

Réaction de fixation du complément. Application au virus rabique

par J. P. SOULEBOT, H. G. PETERMANN, R. BRANCHE,
R. LANG et C. MACKOWIAK

I. — Préparation d'un sérum hyperimmun

L'utilisation de la réaction de fixation du complément nécessite, dans un stade préliminaire, la préparation d'un sérum hyperimmun satisfaisant. Un grand nombre de techniques et de types de sérums ont été employés pour appliquer cette réaction au virus rabique. On en trouvera un résumé dans le tableau publié par BINDRICH et KUWERT (4), qui peut être complété par des éléments du tableau I.

Les expérimentateurs utilisent en général des sérums provenant d'animaux hyperimmunisés, mais ils ont parfois recours à ceux d'individus vaccinés. Ils se sont adressés au cobaye, au chien, au cheval, au lapin, à la souris ainsi qu'à l'homme. Bien que l'hyperimmunisation soit effectuée habituellement avec du virus virulent, les titres des anticorps fixant le complément, souvent non précisés par les auteurs, sont en général faibles. Les sérums sont employés couramment dilués au 1/5 ou au 1/10 comme par exemple dans le cas du sérum préparé selon la technique particulière proposée par WITTMANN (86).

Par contre, l'emploi pour l'immunisation d'antigènes préparés à partir de tissu cérébral provoque, même dans le cas de simple vaccination, l'apparition d'anticorps anti-tissulaires fixant le complément à un titre élevé (46).

Après avoir précisé matériel et méthodes utilisés, nous allons décrire une technique nouvelle qui nous a donné de bons résultats.

MATÉRIEL

1. — *Virus utilisés pour l'hyperimmunisation :*

a) Virus fixe, souche CVS (*), représenté par des cerveaux de cobayes, récoltés au moment de la phase agonique, après inoculation

(*) Challenge Virus Standard.

TABLEAU 1

| Auteurs | Espèce | Voie | Vol. ml | Nb | Intervalle | Antigène (p. 100 cerveau) | Résultat (Titres ou dilutions d'emploi) |
|-------------------------------|------------------|-------|---------|-------------|-----------------------|---|--|
| ANDO et Coll. (1-2) | cobaye | IP | 2 | 8 | 1 semaine | 10 p. 100 inactivé UV puis rues inactivé | 1/16-1/32 |
| BINDRICH et KUWERT (4) | cobaye | IP-IM | 2 | 10 | 4 jours | traité CHCl ₃ | négatif |
| | lapin | IP-IM | 5 | 10 | 4 jours | — | 1/5-1/10 |
| | chien | IP-IM | 20 | 10 | 4 jours | — | 1/5-1/10 |
| BULLING (10) | lapin | IM | 1 | jusqu'à 100 | 1 semaine | virus vivant ou inactivé | 1/8-1/64 |
| CAPPONI, SUREAU (12) | cobaye lapin | | 5 | > 18 | 1 jour puis 1 semaine | virus rues tué puis vivant, vaccin phéniqué | |
| DEPOUX et MERVEILLE (15) | cobaye lapin | SC | 2 | 12 | 2 semaines | 10 p. 100 lapin 8 injections inactivé 4 injections virulent | négatif indice de protection 3,2 log. Titre FC' ? |
| EICHWALD (16) | divers | | | | | | 1/5 (enquête sérologique chez les vaccinés) |
| VAN DEN ENDE et Coll. (18-36) | souris | IP | 0,5 | 5 | | 10 p. 100 | 960 fixation hémolyse 50 p. 100 avec 1 concentration d'Ag titre SN = 3,8-20 DL ₅₀ |
| | souris | SC | 0,25 | 1 ou n | 10 jours | virus et ou Ag soluble inactivé avec adjuvant | 60-320 mêmes conditions 1,5-2,5 en SN |
| | lapin | SC | 1 | 3 | 3 à 4 jours 1 mois | — | 60-1920 mêmes conditions mais forte réaction avec témoins 0-3,5 en SN |
| FALKE, UHLMANN (22) | souris | IP | 0,2 | 8 | 10,6 puis 4 jours | cerveau souris 1/100, 2 injections avec Arlcel | dilution d'emploi 1/5 |
| | | | 0,4 | | | | |
| FORREST et CAMPION (25) | cheval cobaye | SC | 1 | 8 | 6 jours | vaccin Kelsner | Pur — 1/2 1/5 |

| | | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------|----------|-------------|-------------------------|--|---|
| | cobaye | IP SC | 0,5 1 | 7 | 6 jours | vaccin Fermi puis virus CVS | 1/10 |
| HEINIG (32) | cheval chien | | | | | | 1/10 |
| LINSERT (49) | chien | | | | | | 1/8 |
| MEAD (55) | souris | IP | 0,2 | 10-13 | 3-4 jours | 10 p. 100 souris, pour première inoculation inactivé par formol | |
| OSOLINA (63) | chien | | | | | | 1/4-1/5 |
| SCHINDLER (69-70) | cobaye | 4 IP 4 IM | 0,5 | 8 | 1 semaine | 10 p. 100 2 injections inactivé 6 injections virulent | 1/8 |
| SETHNA, SOMAN (72) | cobaye ♂ 400 g | IP | 2 | 8 | 1 semaine | cerveau cobaye à 10 p. 100 inactivé puis virulent | 1/16 (sérums ayant titre inférieur rejetés) |
| | lapin | IP | 2 | 2-3 | 1 semaine | cerveau à 10 p. 100 inactivé puis virul. | titres trop faibles |
| | | IP | 3 | 2-3 ou + | 3-4 jours | 10 p. 100 cerveau non infecté | témoin négatif : négatif |
| | cobaye | IP | 2 | — | — | — | — |
| SINGH et Coll. (75) | souris | SC IP | 0,25 | 11 | 3 semaines puis 3 jours | suspension cerveau homologue, inacti. puis virulente | 1/16 |
| | cobaye | IP | 1 | 11 | 1 semaine puis 3 jours | — | 1/16 |
| SIKES (74) THOMAS (78) | homme | | | | | | titre SN 1/32 |
| THOMPSON (80) | cheval | | | | | | 1/640 Ag traité protéase nul : Ag normal |
| UEKI (82) | cobaye | IP | 2 | 4 | 1 semaine | 10 p. 100 cerveau cobaye inactivé UV | |
| WITTMANN (86) | cobaye | | 1-0,5 | 8 | 1 semaine | 10 p. 100 cerveau traité par CHCl ₃ puis arcton, non inactivé | 1/10 SN : 2,15 |
| WOLTER (87) | cheval | | | | | | 1/10 |

par voie intracérébrale de virus CVS stock, produit sur cerveau de souris.

b) Virus fixe, adapté et multiplié en culture de cellules (8, 47, 64, 65, 85). Ce type de virus n'a été utilisé qu'après sa transformation en vaccin.

2. — *Virus utilisé comme antigène pour les titrages :*

Souche de virus fixe, adaptée et multipliée en culture cellulaire (8, 47, 64, 65, 85).

Ce virus avant utilisation est débarrassé de tout débris cellulaire par centrifugation.

Les conditions de récolte et de conservation sont toujours identiques.

3. — *Agent d'inactivation :*

Bêta-propiolactone (23, 52).

4. — *Globules rouges :*

Suspension à 2 p. 100 de globules rouges de moutons (*).

5. — *Sérum hémolytique :*

Sérum hémolytique du commerce (**).

6. — *Complément :*

Complément commercialisé (**) sous forme lyophilisée.

7. — *Diluant pour sérologie de fixation du complément :*

Tampon Mayer-Lévine de formule classique (54, 68).

8. — *Diluant pour séroneutralisation ou titrage d'infectiosité :*

Eau distillée additionnée de 5 p. 100 de sérum de veau, dont on a vérifié au préalable l'absence d'inhibiteurs par neutralisation (62).

(*) B. D. Mérieux, 69-Marcy-L'Etoile, France.

(**) Institut Pasteur, Paris, France.

9. — *Souris* :

Souris mâles ou femelles pesant environ 14 grammes.

A l'origine ont été utilisés des animaux de souche NMRI, ensuite des souris de souche CF1 (*).

Les essais comparatifs effectués n'ont pas permis de mettre en évidence une différence de sensibilité entre ces deux souches.

10. — *Cobayes* :

Cobayes de race Albinos, pesant 500 grammes ou plus, provenant de notre élevage.

MÉTHODES

1. — *Titrages du sérum hémolytique et du complément* :

Ils sont effectués selon la technique classique (11), en dehors de la présence de l'antigène.

2. — *Titrage des anticorps fixant le complément* :

Les anticorps sont titrés par la méthode de BOERNER LUCKENS (7) selon un schéma en damier, avec dilution d'antigène et d'anticorps. L'antigène est représenté par un virus produit sur culture de cellules.

Les dilutions sont effectuées de 2 en 2 pour l'antigène et comme indiqué sur les tableaux pour le sérum.

Les volumes mis en présence sont de :

0,5 ml d'antigène ou de couple hémolytique,
0,25 ml de sérum ou de complément (2, 6 unités).

Le temps de fixation et le temps d'hémolyse, au bain-marie à 37° sont de 30 minutes. Les réactions sont lues et on retient l'absence d'hémolyse notée + + + +.

Si l'antigène est suffisamment riche on observe un optimum de la réaction.

Le titre sérique est l'inverse de la dilution de sérum correspondant à cet optimum. Un exemple de titrage est donné dans le tableau 2, d'où il résulte que la réaction présente un optimum pour une dilution de l'antigène de 1/8 et une dilution de sérum de 1/80. Le titre sérique est 80.

(*) IFFA-CREDO, 69-Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France.

3. — *Titrage des anticorps neutralisants sur souris :*

Ils sont titrés selon la technique classique (62) en mettant en présence des dilutions de sérums de raison 4 et une quantité fixe de virus telle que les souris reçoivent 100 DL₅₀ théoriques avant neutralisation.

Le titre d'un sérum est exprimé par le logarithme base 10 de l'inverse de la dilution de ce sérum, qui protège 50 p. 100 des animaux.

On tient compte de la dilution apportée par la mise en présence du virus et du sérum en volumes égaux.

4. — *Conservation des sérums :*

Ils sont conservés congelés à — 20° ou lyophilisés.

TECHNIQUE D'HYPERIMMUNISATION

Les techniques de préparation des sérums que nous allons décrire, ont été inspirées par celle proposée par GILBERT et ses collaborateurs (28).

Nous avons choisi d'utiliser le cobaye, qui fournit des sérums actifs et dépourvus de pouvoir anticomplémentaire.

Dans le but d'obtenir des sérums de titre élevé, nous avons été amenés à espacer les inoculations de doses massives de virus, et à utiliser un adjuvant. L'inoculation de ces doses massives nous a conduits à utiliser exclusivement du virus inactivé à la suite des premiers essais ; pour éviter tout accident lors des manipulations, et la mortalité consécutive à l'inoculation du virus chez le cobaye.

Deux antigènes ont été employés pour l'hyperimmunisation :

- suspension de cerveau de cobaye,
- vaccin inactivé produit sur culture de cellules (64).

Le protocole ci-dessous a été suivi dans les deux cas :

1. — *Préparation de l'antigène :*

1. 1. — Suspension à 10 p. 100 de cerveau de cobaye récolté au cours de la phase agonique, après inoculation par voie intracérébrale de virus fixe. Ce virus est inactivé par la bêta-propiolactone à la concentration de 1/2.000 pendant 2 heures à 37°, le pH étant maintenu à 7, 2 (23-52).

1. 2. — Vaccin antirabique inactivé produit sur culture de cellules et lyophilisé (64).

2. — *Adjuvant* :

On inocule 12 milliards de germes vivants de BRUCELLA B 19 (*) (28) par cobaye lors de la première injection.

3. — *Volume et voie d'inoculation* :

On répartit 10 ml de la suspension de cerveau entre les 3 voies, sous-cutanée, intramusculaire et intrapéritonéale ou de la même manière, 6 ml de vaccin produit sur culture de cellules.

4. — *Nombre et espacement des inoculations* :

4 injections à 1 mois d'intervalle environ.

5. — *Saignée* :

A blanc, par ponction cardiaque 5 ou 6 jours après la dernière inoculation.

RÉSULTATS

1. — *Spécificité des sérums* :

Si on compare la spécificité des deux sérums, en les faisant réagir avec un antigène témoin constitué par un extrait de culture de cellules non infectées, on s'aperçoit (Tableau II) que le sérum préparé à partir de suspension de cerveau ne donne aucune réaction, tandis que celui préparé avec le vaccin inactivé (Tableau III) réagit lorsqu'il est très peu dilué.

Cependant, cela ne présente pas d'inconvénient, pour deux raisons :

— le sérum est à utiliser à la dilution de 1/40, tandis que la réaction non spécifique disparaît pour une dilution supérieure à 1/20.

— Il est possible d'éliminer pratiquement toute réaction non spécifique (Tableau IV) en traitant le sérum par une suspension cellulaire concentrée.

(*) Vaccin Aborsec, Institut Mérieux, Lyon, France.

TABLEAU II

*Titration d'un sérum obtenu par hyperimmunisation
à l'aide d'une suspension de virus inactivé provenant de cerveau de cobaye*

| Ac \ Ag | 1/10 | 1/20 | 1/30 | 1/40 | 1/50 | 1/60 | 1/80 | 1/100 | 1/150 | 1/200 | 1/300 |
|---------|-------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1/2 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++± | ++++ | ± | 0 | 0 |
| 1/4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++++ | ++++ | ± | trace | 0 |
| 1/8 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++++ | ++++ | ++ | ± | 0 |
| 1/16 | +++ | ++± | | ++ | ++ | ±± | ±± | + | ± | trace | 0 |
| 1/32 | + | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/64 | trace | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

T. Ag

T. Sérum 0

T. C'

T. GR ++++

Témoin réaction antigène cellulaire-sérum hyperimmun = 0.

TABLEAU III

*Titrage d'un sérum obtenu par hyperimmunisation à l'aide d'un vaccin inactivé produit sur culture de cellules
Sérum non traité par une suspension cellulaire correspondante*

a) avec un antigène rabique produit sur culture de cellules

| Sérum Ag | 1/10 | 1/20 | 1/30 | 1/40 | 1/50 | 1/60 | 1/80 | 1/100 | 1/120 | 1/160 | 1/180 | 1/200 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1/2 | ++++ | ++++ | ++++ | +++± | ++ | ±± | ± | trace | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | + | trace | 0 | 0 | 0 |
| 1/8 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | ±± | trace | 0 | 0 |
| 1/16 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++± | ++ | + | trace | 0 |
| 1/32 | ++++ | +++± | +++± | +++± | +++± | +++ | ±± | ±± | + | ± | trace | 0 |
| 1/64 | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

b) avec un antigène cellulaire

| Ac Ag | 1/10 | 1/20 | 1/30 | 1/40 | 1/50 | 1/60 | 1/80 |
|----------|------|-------|-------|------|------|------|------|
| Pur | ++++ | +++± | trace | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/2 | ++++ | +++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/4 | ++++ | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/8 | ++++ | trace | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/16 | +++± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1/32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Ce traitement peut être effectué par exemple en mettant en présence, 1 h 30 au bain-marie à 37°, 10 millions de cellules par millilitre de sérums, les cellules sont ensuite éliminées par centrifugation.

TABLEAU IV

*Titrage d'un sérum obtenu par hyperimmunisation à l'aide d'un vaccin inactif produit sur culture de cellules
Sérum traité par la suspension cellulaire correspondante*

a) avec un antigène rabique produit sur culture de cellules

| Ac \ Ag | 1/10 | 1/20 | 1/30 | 1/40 | 1/50 | 1/60 | 1/80 | 1/100 | 1/120 | 1/160 |
|---------|-------|-------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| 1/2 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | trace | trace | 0 | 0 |
| 1/4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | + | 0 | 0 |
| 1/8 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | + | 0 |
| 1/16 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | | | |
| 1/32 | ++++ | +++ ± | +++ | +++ | +++ ± | ++ | trace | 0 | 0 | 0 |
| 1/64 | +++ ± | trace | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Témoin Ac, T. Ag, TC' = 0

Témoin GRSH + + + +

b) avec un antigène cellulaire

| Sérum \ Ag | 1/10 | 1/20 | 1/30 |
|------------|-------|------|------|
| Pur | + ± | 0 | 0 |
| 1/2 | trace | 0 | 0 |
| 1/4 | 0 | 0 | 0 |

Témoin Ac, T. Ag, TC' = 0

T GRSH + + + +

2. — *Activité des sérums :*

Elle est résumée dans le tableau V. Le titre en fixation du complément atteint 80 dans nos conditions, et le titre neutralisant 4, 5.

3. — *Réaction provoquée par l'hyperimmunisation :*

Aucune réaction n'est provoquée par l'hyperimmunisation à l'aide du vaccin produit sur culture de cellules. On observe par contre 70 p. 100 de mortalité par choc consécutif à l'emploi de suspension de cerveau.

TABLEAU V
Sérum hyperimmun produit sur cobaye

| Antigène | Suspension de cerveau inactivée | Vaccin inactivé produit à partir de cellules (*) |
|--|---------------------------------|--|
| Volume inoculé lors de chacune des 4 recharges | 10 ml | 6 ml |
| Titre fixation du complément.. | 80 | 80 |
| Titre neutralisant | 4,5 ± 0,25 | 4,2 ± 0,20 |
| Mortalité en cours d'immunisation | 70 p. 100 | 0 p. 100 |

(*) Rabiffa.

Titre neutralisant des sérums hyperimmuns de cheval ou de mulet = 3 à 4,2.

CONCLUSIONS

Il est possible de préparer chez le cobaye des sérums hyperimmuns antirabiques de titres très élevés, égaux ou supérieurs en neutralisation à ceux des meilleurs sérums de chevaux ou de mulets (58). Ces sérums sont spécifiques et dépourvus de pouvoir anticomplémentaire. Le mode de préparation de choix fait appel à l'emploi, comme antigène, d'un vaccin antirabique inactivé produit à partir de culture de cellules. Aucune mortalité n'est alors observée, tandis que l'utilisation d'une suspension de cerveau inactivée entraîne 70 p. 100 de mortalité, qui se produit souvent par choc dans les heures qui suivent les différentes inoculations.

* * *

II. — Utilisation pour le titrage des antigènes rabiques produits sur culture de cellules

La réaction de fixation du complément, peu de temps après sa découverte fut appliquée aux antigènes rabiques puisque c'est à 1907 que remontent les premiers travaux (27,33). Dès lors, c'est essentiellement dans le but de mettre au point une méthode pratique de diagnostic que les recherches furent poursuivies, avec des fortunes diverses.

Ce sont surtout les travaux d'ANDO et ses collaborateurs (1, 2) qui provoquèrent un nouvel intérêt pour la méthode. BINDRICH et KUWERT (4) donnent un tableau résumant différents essais effectués jusqu'en 1956 dont nous rappelons les références (1, 2, 6, 9, 13, 15, 19, 20, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 53, 57, 60) auxquelles on ajoutera maintenant les suivantes (3, 4, 5, 10, 12, 21, 22, 24, 25, 32, 36, 37, 44, 49, 63, 69, 72, 87) tandis que des méthodes sont décrites dans les traités classiques (48, 76).

Cependant, la réaction a été aussi utilisée à d'autres fins :

- recherche des anticorps après vaccination (16, 17, 36) ou hyperimmunisation (14, 73),
- mise en évidence de la présence de l'antigène dans un vaccin purifié (74, 78),
- étude de l'effet des substances adjuvantes (26, 50),
- recherches d'éventuelles parentés antigéniques (45, 59),
- étude de la nature ou du comportement des composants du virus rabique (18, 36, 43, 55, 56, 70).

C'est dans un but très différent que nous avons repris ces études : nous avons à élaborer un nouveau type de vaccin (64). Ce travail nécessitait l'utilisation de méthodes pratiques et rapides de titrage des antigènes, problème que la réaction de fixation du complément devait nous permettre de résoudre.

Plus haut nous avons décrit la méthode d'obtention du sérum hyperimmun et montré sa spécificité ; reste à exposer son utilisation dans la réaction de fixation du complément et à étudier les paramètres reliant le titre infectieux au titre de l'antigène fixant le complément.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ils ont été décrits précédemment à l'exception de la méthode de titrage de l'antigène fixant le complément et de celle du titrage d'infectiosité que nous rapportons ci-après.

1. — *Titration de l'antigène fixant le complément :*

La réaction utilisée est une réaction semi-quantitative dérivée de KOLMER (11). Les volumes mis en présence des différentes dilutions sont :

- 0,5 ml pour l'antigène et le couple hémolytique,
- 0,25 ml pour le sérum et le complément.

Des dilutions de virus de 2 en 2 réagissent avec une quantité fixe de sérum (2 unités sériques) titré au préalable et avec 2,6 unités de complément.

Après un temps de fixation d'une demi-heure au bain-marie à 37° le couple hémolytique est ajouté. L'hémolyse se fait de la même manière que la fixation.

La lecture est effectuée.

Le titre de l'antigène fixant le complément est représenté par l'inverse de la plus haute dilution de cet antigène qui, dans ces conditions, fixe tout le complément : absence d'hémolyse notée ++++.

On utilise pour les calculs le logarithme base 10 de cet inverse.

La réaction est accompagnée de tous les témoins nécessaires : témoins antigènes, anticorps, complément, globules rouges et couple hémolytique.

Elle n'est lue que lorsque tous ces témoins sont satisfaisants.

2. — *Titration d'infectiosité :*

Des dilutions croissantes de virus sont inoculées à des groupes de souris par la voie intracérébrale à la dose de 0,03 ml. Les animaux sont observés le lendemain de l'inoculation, puis *quotidiennement* du 5^e au 14^e jour après l'inoculation. Les signes cliniques de rage observés, la mort ou le sacrifice des animaux sont notés chaque jour.

Le calcul du titre est effectué par la méthode de LITCHFIELD (51), dont les avantages ont été discutés par ailleurs (77).

Elle permet en particulier, pour chaque titrage, de juger de son

homogénéité ou de son hétérogénéité, et de calculer rapidement la précision obtenue qui est généralement de l'ordre de $\pm 0,4$ log.

Les titres sont exprimés par le logarithme base 10 du nombre de DL_{50} contenues dans 1 millilitre.

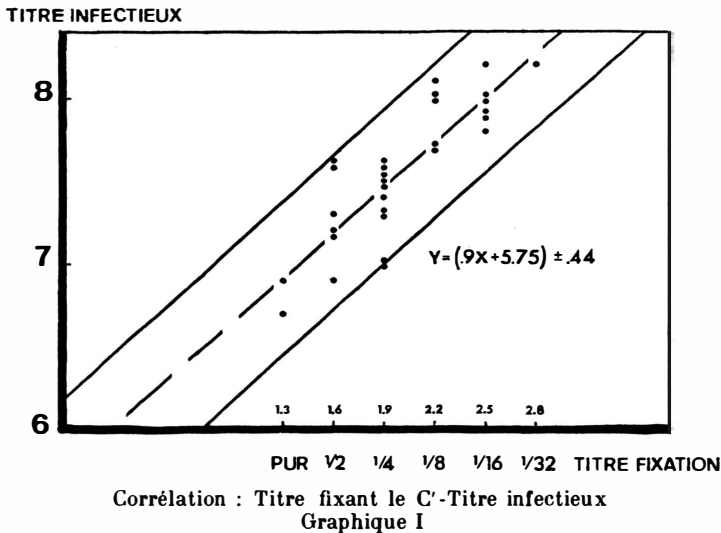
3. — *Calculs statistiques des corrélations :*

Les calculs de corrélations sont effectués, selon le programme établi par le Service de Calcul de notre Institut, sur calculateur électronique (*).

RÉSULTATS

L'existence et la spécificité de la réaction ont tout d'abord été mises en évidence, en s'entourant de tous les témoins nécessaires. En particulier nous avons vérifié l'absence de réaction du sérum mis en présence d'un antigène cellulaire préparé de la même manière que l'antigène antirabique.

Alors, 30 lots de virus rabique différents, produits sur culture de cellules, dans des conditions voisines, récoltés et conservés de manière identique ont été titrés chez la souris et par la réaction de fixation du complément.



(*) Programma Olivetti 101.

L'analyse statistique des résultats obtenus montre qu'il existe *dans ces conditions* une corrélation hautement significative ($r = 0,8478$) entre ces deux paramètres (71).

L'équation représentant cette corrélation est $y = (5,75 + 0,9 x) \pm 0,44$.

Ces résultats sont représentés par le graphique I et sont reportés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Titre en antigène fixant le complément et titres infectieux correspondants

| Titre en antigène fixant le complément | Inverse de la dilution | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
|---|---|------------|--|--|-----------------------------|------------------------------------|-----|
| | log de l'inverse de la dilution $\times 20$ (*) . . . | 1,3 | 1,6 | 1,9 | 2,2 | 2,5 | 2,8 |
| Nombre d'échantillons différents testés | | 2 | 6 | 10 | 5 | 6 | 1 |
| Titres infectieux sur souris correspondants. (log 10 nombre de DL ₅₀ /ml) | | 6,9 6,7 | 7,6 7,2 7,3 7,2 6,9 7,6 | 7,5 7 7,5 7,6 7,4 7,3 7 7,6 7,5 7,3 | 8 8,1 7,7 8 7,7 | 8 8 8,2 7,9 7,8 7,9 | 8,2 |

(*) Pour faciliter les calculs, on utilise le log de l'inverse de la dilution, inverse que multiplie 20.

Il faut souligner que l'inactivation du virus par la bêta-propionolactone (23, 47, 52, 64) supprime tout pouvoir infectieux, tout en ne modifiant pas le comportement des antigènes dans la réaction de fixation du complément. Il est évident que dans ces conditions il n'y a plus aucune corrélation entre les deux titres.

DISCUSSION

1. — *Conditions d'existence de la corrélation :*

Nous venons de montrer qu'il peut exister une corrélation entre les titres infectieux et fixant le complément. Ceci avait déjà été établi par KUWERT (42) pour 4 souches différentes de virus rabique, multipliées chez l'animal.

Mais, comme nous venons de le voir, la corrélation n'existe que dans des conditions précises. Elle cesse d'être si on introduit une modification des conditions opératoires qui agit sur les paramètres étudiés : action d'un agent chimique ou physique comme la chaleur. Cette dernière méthode a été mise en pratique pour la préparation d'antigènes apathogènes par KUWERT (43) et HEINIG (32).

Par ailleurs, dès 1953, POLSON et WESSELS (66) avaient constaté que le pouvoir fixateur du complément n'était pas lié au pouvoir infectieux, ce qui avait été souligné en 1957 par THOMPSON (79, 80).

2. — *Seuil de la réaction :*

On voit (Graphique I) que dans nos conditions la réaction devient possible dès que le titre atteint 6.4 DL₅₀ souris par millilitre. Cette valeur est nettement supérieure à celles trouvées par d'autres auteurs, valeurs qui s'étalent entre 3.50 et 5.50 DL₅₀ par gramme de cerveau (18, 22, 42, 70, 81, 82, 83). On peut interpréter ceci en remarquant que matériel, méthodes, critères de lecture et mode de préparation du virus sont différents. En outre, la détermination de ce seuil de réaction est soumise aux mêmes contingences que l'existence de la corrélation qui tiennent, en dernière analyse, à la nature des antigènes fixant le complément, qui peuvent être ou non infectieux.

3. — *Nature des antigènes fixant le complément :*

Ceci nous amène à discuter de la nature de ces antigènes.

Dès 1953, POLSON et WESSELS (66) montrent, par diffusion, qu'un antigène « soluble » fixant le complément a une taille d'environ 12 m μ . Cet antigène recèle la majeure partie du pouvoir fixant le complément de leurs préparations. Après élimination des particules infectieuses, il y a une très faible réduction du titre fixant.

KIPPS et collaborateurs (36), VAN DEN ENDE et collaborateurs (18) ont étudié chez l'animal le pouvoir antigénique de l'antigène « soluble » et du virus après divers traitements. Tous deux provoquent chez la souris l'apparition d'anticorps fixant le complément et d'anticorps neutralisants. Traités par la chaleur à 56° C, pendant 30 mn, ils produisent seulement l'apparition d'anticorps fixant le complément. Mais ces auteurs indiquent que leurs préparations ne sont peut-être pas pures.

KUWERT (43) et HEINIG (32) montrent que l'antigène fixant le complément est relativement thermostable. SCHINDLER (70) trouve que la majeure partie de l'antigène fixant le complément est associée

au virus, l'autre étant représentée par l'antigène « soluble ». Ces deux fractions sont antigènes pour le cobaye.

MEAD (55, 56) réussit à séparer 4 constituants antigéniques, fixant le complément, en dehors du virion. NEURATH et collaborateurs (61) isolent deux antigènes « solubles » par centrifugation en gradient de densité et fluorométrie. Par ailleurs, on trouve au moins deux lignes de précipitation (29, 84). Cependant, la plupart des études récentes ont porté sur la morphologie du virion lui-même.

En résumé, l'existence de plusieurs antigènes est démontrée. Il est établi que le virion et des antigènes « solubles », même dénaturés par chauffage à 56° C, sont susceptibles de se comporter en antigène dans la réaction de fixation du complément. Le pouvoir antigène de ces composants a été étudié chez l'animal, mais il reste à préciser.

Cette étude à réaliser après une séparation parfaite des différents constituants antigéniques permettrait ensuite de juger *in vitro* de la valeur des préparations de vaccin. Ceci a déjà été entrepris pour d'autres virus (67) avec succès.

Ce progrès est hautement souhaitable, car on sait l'imprécision et les difficultés du contrôle *in vivo* des vaccins rabiques.

CONCLUSION

La réaction de fixation du complément permet de titrer les antigènes rabiques produits sur culture de cellules.

A partir de ce titre en « fixation », il est possible d'estimer le titre infectieux de ces préparations, sous réserve de se placer dans des conditions strictes.

Il conviendrait de poursuivre des recherches pour déterminer la nature et le rôle immunogène des divers antigènes rabiques fixant le complément.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Docteur Bornarel qui a effectué les calculs statistiques et le Docteur Roumiantzeff qui leur a facilité l'élaboration du travail de sérologie.

Ils remercient également Mesdemoiselles Burel et Cagnin et Monsieur Bugand pour leur précieuse aide technique.

*Institut français de virologie 254,
rue Marcel Mérieux, 69-Lyon,
France. Directeur : C. Mackowiak.*

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDO (K.), ISHII (K.), OKA (Y.), IRISAWA (J.). — Studies on the immunological diagnosis of the animal suspected of rabies. *Jap. J. Med. Sc. Biol.* **6**, 1953, p. 221-245.
2. ANDO (K.), ISHII (K.), OKA (Y.), IRISAWA (J.). — Studies on the immunological diagnosis of the animal suspected of rabies. *Jap. J. Med. Sc. Biol.* **6**, 1953, p. 659-66.
3. BERNKOPF (H.), NACHTIGAL (D.). — Complement-fixation tests with sera of animals immunized with rabies virus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **53**, 1943, p. 36-38.
4. BINDRICH (H.), KUWERT (E.). — Die diagnostische Bedeutung der Komplementbindungsreaktion bei Tollwut. *Arch. Exp. Veterinärmed.*, **11**, 1957, p. 1015-34.
5. BINDRICH (H.), POTEL (K.), KUWERT (E.). — Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an Komplement bindenden Antigen und gewebliche Veränderungen im Gehirn tollwutkranker Hunde nach experimenteller Infektion. *Arch. Exp. Veterinärmed.*, **12**, 1958, p. 134-151.
6. BOER (C. J.), COX (H. R.). — Specific complement-fixing diagnostic antigens for neurotropic viral diseases. *J. Immunol.* **55**, 1947, p. 193-204.
7. BOERNER (F.), LUKENS (M.). — *Am. J. Clin. Path.* **7**, 1937, p. 33.
8. BRANCHE (R.), LANG (R.), PETERMANN (H. G.), SOULEBOT (J. P.). — Vaccin rabique inactivé produit à partir de culture cellulaire. Résultats préliminaires. X^e Congrès International Sect. Perm. Stand. Microbiol. Prague 1967. Karger-Bâle.
9. BRANDENBURG (H.). — Zur Lyssa Diagnostik, *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **65**, 1952, p. 147-148.
10. BULLING (E.). — Die Komplementbindungsreaktion als Hilfsmittel für die Tollwutdiagnostik. *Zbl. Bakt. Abt. I. Orig.* **169**, 1957, p. 161.
11. CAMAND (R.). — Etude sérologique des types et variantes du virus aphteux par la réaction de fixation du complément. Thèse Doct. Vet. Lyon 1953, Bosc Edit.
12. CAPPONI (M.), SUREAU (P.). — Une épizootie de rage canine à Dalat (Centre Vietnam). *Bull. Soc. Path. Exot.* **48**, 1955, p. 616-619.
13. CASALS (J.), PALACIOS (R.). — The complement fixation test in the diagnosis of virus infections of the central nervous system. *J. Exper. Med.* **74**, 1941, p. 409-426.
14. COVELL (G.), MC GUIRE (J. P.), STEPHENS (E. D.), LAHIRI (B. N.). — *Ind. J. Med. Res.* **24**, 1936, p. 373.
15. DEPOUX (R.), MERVEILLE (P.). — Sur la valeur de la réaction de déviation du complément dans le diagnostic de la rage. *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 1956, p. 182-186.
16. EICHWALD (C.). — Experimentelle serologische Beobachtung beim Menschen und beim Tier nach Rabiesschutzimpfung. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **7**, 1963, p. 281-289.
17. EICHWALD (C.). — Studien mittels der Komplementbindungsreaktion an Tollwutschutzgeimpften Personen. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **3**, 1961, p. 298-306.

18. VAN DEN ENDE (M.), POLSON (A.), TURNER (G. S.). — Experiments with the soluble antigen of rabies in suckling mouse brains. *J. Hyg.* **55**, 1957, p. 361-373.
19. ESPANA (C.), HAMMON (W.). — An improved extracted complement fixing antigen for neurotropic viruses, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y.* **66**, 1947, p. 101.
20. FALKE (D.). — Über den Nachweis von komplementbindendem Antigen in Gehirnen bornakranker Pferde. *Mhefte. Prakt. Tierhk.* **8**, 1956, p. 281-290.
21. FALKE (D.). — Versuche zur Reinigung von S. Antigen des Tollwutvirus. *Mh. Tierheilkd.* **12**, 1960, p. 181-187.
22. FALKE (D.), UHLMANN (W.). — Zur Frage der serologischen Tollwutdiagnose mit Hilfe des Komplement-bindungstestes. *Mhefte Prakt. Tierhk.* **9**, 1957, p. 243-254.
23. FAYET (M. T.). — La courbe d'inactivation du virus aphteux par la bêta-propiolactone. Comparaison avec d'autres agents d'inactivation. *Annales de l'Institut Pasteur*, **112**, 1967, p. 145-152.
24. FISCHER (K.). — Komplementbindendes und infektiöses Antigen beim Tollwutvirus. II Vergleichende experimentelle und morphologische Untersuchungen. *Arch. Exp. Vet.* **15**, 1961, p. 1218-1236.
25. FORREST (G. E.), CAMPION (R. L.). — Diagnostico del virus rabico de calle por fijación de complemento. *Gaceta Veterinaria*, **26** (170), 1964, p. 392-396.
26. FREUND (J.), LIPTON (M. M.), PISANI (T. M.). — Immune response to rabies vaccine in water-in-oil emulsion. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)*, **68**, 1948, p. 609-610.
27. FRIEDBERGER (E.). — Hat die Methode der Komplementablenkung eine Bedeutung für die Diagnose der Lyssa? *Wien. Klin. Wschr.* **20**, 1907, p. 879-880.
28. GILBERT (H.), ROUMIANTZEFF (M.), TERRE (J.), AMIGHI (M.). — Préparation de sérums hyperimmuns de cobayes nécessaires à la réaction de fixation du complément en matière de fièvre aphteuse. Rôle adjuvant de la souche Brucella B 19. *Revue d'Immunologie, Paris*, **30**, 1966, p. 31-44.
29. GRASSET (N.). — La précipitation en milieu gélifié dans le diagnostic de la rage. *Bull. Off. Int. Epiz.* **67** (3-4), 1967, p. 535-541.
30. GREVAL (S. D.). — On rabies. Complement fixation in rabies; the technique, its purpose and associated considerations. *Indian J. Med. Res.* **20**, 1933, p. 913-920.
31. GREVAL (S. D.). — The role of serology in rabies. *Indian Med. Gaz.* **67**, 1932, p. 676.
32. HEINIG (A.). — Zur Komplementbindungsreaktion bei Tollwut mit apathogenen Antigenen, *Mh. Vet. Med.* **22**, 1961, p. 849-851.
33. HELLER (O.), TOMARKIN (E.). — Ist die Methode der Komplementbindung beim Nachweis spezifischer Stoffe für Hundswut und Vakzine brauchbar? *Dtsch. Med. Wschr.* **33**, 1907, p. 795-797.
34. HOROWITZ-WLASSOWA (L.). — Über die Komplementablenkungsreaktion bei der Tollwut. *Zbl. Bakt. I. Orig.* **98**, 1926, p. 216-227.
35. HOTTA (T.). — Zur Diagnose der Tollwut mittels Komplementablenkung. *Wien-Klin. Wschr.* **44**, 1928, p. 1513-1514.
36. KIPPS (A.), DU (T.), NAUDE (W.), POLSON (A.), SELZER (G.), VAN DEN ENDE (M.). — The size distribution of specific antigens in virus

- infected tissues, and their significance. *The nature of viruses* Ciba Foundation Symposium, Churchill Ed., London, 1957, p. 224-243.
37. KOKLES (R.), WITTMANN (W.). — Zu einigen Fragen tollwutdiagnostischer Verfahren unter besonderer Berücksichtigung des Ausstriches nach Muromzew. *Mh. Vet. Med.* **19**, 1964, p. 18.
 38. KONDO (S.), OBANA (K.). — Studies on the complement fixation reaction in rabies. *J. Jap. I. Ref. Soc. Vet. Sc.* 1929, p. 252-57.
 39. KRAUS (R.), MICHALKA (J.). — Die Diagnose des Lyssavirus mittels Komplementablenkung mit Koktoimmunogen und Erlyzerinextrakt. *II Mitteilung Zschr. Immunit. Forsch.* **47**, 1926, p. 504-519.
 40. KRAUS (R.), MICHALKA (J.). — Komplementbindung als diagnostisches Hilfsmittel bei Lyssa. *Zbl. Bakt. I Ref.* **83**, 1926, p. 333.
 41. KRAUS (R.), TAKAKI (J.). — Der Nachweis der neurotropen Virusarten mittels Komplementablenkung mit Koktoantigen. *Wien. Klin. Wschr.* **39**, 1926, p. 624-25.
 42. KUWERT (E.). — Komplementbindendes und infektiöses Antigen beim Tollwutvirus. I. Das Verhalten der beiden Komponenten im Verlauf der Virus-fixe-Infektion. *Arch. Exper. Vet. Med.* **14**, 1960, p. 1049-1072.
 43. KUWERT (E.). — Komplementbindendes und infektiöses Antigen beim Tollwutvirus. III. Das Verhalten der beiden Komponenten des Virus bei höheren Temperaturen. *Arch. Exp. Veterinärmed.* **15**, 1961, p. 1237-1251.
 44. KUWERT (E.). — Komplementbindendes und infektiöses Antigen beim Tollwutvirus. IV. Das Verhalten der beiden Komponenten des Virus während der post-mortalen Fäulnis und Antolyse. *Arch. Exp. Veterinärmed.* **15**, 1961, p. 1252-1258.
 45. KUWERT (E.). — Zur Frage verwandtschaftlicher Beziehung zwischen dem Virus der Staupe und dem Erreger der Tollwut. *Arch. Exp. Vet. Med.* **15**, 1961, p. 12-27.
 46. KUWERT (E.). — Versuche zur Antigenität, Schutzkraft und Encephalogenität der Hempt-Vaccine sowie Betrachtungen zur Tollwutschutzimpfung in Deutschland. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie*, **151**, 1967, p. 131-145.
 47. LANG (R.), PETERMANN (H. G.), SOULEBOT (J. P.), BRANCHE (R.). — Etude d'un nouveau vaccin rabique. Colloque sur la vaccination contre la rage. Lyon 15 juillet 1967. *Animal de compagnie* 1968, p. 160-164.
 48. LEPINE (P.). — Techniques de laboratoire en virologie humaine. Editeurs Masson et Cie, Paris, 1964.
 49. LINSERT (H.), TEMPLIN (G.), WOLTER (R.). — Die Komplementbindungsreaktion als Diagnostikum bei Routineuntersuchungen auf Tollwut. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **72**, 1959, p. 323-325.
 50. LIPTON (M. M.), FREUND (J.). — The formation of complement fixing and neutralizing antibodies after the injection of inactivated rabies vaccine with adjuvants. *J. Immunol.* **64**, 1950, p. 297-303.
 51. LITCHFIELD (J. T.), WILCOXON (F.). — A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, **96** (2), 1949, p. 99-113.
 52. LO GRIPPO (G. A.). — Antigenicity of combined beta-propiolactone and ultraviolet inactivated virus vaccines. *J. Immunol.* **80**, 1958, p. 198-203.

53. MARIE (A. C.), URBAIN (A.). — La réaction de fixation dans la rage. *C. R. Soc. Biol.* **101**, 1929, p. 561-563.
54. MAYER (M. M.), OSLER (A. G.), BIER (O. G.), HEIDELBERGER (M.). — The activating effect of Mg and other cations, of the hemolytic function of complement. *J. Exp. Med.* **84**, 1946, p. 535-548.
55. MEAD (T. H.). — Purification of rabies soluble antigens. *J. Gen. Microbiol.* **27**, 1962, p. 397-414.
56. MEAD (T. H.). — The characterization of rabies soluble antigens, *J. Gen. Microbiol.* **27**, 1962, p. 415-426.
57. MICHALKA (J.). — Beitrag zur Diagnostik der filtrierbaren Virusarten mittels Komplementbindungsreaktion. *Zschr. Immunit. Forsch.* **48**, 1927, p. 227-232.
58. MIRCHAMSY (H.). — Sur la préparation et la concentration du sérum antirabique en Iran, *Revue d'Immunologie*, **26**, 1962, p. 60-91.
59. MURPHY (F. A.), FIELDS (B. N.). — Kern canyon virus : Electron microscopic and immunological studies. *Virology*, **33**, 1967, p. 625-637.
60. NEDRIGAILOFF (W.), SAWTSCHENKO (W.). — Über die Anwendung der Komplementbindungsmethode für die Diagnose der Tollwut. *Zschr. Immunit-Forsch.* **8**, 1911, p. 353-357.
61. NEURATH (A. R.), WIKTOR (T. J.), KOPROWSKI (H.). — Density gradient centrifugation studies on Rabies virus. *Journal of Bacteriology*, **92**, (1), 1966, p. 102-106.
62. OMS. — La Rage. Techniques de Laboratoire. Genève Ed. Oms, série des monographies n° 23, 1967.
63. OSOLINA (E.), ENGLERT (H. K.). — Erfahrungen mit der Komplementbindungsreaktion bei Tollwut. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **75**, 1962, p. 66-68.
64. PETERMANN (H. G.), LANG (R.), BRANCHE (R.), SOULEBOT (J. P.), MACKOWIAK (C.). — Réalisation d'un nouveau vaccin rabique à partir de culture cellulaire. *C. R. Acad. Science, Paris*, **265**, 1967, série D, p. 2143-2144.
65. PETERMANN (H. G.), LANG (R.), BRANCHE (R.), SOULEBOT (J. P.). — Un nouveau vaccin antirabique préparé avec du virus fixe produit sur culture de cellules et inactivé. Rapports XVIII^e Congrès Mondial Vétérinaire, Paris, 1967, p. 227-230. Muray-Print, Paris.
66. POLSON (A.), WESSELS (P.). — Particles size of soluble antigen of rabies virus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **84**, 1953, p. 317-320.
67. ROUMIANTZEFF (M.), FONTAINE (J.), DUBOUCIARD (C.). — Evaluation du pouvoir immunogène du virus aphteux par mesure du pouvoir fixant le complément après traitement par un fluorocarbène. *C. R. Acad. Sci.* **261**, 1965, p. 598-601.
68. ROUMIANTZEFF (M.), STELLMANN (C.), DUBOUCIARD (C.). — Technique de fixation quantitative du complément appliquée à l'étude du virus de la fièvre aphteuse. *Bull. Soc. Sci. Vét Lyon*, **67**, 1965, p. 243-269.
69. SCHINDLER (R.). — Die Komplementbindung als Hilfsmittel für die Differential-Diagnose der Viruskrankheiten des Hundes. *Mh. prakt. Tierhk.* **9**, 1957, p. 315.
70. SCHINDLER (R.). — Untersuchungen über das Komplementbindungsantigen des Tollwutvirus. *Zblt für Bakteriologie, Parasitenkund, Infektionskrankheiten und Hygiene*, **186**, 1962, p. 139-151.

71. SCHWARTZ (D.). — Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Paris-Flammarion, 1963.
 72. SETHNA (Y. I.), SOMAN (D. W.). — On the value of complement fixation test in the diagnosis of rabies. *Indian J. Pub. Health.* **2**, 1958, p. 258-264.
 73. SHORTT (J. P.), Mc GUIRE, BROOKS (A. G.), STEPHENS (E. D.). — *J. Med. Res.* **22**, 1935, p. 537.
 74. SIKES (R. K.), LARGHI (O. P.), SIMPSON (C. F.), WINKLER (W. G.). — Physical and chemical properties of rabies virus. International Symposium on Rabies, Talloires 1965. *Symp. Series Immunobiol. standard*, I, p. 55-64. Karger. Basel/New-York, 1966.
 75. SINGH (G.), RAICHOWDHURI (A. N.), THOMAS (A. K.). — Complement fixation test in rabies. *Indian J. Med. Res.* **53**, 1965, p. 475-87.
 76. SOHIER (R.). — Diagnostic des maladies à virus. Flammarion, Paris, 1964.
 77. STELLMANN (C.), TERRE (J.). — Choix d'une méthode statistique en vue des contrôles d'activité des produits biologiques sur animaux. *Bull. Soc. Sci. Vét. Lyon*, **67**, 1965, p. 273-282.
 78. THOMAS (J. B.), RICKER (A. S.), BAER (C. M.), SIKES (R. K.). — Purification of fixed rabies virus. *Virology*, **25**, (2), 1965, p. 271-275.
 79. THOMPSON (S. W.). — The effect of five proteolytic enzymes on some antigenic characteristics of rabies virus, with observation on the resistance of the virus to heat. *Amer. J. Vet. Res.* **18**, 1957, p. 886-894.
 80. THOMPSON (S. W.). — Some effects of a bacterial protease on the complement-fixing antigenicity of rabies virus. *Amer. J. Vet. Res.* **18**, 1957, p. 895-897.
 81. TRUBINA (L. M.). — Ein Beitrag zur Serodiagnostik der Tollwut. *Arch. Ges. Virus-forsch.* **2**, 1957, p. 161-165.
 82. UEKI (H.). — Studies on the time of appearance of Negri bodies, complement-fixing antigen and virulence in the brains of mouse inoculated with rabies streets virus. *Jap. J. Vet. Sci.* **23**, 1961, p. 375-387.
 83. UEKI (H.), KATO (T.), OISHI (J.). — Observations of the time of appearance of Negri bodies, complement-fixing antigen, and virulence in mouse brains inoculated with rabies streets virus. *Am. J. Vet. Res.* **18**, 1957, p. 216-218.
 84. VILLEMOT (J. M.), PROVOST (A.). — Etude sur l'antigène soluble du virus rabique. *Ann. de l'Institut Pasteur*, **96** (6), 1959, p. 712-722.
 85. WIKTOR (T. J.), FERNANDES (M. V.), KOPROWSKI (H.). — Cultivation of rabies virus in human diploid cells strains Wi 38. *J. Immunol.* **93**, (3), 1964, p. 353-366.
 86. WITTMANN (W.). — Zur Komplementbindungsreaktion bei Tollwut mit Hyperimmenserum von Meerschweinchen, *Arch. exp. Veterinärmed.* **18**, 1964, p. 1183-1192.
 87. WOLTER (R.). — Die Komplementbindungsreaktion in der Tollwut-Routine-Diagnostik. *Mh. Vet. Med.* **24**, 1964, p. 947-949.
-