



n° 4866

**Rapport final - Contrat de recherche**  
**N° AP 74.O.1103 - 74.46.**  
**1974 - 1976**

**MINISTRE de la QUALITE de la VIE**  
**Comité Scientifique "Eau"**

**METHODOLOGIE DE CONCENTRATION ET INACTIVATION**  
**DES VIRUS**  
**DANS LE MILIEU HYDRIQUE.**

*PROFESSEUR J.M. FOLIGUET*

*en collaboration avec*

*JG BLOCK*

*JF COLLIN*

*JC JORET*

*M MORLOT*

*P PATERNOTTE*

**LABORATOIRE D'HYGIENE ET DE RECHERCHE**  
**EN SANTE PUBLIQUE**

**FACULTE DE MEDECINE**

**54500 - VANDOEUVRE LES NANCY**

SOMMAIRE

Introduction

I - Analyse bibliographique du sujet	4
1-1-Nature des filtres clarifiants	4
1-2-Nature des filtres adsorbants	5
1-3-Nature de l'éluant et du système de reconcentration	8
II - Buts du travail de recherche	10

Matériel et méthodes

I - Virus	12
II - Eau de travail	12
III - Filtres clarifiants	13
IV - Filtres adsorbants	14
V - Dispositif expérimental	15
VI - Elution	17
VII - Reconcentration de l'éluant	19

Résultats et discussion

I - Essais préliminaires	20
1-1-Choix d'une membrane filtrante	20
1-2-Choix du pH d'adsorption	20
1-3-Utilisation de clarifiants	23
1-4-Rôle des ions trivalents	23
1-5-Choix d'un éluant	25
1-6-Inactivation virale en fonction du pH	26
1-7-Performances de la membrane Vorsapor	29
1-8-Conclusions préliminaires	30
II - Expérimentation sur de grands volumes d'eau	31
2-1-Efficacité des systèmes adsorbants testés	31
2-2-Efficacité de l'éluant	32
2-3-Choix du point d'injection de HCl et Al <sup>3+</sup>	33
2-4-Influence du débit et du volume filtré	34

<u>Conclusion générale</u>	36
----------------------------	----

<u>Bibliographie</u>	40
----------------------	----

<u>Annexe 1</u> : Reconcentration des éluats par le système des polyères à deux phases	52
<u>Annexe 2</u> : Reconcentration des éluats sur fibres creuses	45
<u>Annexe 3</u> : Reconcentration des éluats sur membrane de fibre de verre	46
<u>Annexe 4</u> : Matériel utilisé dans la réalisation du concentrateur	47

## INTRODUCTION

Selon CHANG (5), une eau pourrait être considérée comme potable d'un point de vue virologique si elle contenait moins d'une particule virale (U.F.P.) pour 10 000 litres d'eau. La mise en évidence d'aussi faibles concentrations pose le problème de l'utilisation d'une méthode de détection fiable très sensible et applicable à de grands volumes d'eau.

Ce problème a nettement évolué à partir des recherches menées en laboratoire. Ainsi, JAKUBOWSKI et CLARKE (14) rapportent que lors des premiers essais, 4 000 à 40 000 virus dans 3,8 litres d'eau étaient considérés comme de "basses" concentrations virales. Les développements des techniques de concentration permettent aujourd'hui de détecter 1 ou 2 unités virales dans 400 litres d'eau lorsque 1 900 litres d'eau sont filtrés avec des rendements supérieurs à 50 % (HILL, 11).

Ces résultats, certes, sont encore loin des normes proposées par CHANG (5). Toutefois, l'adaptation de ces techniques nouvelles aux recherches de virus dans des eaux superficielles moyennement polluées où les doses virales peuvent atteindre 30 UFP par litre (CWNG, 5) peut s'avérer d'une grande efficacité pratique.

### 1 - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE DU SUJET

A notre connaissance, WALLIS et MELNICK (22 et 23) ont été les premiers à décrire un concentrateur de virus applicable à de grands volumes d'eau et transportable sur le terrain. La récupération des virus repose sur le principe d'adsorption des particules virales sur un support (membrane ou cartouche). Les virus sont alors élués et reconcentrés sur divers systèmes.

D'un point de vue global, la technologie de concentration est fonction de quatre paramètres déterminés.

- \* la nature des filtres clarifiants
- \* la nature des filtres adsorbants
- \* la nature de l'éluant
- \* la nature du système de reconcentration

#### 1 - 1 - Nature des filtres clarifiants

La nécessité d'utiliser des filtres clarifiants avant les adsorbants a été signalée par WALLIS et MELNICK (25 et 22). En effet, ces auteurs rapportent que certaines eaux contiennent des substances capables d'interférer avec le "piégeage" des virus. Ces substances (ou "membranes coating components" ou MCC) seraient des molécules organiques, plus particulièrement des protéines capables d'entrer en compétition avec les virus au niveau des sites d'adsorption des membranes.

Il est possible de retenir ces MCC sur des résines ou sur des filtres clarifiants de type filtres en profondeur ou gaza. Les caractéristiques de plusieurs d'entre eux sont rapportées dans le tableau 1.

Ces clarifiants développent, une surface filtrante beaucoup plus importante qu'un filtre plat simple j environ 3 250 cm<sup>2</sup> contre 486 cm<sup>2</sup> pour une membrane de diamètre de 293 mm (WALLIS ; 23). Par ailleurs, il est important que ces filtres retiennent peu de particules virales. A cet égard, l'emploi de filtres en orlon, en polypropylène ou en polyester répond à ces exigences vis à vis du poliovirus (METCALF ; 16) et des adénovirus de type 5 (METCALF j 17). Au contraire, les filtres en fibre de verre ou en acétate de cellulose "piègent" les particules virales. De ce fait, ils ne peuvent être retenus comme simples clarifiants sauf l'acétate de cellulose utilisé comme tel par HOBMA (12), YETCALF (16) et FIELDS (8) après prétraitement exclusif au Tween 80.

Des filtres en coton sont couramment utilisés par WALLIS (22 et 23) pour clarifier les eaux (turbides le plus souvent) du fait entre autre de leur capacité à retenir les sels métalliques insolubles. Prétraités au Tween 80, ils retiennent une fraction des populations Virales mais insuffisamment toutefois pour être considérés comme de bons adsorbants.

Enfin, il faut noter que la majorité de ces filtres commercialisés sur les marchés américains ou français ne peuvent pas le plus souvent être utilisés directement. 11~ doivent être Prétraités (Tween 80) ou lavés avec d'importantes quantités d'eau (jusqu'à 100 litres) (WALLIS ; 23) afin d'éliminer les détergents résultants de leur fabrication j ce qui alourdit d'autant la manipulation.

## 1 - 2 - Nature des filtres adsorbants

Les différents types de filtres adsorbants utilisés à ce jour sont décrits dans les tableaux 2 et 3. WALLIS et coll. (22,23,25) ont mis en évidence un phénomène d'adsorption des virus sur des membranes en nitrate de cellulose et l'ont appliqué à la filtration de grands volumes.

En fait, couramment, c'est la fibre de verre qui apparaît aujourd'hui comme l'adsorbant de choix.

Ainsi, le filtre en profondeur en fibre de verre de type K27 fut testé par WALLIS (23) et HOBMA (12) puis SOBSEY (20,21), METCALF (17) et FIELDS (8) combiné cette fois à une membrane filtrante en fibre de verre-résine époxy type Cox. JAKUBOWSKI (13) a testé pour sa part un filtre type BALSTON composé de borosilicate - fibre & verre-résine époxy.

Enfin, un nouveau type de filtre (filtre plissé) formé d'un mélange de fibre de verre - résine époxy - & lamine a été évalué par FARRAH (6) comme adsorbant puis par PAYBLEHT (18) comme clarifiant et adsorbant. Ce type de filtre demeure un

un bon adsorbant des virus, même après passage de 20 000 litres d'eau du robinet à un débit de 38 litres par minute (0). Pour une eau côtière de moyenne turbidité, il convient de clarifier les échantillons de préférence avec un filtre plissé de porosité de 3  $\mu$  plutôt qu'un filtre de type K 27. Dans ces conditions, il est possible de traiter 2 300 litres d'eau sans perte d'adsorption. (18).

L'utilisation de ce matériel nécessite par ailleurs des conditions de travail définies particulièrement en ce qui concerne la présence d'ions di ou trivalents et l'acidité des échantillons (tableau 2). Ainsi, WALLIS (22,23,24) démontre que l'adsorption est augmentée en présence de cations divalents comme  $Mg^{2+}$  ou trivalents comme  $Al^{3+}$ . L'auteur considère qu'il faut cent fois moins d'ions  $Al^{3+}$  que d'ions  $Mg^{2+}$  pour un même niveau d'adsorption virale. Toutefois, il convient de travailler à pH acide sinon il se forme un gel d'hydroxyde d'aluminium qui colmate les filtres. La présence d'ions  $Al^{3+}$  permet alors un débit supérieur à celui obtenu sans traitement de l'eau. HOBREW (12) a confirmé ces résultats pour une eau usée et avec un filtre K27.

Par la suite, SOBSEY (20) a défini des conditions optimum d'adsorption du poliovirus à pH: 3,5 dans les eaux claires. Pour des eaux turbides il convient de plus de filtrer les eaux additionnées de cations  $Al^{3+}$  à une concentration de 5 ou  $15 \cdot 10^{-4} M$  (18).

### 1 - 3 - Nature de l'éluant et du système de reconcentration

Les virus ainsi retenus par les filtres doivent être Glués et le liquide d'éluant reconcentré. Le type d'Gluant utilisé détermine très largement la méthode de reconcentration choisie ; c'est pourquoi il est nécessaire de les présenter ensemble. Le tableau 4 rassemble quelques uns des systèmes employés à ce jour.

WALLIS (22) élue les membranes en nitrate de cellulose avec un tampon borate " tris pH : 9 ou un mélange de PEG 1 % - NaCl 0,01 M qui l'impose" une reconcentration sur polyélectrolytes insolubles (PE 60). L'extrait de boeuf 2.3 % pH : 9 ou le sérum de veau (24-25) tout comme les agents nouillantç, contiennent des substances capables d'interférer dans l'adsorption des virions. De ce fait, même s'ils apparaissent comme de bons éluants ils sont quasiment inutilisables lors de la reconcentration sur membrane. Un autre éluant (tampon soude-glycine 0,05 M pH 11,5) a donc été testé et utilisé successivement par WALLIS (23,24) HOBREW (12), SOBSEY (20), METCALF (17), JAKUBOWSKI (13,14) HILL (11) et PAYBENT (18). Cet éluant peut être reconcentré sur des membranes adsorbantes de fibre de verre et de petit diamètre (50 mm) (SOBSEY ; 20) ou par précipitation par  $FeCl_3$  ou  $AlCl_3$  (SOBSEY ; 21; FARRAH ; 0). La reconcentration sur membrane de fibre de verre doit s'effectuer après addition dans l'éluant de chlorure d'aluminium  $5 \cdot 10^{-4} M$  afin de complexer les substances interférentes de type anionique provenant de l'eau du robinet (SOBSEY ; 20; JAKUBOWSKI ; 14,15 ; HILL ; 11)

Si le tampon glycine présente un pouvoir d'éluant maximum à pH : 11 - 11,5, il peut entraîner des dénaturations de certains

virus comme l'adénovirus 5 (17). C'est pourquoi METCALF lui préfère l'extrait de boeuf à 3 %, pH : 9 qu'il reconcentre par la méthode des polymères à deux phases.

Au terme de cette analyse il importe de souligner que les résultats obtenus par les diverses équipes de recherches semblent très prometteurs (tableau 5). Ainsi HILL (11) a pu mettre en évidence moins de 1 à 2 particules virales dans 400 litres d'eau après filtration d'importants volumes d'eau claire (1900 litres). Adaptables aussi bien à des eaux claires que turbides ces méthodes apparaissent satisfaisantes et permettent des rendements moyens (en laboratoire) supérieurs à 70 % de récupération.

## II - Buts du travail de recherche

Le travail de recherche a pour but d'étudier à partir du matériel proposé par plusieurs auteurs et disponible sur le marché français, la mise en évidence et la concentration des virus dans le milieu hydrique.

Les objectifs du travail concernent :

- (a) la mise au point d'une technologie de concentration pratique et peu coûteuse ;
- (b) le choix d'un matériel de filtration utilisable pour différents types d'eau ;
- (c) la construction d'un appareil portatif robuste, susceptible d'être utilisé sur le terrain.

## CONCLUSION GENERALE

Le travail de recherche sur la concentration et la mise en évidence des virus dans le milieu hydrique a été réalisé en deux étanos.

\* la première a visé à rechercher un matériel adsorbant vis à vis des virus et **sec** conditions d'utilisation. A cet effet, il a été reconnu que la fibre de verre soit sous forme de membranes filtrantes (Versapor) soit sous forme de cartouches filtrantes (Zalston) représentait un adsorbant au choix pratique et très performant à pH acide.

\* la seconde a permis d'aboutir à la construction d'un concentrateur utilisable sur le terrain conçu pour traiter des échantillons d'eau d'un grand volume et de qualité fort diverse.

Parmi le matériel testé au laboratoire, il nous est apparu que les filtres clarifiants de type Calton (polyéthylène fritté) s'avéraient plus pratiques que les filtres clarifiants de type Cuno et ce pour trois raisons.

- (a) d'une part les xérites Baiston sont des filtres très minces ne retenant que peu ou pas de liquide d'élué.
- (b) d'autre part ces préfiltres ne "piègent" pas des particules virales quelles que soient les qualités de l'eau (pH acide, présence d'ions  $Al^{3+}$ )
- (c) enfin, les filtres clarifiants en fibre de verre, nécessitent un prétraitement pour éliminer les cires résultant de leur fabrication.

En ce qui concerne les filtres adsorbants, les excellents résultats obtenus (plus de 90 % de récupération des populations virales) permettent de choisir ces filtres pour l'établissement d'un concentrateur. Notre choix s'est porté sur les cartouches adsorbantes de type Salstor. (fibre de verre de 8 p) plutôt que les membranes filtrantes de type Versapor beaucoup moins facilement manipulables, et colmatant beaucoup plus rapidement.

Le liquide d'élué retenu est le tannin glycine pH 11,5 très efficace dans la mesure où l'on prend la précaution rigoureuse de le ramener à pH : 7 - 7,2 immédiatement après l'élué des filtres.

Enfin, la reconcentration des élués peut être réalisée soit par la méthode du système à deux phases soit par la méthode des membranes adsorbantes qui malgré une efficacité discutable (interférence des MCC) et des problèmes de toxicité cellulaire (ions aluminium) est retenue pour de nombreux buts.

L'ensemble **de** la manipulation est résumé dans la figure 12. c'est une manipulation **rapide** puisqu'elle peut être terminée en 3 heures pour des échantillons de l'ordre du mètre cube.

Le concentrateur **proposé**, dont le schéma **est** **rap-**  
**nelé** figure 13, est adapté à des **manipulations** sur le terrain. Sa construction fait appel à un matériel simple et non spécifique. De plus le prix de revient du matériel utilisé pour une concentration ne dépasse pas 50 F (prix 1976) et permet d'utiliser cette technique dans les analyses de routine.

En résumé, nous avons acquis par rapport au contrat de recherche précédent (72 - 20) une avance considérable et sommes à même de proposer un concentrateur pour la mise en évidence des virus dans les eaux, manipulable sur le terrain et robuste (matériel plastique et métallique). La méthodologie proposée se révèle simple, bon marché et particulièrement efficace puisqu'elle nous permet d'assurer une récupération virale supérieure à 90 %

son efficacité a été vérifiée sur des eaux réelles et nous a permis d'analyser avec succès des 200 litres d'eaux de surface très turbides à plusieurs mètres cubes d'eaux de distribution et de piscine.