, 1954, **42**, 122.
- (37) KONDO (S.). — *Jap. J. Vet. Sci.*, 1922, 4.
- (38) KONISH (Y.). — *Excerpta Medica*, 1958, **11**, 826.
- (39) KOPROWSKI (H.). — *Canad. Publ. Health*, 1949, **40**, 60.
- (40) KOPROWSKI (H.), VAN DER SCHEER (J.) et BLACK (J.). — *Amer. J. Med.*, 1950, **8**, 412.
- (41) KOPROWSKI (H.) et COX (H.R.). — *Amer. J. Publ. Health*, 1951, 1483.
- (42) KOPROWSKI (H.) et BLACK (J.). — *J. Immunol.*, 1954, **72**, 85.
- (43) KOPROWSKI (H.). — *Revue technique de Laboratoire, O.M.S., série n° 23*, 1954.
- (44) KRAUS (R.) et HOLOBUT (T.). — *Ztschr. f. Immunol. und Exper. Therap.*, 1909, **3**, 130.
- (45) LEPINE (P.) et ATANASIU (P.). — *Org. Mond. Santé, Technique de laboratoire n° 23*, 1955.
- (46) LOEFFLER (E.) et SCHWEINBURG (F.). — *Wien Klin. Wochenschr.*, 1932, **48**, 813.
- (47) LOEFFLER (E.) et SCHWEINBURG (F.). — *Trop. Bull. Dis.*, 1933, **30**, 140.
- (48) MARIE (A.). — *Bull. Inst. Past.*, 1907, **5**, 404.
- (49) MARIE (A.). — *Ann. Inst. Past.*, 1908, **22**, 271.
- (50) MIRCHAMSY (H.), SOHRAB (V.) et KORUR (A.). — *Rev. Immunol.*, 1958, **22**, 553.
- (51) NIKOLISCH (M.) et FENJE (P.). — *Arch. Hyg. Berlin*, 1957, **141**, 275.
- (52) ORG. MOND. SANTE. — *Rapport technique n° 82*, 1954.
- (53) ORG. MOND. SANTE. — *Rapport technique n° 121*, 1957, **9**, 30.
- (54) PONOMAREFF (A.W.) et TCHECHKOFF (A.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 376.
- (55) PONOMAREFF (A.W.) et SOLOVIEFF (N.N.). — *Ann. Inst. Past.*, 1928, **42**, 1661.
- (56) POPE (C.G.) et STEVENS (M.F.). — *Brit. J. Exp. Path.*, 1951, **32**, 314.
- (57) PROCA (G.), BOBES (S.) et JONNESCO (D.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1001.

- (58) PROCA (G.), BOBES (S.) et JONNESCO (D.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1934, **177**, 133.
- (59) PROCA (G.), BOBES (S.) et JONNESCO (D.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 729.
- (60) PROCA (G.), BOBES (S.) et JONNESCO (D.). — *Bull. Acad. Méd. Roum.*, 1937, **4**, 609.
- (61) REDEWILL (F.H.) et UNDERWOOD (L.J.). — *Calif. Med.*, 1947, **66**, I. — Cité par KOPROWSKI (H.). — *Amer. J. Med.*, 1950, **8**, 412.
- (62) REED (L.J.) et MUENCH (H.). — *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- (63) REMLINGER (P.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1907, **62**, 961.
- (64) REMLINGER (P.). — *Ann. Inst. Past.*, 1948, **74**, 153.
- (65) SELLERS (T.F.). — *Oklahoma Acad. of general Pract.*, 1953, 34.
- (66) SEMPLE. — *3rd Ann. Rep. Past. Inst. India, Kasauli*, 1903, 11.
- (67) SHORTT (J.P.), MCGUIRE, BROOKS (A.G.) et STEPHENS (E.D.). — *J. Med. Res.*, 1935, **22**, 537.
- (68) TIZZONI (G.) et SCHWARZ (R.). — *Naples Méd.*, 1892.
- (69) TORRADO (Y.M.G.) et CRESCINI (A.M.G.). — *16^e Congrès Intern. Vet. Madrid*, 1959, **2**, 631.
- (70) TUNCMAN (Z.M.). — *Application du sérum antirabique en Turquie, Istanbul*, 1953.
- (71) TUNCMAN (Z.M.). — *La valeur du sérum antirabique dans la prophylaxie de la rage, Istanbul*, 1956.
- (72) VEERARAGHAVAN (N.), BALASUBRAMANIAN (A.) et SUBRAHAMANIAN (T.P.). — *Bull. Org. Mond. Santé*, 1957, **17**, 943.
- (73) WANG (S.P.) et LIN (C.C.) — *Formosan Med. Assoc.*, 1957, **56**, 10.
- (74) YEN (C.H.). — *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1942, **49**, 533.