



Malzéville, le 13 Janvier 2023

Production d'un sérum de contrôle positif interne (préparé et caractérisé par le laboratoire) pour la rage

Résumé

Les tests sérologiques antirabiques sont largement utilisés à travers le monde aussi bien dans les laboratoires nationaux que dans les laboratoires privés impliqués dans des activités liées à la rage (notamment les instituts de production de vaccins ou d'immunoglobulines). Les tests sérologiques sont couramment utilisés dans la recherche pour étudier le pouvoir pathogène de diverses souches virales, pour le développement de vaccins et pour des études sur l'immunité. La recherche des anticorps antirabiques est également un outil très utilisé en routine dans de nombreux laboratoires car il permet de déterminer l'immunité des humains et des animaux vaccinés (par exemple pour établir la couverture immunitaire de chiens vaccinés lors des campagnes de vaccination de masse).

La Commission des normes biologiques de l'OMSA coordonne un programme pour la préparation de réactifs de référence internationaux pour les maladies infectieuses animales afin d'harmoniser les méthodes de diagnostics (<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-proposons/produits-veterinaires/reactifs-de-reference/>). Concernant la rage, l'OMSA a approuvé le sérum de référence antirabique positif d'origine canine en 2014 pour promouvoir la reconnaissance mutuelle des résultats

pour les échanges internationaux des carnivores domestiques [1]. Ce réactif a été produit par le laboratoire de l'Anses-Nancy depuis 1991 et est recommandé par l'OMSA pour le titrage des anticorps antirabiques [2]. Dans le protocole décrit dans le Manuel de l'OMSA [2], il est spécifié que "this control serum may be used to calibrate an additional internal control that is used for regular FAVN testing" (le sérum de référence de l'OMSA peut être utilisé pour calibrer un contrôle interne lors des titrages réalisés par le test FAVN). Ce document décrit différentes méthodes de production d'un sérum de contrôle positif interne pour la sérologie rage, calibré (détermination de son titre en anticorps neutralisants) avec le sérum de référence antirabique positif d'origine canine de l'OMSA avant son utilisation.

Les laboratoires produisant un contrôle interne sont invités à avoir des protocoles et procédures très documentés et détaillés. Ils sont également invités à utiliser les mêmes méthodologies [3] lors du remplacement de ces contrôles, afin de garantir une qualité biologique similaire entre les différents contrôles internes produits au cours du temps.

Ce document peut être utilisé pour la production d'un sérum de contrôle positif interne à partir de différentes espèces animales. Par exemple, les méthodes présentées dans les parties A et B du document utilisent le chien comme matrice animale pour la production du sérum de contrôle.

Méthodes de production

Le sérum de contrôle positif interne est destiné à être utilisé pour les titrages de sérums animaux, il doit donc correspondre à un mélange d'anticorps polyclonaux. Différentes méthodes de production sont possibles :

- Immunisation d'animaux utilisés à des fins expérimentales avec différentes souches virales rabiques préalablement inactivées.
- Immunisation d'animaux utilisés à des fins expérimentales avec différents vaccins commerciaux inactivés et adjuvés.
- Mélange de prélèvements de sérums obtenus d'animaux vaccinés contre la rage (une seule espèce animale) issus du terrain.

L'objectif étant l'obtention d'un sérum de contrôle à large spectre antigénique, il est important que la production à partir d'animaux en conditions expérimentales utilise différentes souches de virus rabique ou différents vaccins.

Quelle que soit la méthode de production, certains aspects importants devront être considérés :

- Les animaux utilisés pour la production (de terrain ou gardés en conditions expérimentales) doivent tous être de la même espèce (par exemple, uniquement des renards immunisés pour une production à partir de cette espèce ; mélange de sérums issus uniquement de chiens de terrain vaccinés).

- Des volumes importants devront être préparés, aliquotés et stockés dans des conditions appropriées afin de conserver les qualités biologiques du sérum de contrôle dans le temps [3].
- Si le laboratoire choisit d'utiliser des animaux en conditions expérimentales pour la production, il doit détenir toutes les autorisations et équipements nécessaires pour l'expérimentation animale. Les protocoles doivent alors être approuvés par un comité d'éthique *ad hoc*, et les installations enregistrées et régulièrement inspectées.
- Il est recommandé de stocker le sérum de contrôle sous un format non dilué et de préparer les dilutions de travail de façon extemporanée [3]. Il convient de viser, pour le sérum de contrôle, un titre final en anticorps neutralisants d'environ 10 UI/mL.
- Les techniques utilisées par le laboratoire devront être celles recommandées par l'OMSA [2].
- Les titrages d'anticorps neutralisants réalisés lors des différentes étapes de production devront être faits en employant le sérum de référence positif d'origine canine de l'OMSA comme contrôle positif. Cela permettra d'établir la teneur en UI de chaque échantillon de sérum testé.

A Production du sérum de contrôle sur des animaux en conditions expérimentales

Le sérum produit devra être représentatif de la variabilité antigénique des souches virales et de l'utilisation spécifique prévue par le laboratoire.

Par exemple, si l'objectif du sérum de contrôle est de servir de contrôle positif pour titrer des sérums de terrain d'un pays particulier ou d'une région particulière, il est recommandé d'immuniser des chiens avec différents isolats du virus rabique (RABV) circulant dans le pays ou dans la zone géographique à couvrir. Un maximum de trois souches de virus représentatives de la diversité antigénique sont inactivées et utilisées pour l'étape d'immunisation des animaux. Plusieurs groupes d'animaux sont alors constitués, de deux à quatre animaux par groupe, chaque groupe recevant une souche spécifique de RABV inactivée.

Si le sérum de contrôle est destiné à être employé pour des titrages de sérums de carnivores domestiques dans le cadre des échanges internationaux, il est alors recommandé d'immuniser les animaux avec trois vaccins antirabiques monovalents commerciaux. Le meilleur moyen de mimer la variabilité des déterminants antigéniques est d'employer des vaccins contenant des souches virales différentes (par exemple, les souches Pasteur Virus (PV), Pitman Moore (PM) et Flury Low Egg passage (Flury LEP), qui sont les plus fréquemment utilisées) pour obtenir une réponse polyclonale à large spectre. Plusieurs groupes d'animaux sont constitués, de deux à quatre animaux par groupe, chaque groupe recevant un vaccin dédié.

1 Animaux

Des chiens exempts d'agents pathogènes et naïfs pour la rage sont hébergés dans des installations expérimentales adaptées, dans des cages individuelles ou tous ensemble et surveillés régulièrement, au moins une fois par jour pendant leur alimentation [1]. Ils sont identifiés et vermifugés. Les animaux sont divisés au hasard en différents groupes. Tout événement inhabituel est enregistré.

2 Sélection et préparation des antigènes/vaccins

Les isolats sélectionnés pour l'immunisation correspondent au cerveau ou aux glandes salivaires d'animaux naturellement infectés. Il est nécessaire de les passer sur souris ou de préférence sur cellules (cellules de neuroblastome (ATCC CCL131) et cellules BHK21 C13 (ATCC CCL10)). Les méthodes classiquement utilisées comportent un ou plusieurs passages sur cellules, puis concentration des récoltes par centrifugation, puis inactivation et contrôles qualité (par exemple, contrôles de pureté, de concentration de protéines, etc...). Les protocoles peuvent varier selon les équipements et les installations du laboratoire, ils sont décrits en détail au préalable [voir 4].

Les vaccins vétérinaires antirabiques inactivés et adjuvés sélectionnés pour l'immunisation doivent être testés pour leur activité par le test NIH [5], et ce avant d'être utilisés. Ils doivent contenir au moins une unité antigénique par dose, conformément aux recommandations internationales. Les différentes doses d'un vaccin particulier doivent tous avoir le même numéro de lot.

3 Immunisation des animaux

Un prélèvement sanguin doit être réalisé sur tous les chiens avant leur immunisation afin de vérifier leur statut sérologique naïf pour la rage. Chaque chien d'un groupe particulier est immunisé avec la même suspension d'antigène ou avec le même vaccin.

Les immunisations avec des antigènes nécessitent l'utilisation d'adjuvant de Freund complet ou incomplet mélangé avec l'antigène (volume/volume). L'injection doit se faire par voie sous-cutanée (2 mL) en plusieurs points sur les flancs de chaque chien. Les immunisations avec les vaccins sont réalisées de préférence par voie intramusculaire (1 mL) et nécessitent trois injections (par exemple à J0, puis semaine 3 et semaine 5) [1]. La cinétique de la réponse en anticorps neutralisants est suivie sur des prélèvements sanguins réalisés sur tous les chiens quelques jours après chaque injection.

4 Récolte du sérum

Les chiens sont anesthésiés et un cathéter est installé chirurgicalement dans l'artère carotide pour recueillir le sang dans des tubes secs stériles [1]. Après coagulation, les tubes sont centrifugés, les différentes récoltes de sérum de chaque chien sont mélangées et filtrées, puis des contrôles qualité

sont effectués [1]. Avant de congeler (à -20°C) les pools, plusieurs aliquots sont conservés pour le titrage des anticorps antirabiques.

Une fois le titre neutralisant de chaque récolte (issue de l'immunisation avec chaque antigène ou avec chaque vaccin) établi, le sérum de contrôle interne est préparé de manière à ce qu'il contienne le même nombre d'UI de chaque antigène ou de chaque vaccin, afin d'atteindre un équilibre pour les différents antigènes/vaccins utilisés dans la préparation [1]. Le sérum de contrôle interne est ensuite inactivé (par la chaleur) et congelé (à -20°C) après prélèvement d'un aliquot pour titrer les anticorps antirabiques. Le titre final du sérum est déterminé en utilisant le sérum de référence de l'OMSA comme contrôle positif. Le sérum congelé est ensuite soit lyophilisé [1] en petits aliquots soit conservé congelé, également en petits aliquots. Après lyophilisation ou congélation, certains aliquots sont testés au hasard pour vérifier l'homogénéité du lot produit et la teneur en anticorps antirabiques. Chaque aliquot devra contenir environ 10 UI/mL, correspondant au titre final visé. Plusieurs contrôles qualité doivent être effectués (tests de stérilité, détection des mycoplasmes et stabilité) [1].

B Production du sérum de contrôle par mélange (pool) de sérums de chiens vaccinés

Pour les laboratoires qui stockent, dans des conditions appropriées, de grandes quantités de sérums individuels de chiens vaccinés (par exemple, les prélèvements reçus pour les titrages sérologiques dans le cadre des échanges internationaux), l'OMSA accepte le principe de produire un contrôle issu d'un seul animal ou d'un pool d'échantillons provenant de différents animaux [3]. Il est préférable d'utiliser plusieurs animaux pour le mélange des sérums afin de mimer au mieux la réponse du terrain et la qualité biologique au niveau d'une population animale plutôt que d'un seul animal (la variété des épitopes, due à l'utilisation de différents vaccins chez ces animaux, induit une plus grande diversité des paratopes dans le mélange).

Un nombre assez élevé de sérums ayant un titre sérologique antirabique connu supérieur à 5 UI/mL doit être sélectionné pour constituer un mélange avec un grand volume. Une fois le mélange obtenu, il doit être filtré, inactivé par la chaleur et congelé (à -20°C) après avoir prélevé des aliquots pour des titrages d'anticorps antirabiques. Le pool doit être titré plusieurs fois en utilisant le sérum de référence de l'OMSA comme contrôle positif pour déterminer si le titre (en UI/mL) se situe dans la gamme attendue. Ensuite, le sérum de contrôle interne peut être soit lyophilisé en petits aliquots, soit stocké congelé, également en aliquots. Après lyophilisation ou congélation, certains aliquots sont testés au hasard pour vérifier l'homogénéité du lot produit et la teneur en anticorps antirabiques. Plusieurs contrôles qualité doivent être effectués sur le pool (tests de stérilité, détection de mycoplasmes et stabilité) [1].

Le titre en anticorps neutralisants du sérum de contrôle positif interne est déterminé à l'aide de l'une des deux techniques recommandées par l'OMSA (test FAVN ou RFFIT) [2] et à l'aide du sérum de référence positif antirabique de l'OMSA. Ce sérum de référence est dilué en série pour préparer une gamme d'étalonnage. Une courbe de corrélation est obtenue entre les anticorps neutralisants déterminés par les dilutions et les données expérimentales obtenues (logarithme de la dilution montrant une inhibition de 50% (logD50) des puits ou des champs positifs) [1, 6]. Une dizaine de tests sérologiques sont réalisés indépendamment, et pour chaque test, les dilutions en série du sérum de référence de l'OMSA sont testées ainsi que plusieurs titrages (au moins 5) du sérum de contrôle interne. Pour chaque test, la moyenne des 5 valeurs de logD50 est calculée et son titre en UI/mL est déterminé en utilisant la gamme d'étalonnage du sérum de référence de l'OMSA. Puis la moyenne en UI/mL est calculée à partir des résultats des 10 tests sérologiques.

Une autre façon de déterminer le titre final du sérum de contrôle consiste à le titrer plusieurs fois (entre 30 et 50 fois), dans de bonnes conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Pour chaque test, le titre du sérum de contrôle (en UI/mL) est calculé en utilisant le sérum de référence de l'OMSA comme contrôle positif. La moyenne géométrique des titres UI/mL est ensuite calculée pour déterminer le titre final du sérum de contrôle.

Quelle que soit la méthode utilisée, une fois le titre final établi, la dilution théorique pour atteindre le titre théorique de 0,5 UI/mL doit être définie. Il est fortement recommandé d'évaluer cette dilution théorique, établie pour atteindre 0,5 UI/mL, avant de l'utiliser en routine.

Bibliographie

1. Wasniewski M, Barrat J, Fooks AR, Franka R, Müller T, Sabeta C, Cliquet F. Production and calibration of the second batch of OIE anti-rabies positive reference serum. Rev Sci Tech. 2017 Dec;36(3):779-788. doi: 10.20506/rst.36.3.2713. PMID: 30160702.
2. World Organisation for Animal Health (WOAH). 2018. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 3.1.18, Rabies (Infection with rabies virus and other Lyssaviruses). WOA, Paris. Available at : https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf
3. World Organisation for Animal Health (WOAH). 2018. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.2.6, Selection and use of reference samples and panels. WOA, Paris. Available at : https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.06_REFERENCE_SAMPLES.pdf
4. Laboratory Techniques in Rabies. 1996. 4th edn. Edited by Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski H. World Health Organization, Geneva. file:///C:/Users/f.cliquet/Downloads/9241544791_eng.pdf

5. Laboratory Techniques in Rabies. 2018. Volume 2. Edited by Rupprecht, C.E., Fooks, A.R., Abela-Ridder. World Health Organization, Geneva.
<file:///C:/Users/f.cliquet/Downloads/9789241515306-eng.pdf>
6. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. J Immunol Methods. 1998 Mar 1;212(1):79-87. doi: 10.1016/s0022-1759(97)00212-3. PMID: 967115

Autrices: Cliquet Florence et Wasniewski Marine