

Zeitschrift: Plan : Zeitschrift für Planen, Energie, Kommunalwesen und Umwelttechnik = revue suisse d'urbanisme
Band: 22 (1965)
Heft: 1

Artikel: Méthodes d'examen virologique
Autor: [s.n.]
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-782826>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.11.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Méthodes d'examen virologique

M. le Docteur Coin, chef de Service du Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris et M. Ménétrier, chef de Service adjoint

1. Introduction

La recherche des virus dans les eaux exige des techniques particulières du fait de la nature même de ces éléments infra-microscopiques qui ne peuvent se multiplier que dans les cellules vivantes.

Les méthodes qui vont être exposées résultent des travaux poursuivis au Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris* qui effectue depuis plusieurs années des prélèvements systématiques en provenance de rivières, d'effluents hospitaliers ou d'eaux de distribution afin de déceler éventuellement la présence de virus. Elles consistent à prélever ces virus dans le milieu extérieur, à les concentrer pour les rendre décelables, à les purifier pour les débarrasser des autres agents pathogènes ou simplement saprophytes auxquels ils sont mélangés et enfin à les inoculer à des cultures cellulaires ou à des animaux sensibles.

La grande dilution des virus dans le milieu extérieur rend nécessaire une concentration et il importe d'envisager tout d'abord les méthodes de prélèvement les plus adéquates au but poursuivi.

2. Méthodes de prélèvement

Il est possible de prélever un volume assez grand de l'eau à tester, par exemple 30 litres, et d'effectuer une concentration à partir de ce volume.

La méthode de prélèvement par gaze permet d'obtenir des échantillons déjà concentrés. C'est la technique qui est utilisée de préférence au Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris. Elle dérive de la méthode de Moore et comporte deux variantes d'emploi:

- les gazes dites « flottées »
- les gazes dites « pompées ».

Le tampon de gaze est tout d'abord préparé au moyen d'une gaze à pansements de 3 m × 0,60 m, repliée de manière à former une compresse de 50 × 30 cm qui, découpée en lanières dans le sens longitudinal, est nouée à une extrémité par une ficelle fortement serrée et se présente comme une sorte de pompon. L'ensemble est stérilisé.

Dans le cas des gazes flottées, la tête du pompon est accrochée à un câble immergé dans la voie d'eau et lesté de poids, de manière que la gaze flotte horizontalement dans le courant à un mètre environ au-dessous de la surface.

Les gazes pompées constituent un perfectionnement pour l'étude des eaux de surface, car leur emploi permet d'avoir une indication sur le volume d'eau qui a circulé et d'assurer un meilleur contact entre l'eau et la gaze. Cette dernière est placée dans une éprouvette à pied stérile, l'eau étant pompée et circulant

* Par M. Hannoun, chargé des laboratoires de virologie, sous la direction de M. le Docteur Coin, chef de Service.

de bas en haut à travers la gaze. L'orifice de sortie de l'éprouvette est reliée à un compteur mesurant la quantité d'eau passée à un débit constant d'environ 3 litres/minute.

Les gazes sont laissées en place durant 24 ou 48 heures, les durées de contact prolongées n'ayant pas donné satisfaction. Ramenées au laboratoire, elles sont exprimées à l'aide de gants stériles et le liquide d'expression est amené à un volume déterminé, généralement 1 litre.

3. Concentration

Les prélèvements d'eau en flacon sont traités par l'une des méthodes suivantes:

3.1. — *la concentration à grande vitesse* en centrifugeur à écoulement type Sharpless avec bol virus. Il est nécessaire de tourner à environ 50 000 tours/minute avec un débit de 1 litre/heure pour sédimenter les virus de la taille de celui de la poliomyélite. On recueille le sédiment sur les parois du bol en le remettant en suspension dans une solution tampon et on le traite comme un prélèvement de selles.

3.2. — *Les méthodes par collage*. Le principe du collage consiste à introduire ou à réaliser au sein du liquide un précipité suffisamment lourd pour pouvoir être centrifugé ou décanté en entraînant le virus par adsorption.

On traite l'eau par exemple par un flocculat d'alumine qui, en sédimentant, entraîne le virus. On recueille le précipité que l'on traite ensuite comme une selle pour l'extraction du virus.

3.3. — *la concentration par les résines échangeuses d'ions* — (méthode de Kelly aux Etats-Unis).

Que le concentrat provienne d'un prélèvement simple ou qu'il résulte d'un procédé d'enrichissement, il est traité sur résines échangeuses d'ions.

Le pH du liquide d'expression de la gaze (ou de l'eau prélevée directement) est ajusté à 7 à l'aide de solutions d'acide chlorhydrique et de soude. On laisse 24 heures à 4 ° C. On ajoute de l'albumine bovine à raison de 0,5 % et 5 grammes de résine Dowex 1 × 10 (200-400 mesh) pour 100 ml.

On laisse en contact 30 minutes en agitant et on centrifuge 10 minutes à 3000 tours/minute. On jette le surnageant. On traite le culot par 10 ml de bouillon de viande. On agite pendant 15 minutes puis on centrifuge 10 minutes à 3000 tours/minute. Le surnageant est alors traité pour pouvoir être inoculé.

4. Purification

L'opération consiste à débarrasser les prélèvements ainsi obtenus des bactéries qu'ils peuvent contenir et qui ne permettraient pas l'isolement du virus. Elle utilise séparément ou successivement les antibiotiques si la contamination est légère et l'éther qui est sans effet sur les entérovirus et élimine la plupart des contaminations. Enfin la filtration permet de se débarrasser des pollutions plus résistantes.

Les principaux antibiotiques employés sont les suivants: pénicilline, streptomycine, néomycine, colimycine et mycostatine. La pénicilline est utilisée à 200 000 unités, la néomycine et la colimycine à 50 mg/l. Quant à la mycostatine, elle est employée pour éviter les moisissures. Peu soluble dans l'eau, partiellement soluble dans l'alcool, on fait une suspension à 250 mg dans 10 ml d'alcool. On réalise une telle concentration pour éviter une trop grande quantité d'alcool toxique pour les cellules.

Le mode opératoire est alors le suivant:

Le surnageant obtenu précédemment est centrifugé dans de petits pots coniques afin d'éliminer les germes par sédimentation. Les extraits très pollués sont traités à l'éther. On ajoute les antibiotiques: néomycine, mycostatine (quelques gouttes), colimycine pour les gazes très sales (deux gouttes), pénicilline. On laisse au moins 48 heures à 4 ° C pour laisser agir les antibiotiques.

5. Inoculation aux cultures cellulaires et aux souriceaux nouveaux-nés

Les liquides obtenus après extraction et purification, et dont la stérilité est éprouvée, sont alors ensemencés sur cultures cellulaires puis inoculés aux souriceaux nouveaux-nés afin de déceler la présence de certains types de virus Coxsackie ne poussant pas en cultures cellulaires.

5. 1. — Cultures cellulaires

Pour obtenir des cultures cellulaires, deux solutions peuvent être envisagées. On peut recourir à l'emploi:

- soit de *cellules de souches*
- soit de *cellules d'organes*

5. 11. — Les cellules de souches sont des lignées cellulaires, d'origine cancéreuse ou non, humaines ou non, qui s'entretiennent en série exactement comme une souche bactérienne, par des repiquages successifs.

Les souches les plus utilisées sont les cellules He La provenant d'un cancer utérin humain et les cellules KB qui proviennent d'un carcinome humain. Actuellement nous employons exclusivement les cellules KB.

Ces cellules cultivent collées au verre des boîtes ou des tubes de verre Pyrex. En vue du repiquage, on les disperse dans une solution de trypsine qui a la propriété de digérer les fibres conjonctives et parvient ainsi à

décoller les cellules du verre. On peut également utiliser le versénate car l'attraction au verre est due au calcium que renferment les cellules.

Les opérations sont les suivantes:

- vider le contenu de belles boîtes de cellules;
- ajouter environ 10 ml de trypsine;
- agiter jusqu'à ce que les cellules soient entièrement décollées;
- mélanger les cellules plus la trypsine en les transvasant dans des petits pots ronds à centrifuger;
- centrifuger à 800 ou 900 tours/minute, laisser monter et arrêter de suite;
- vider le surnageant;
- laver les cellules au milieu KB;
- agiter à la seringue (10 fois au moins);
- dans une bouteille de milieu KB, ajouter les cellules à une concentration d'environ 300 000 à 500 000 par ml;
- refaire des boîtes de souches;
- et répartir les cellules (2 ml) au distributeur automatique dans des tubes en vue de l'ensemencement (environ 150 tubes);
- mettre les tubes sur plateaux et le tout à l'étuve pendant au moins 48 heures avant l'ensemencement.

Le milieu est renouvelé deux fois par semaine. Les souches cultivent dans le milieu « Hydrolysate de caséine — sérum de poulain ou de veau » (voir annexe).

5. 12. — Les cellules d'organes proviennent de la digestion d'organes (rein, foie, etc.) mais ne peuvent être repassés en série en raison de leur faible taux de multiplication. Il faut donc chaque fois repartir de l'animal.

La technique utilisée est la suivante:

- On coupe l'organe (rein de singe) en petits fragments et on le lave 3 fois en solution saline tamponnée pour éliminer le sang et les débris cellulaires;
- on traite une demi-heure par la trypsine, en solution à 0,25 % que l'on rejette ensuite: stade de prétrypsination;
- puis on traite par 3 ml de solution de trypsine par gramme de tissu en agitant constamment. La trypsination est effectuée dans un appareil permettant un travail continu ou à froid en récipient fermé.

Les cellules ainsi digérées sont alors lavées trois fois en milieu complet puis mises en suspension après numération à raison de 200 000 à 500 000 cellules par ml.

Le milieu utilisé contient un hydrolysate protéique (caséine ou lactalbumine), une proportion de 5 à 10 % de sérum (poulain

ou veau) dans une solution saline de base de type Earle. On y ajoute aussi des antibiotiques (voir annexe).

- 5.13. — *Les cellules diploïdes* doivent être prochainement utilisées au Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris, conjointement aux deux types de cellules précédents, élargissant ainsi l'éventail de détection des virus. Le milieu utilisé pour la culture de ces cellules est le milieu de Eagle. C'est un milieu composé d'une solution de base de type Earle à laquelle on ajoute une solution d'acides aminés, une solution de vitamines et une solution de glutamine. Le milieu contient également 10 % de sérum de veau et on ajoute des antibiotiques (pénicilline, streptomycine).

Il est recommandé de prendre des précautions particulières pour l'entretien des cultures cellulaires

— les opérations doivent être effectuées d'une façon rigoureusement stérile;

— la verrerie employée doit être très propre et il faut proscrire tout lavage au mélange sulfo-chromique et à la soude et rincer à l'eau distillée.

- 5.2. — *Ensemencement.* — Les cultures cellulaires sont ensemencées lorsqu'elles se présentent sous l'aspect d'un tapis continu. On change alors le milieu et on ajoute le liquide à tester à la culture à raison de 0,1 ml par tube à 5 tubes de chaque sorte (cellules KB et cellules de rein de singe). On porte à l'étuve à 37 °.
- 5.3. — *Inoculation aux souriceaux.* — Les liquides d'extraction sont également inoculés à des souriceaux nouveaux-nés en vue de la recherche des virus Coxsackie dont la plupart des souches de type A ne se multiplient pas sur cultures cellulaires. Les souriceaux qui doivent avoir moins de 24 heures reçoivent chacun 0,1 ml d'extrait par voie intrapéritonéale et sont remis avec leur mère.

6. Examen des cultures et des souriceaux

- 6.1. — *Cultures.* — Après une heure de contact à 37 °, le milieu des tubes est à nouveau remplacé par du milieu neuf. Si le liquide d'extrait est peu toxique, on peut prolonger ce temps de contact une nuit à 37 °. Les tubes sont ensuite examinés tous les trois jours au microscope afin d'y déceler les altérations cellulaires. La période de surveillance doit durer 21 jours pour les cellules KB et 14 jours pour les cellules de rein de singe avec des changements de milieu deux fois par semaine.

Les tubes présentant un pouvoir cytopathogène (destruction cellulaire) sont im-

édiatement congelés et repassés sur une seconde série de tubes du même type de cellules après contrôle de stérilité.

La présence d'un pouvoir cytopathogène repiquable en série, avec contrôles de stérilité négatifs, indique qu'un virus a été isolé. Il reste à identifier ce virus.

- 6.2. — *Les souriceaux inoculés* sont examinés tous les jours pendant deux semaines afin de déceler l'apparition de paralysies ou de troubles quelconques. Si un virus Coxsackie est présent, les symptômes apparaissent en six à dix jours. On sacrifie les premiers animaux malades pour les examens histologiques et les passages ultérieurs.

7. Identification des virus

Ainsi que cela a été signalé, si l'effet cytopathogène repasse en série sur 3 subcultures, bactériologiquement stériles, il s'agit vraisemblablement d'un virus qu'il convient d'identifier soit par les lésions qu'il provoque (examen de lames colorées) soit par les méthodes sérologiques (fixation du complément, séro-neutralisation, inhibition de l'hémagglutination).

Le principe de l'identification d'un virus inconnu par l'épreuve de neutralisation fait intervenir l'action neutralisante d'un sérum de référence connu. Le typage d'un virus poliomyélitique s'effectuera de la manière suivante:

Dans un premier temps, on réalise des dilutions du virus inconnu à 10^{-3} ou à 10^{-4} .

Puis dans un deuxième temps, on fait des dilutions au $1/20$ en milieu de Hanks des trois sérums étalons: polio I, polio II et polio III.

Dans quatre séries de trois tubes, on introduit:

0,5 ml de la dilution du virus inconnu dans tous les tubes, puis:

1 goutte de sérum polio I dans les tubes de la 1^{re} série,

1 goutte de sérum polio II dans les tubes de la 2^e série,

1 goutte de sérum polio III dans les tubes de la 3^e série,

pas de sérum dans les tubes de la 4^e série (témoins).

On laisse en contact trois heures à l'étuve à 37 °.

Dans un quatrième temps, on transvase les contenus de tous les tubes sur cellules (de rein de singe par exemple) que l'on recharge avec 0,5 ml de milieu de Hanks sans sérum.

On reporte à l'étuve et on pratique les lectures les deuxième et troisième jour et enfin le quatrième jour où a lieu la lecture définitive.

La série des tubes où ne s'observe aucune destruction cellulaire indique que le sérum étalon introduit dans ces tubes a neutralisé le virus inconnu qui est ainsi identifié comme un virus poliomyélitique de même type que ledit sérum. Dans les autres séries ainsi

naturellement que dans la série des tubes témoins, les cellules ont subi l'effet cyto-pathogène.

8. Détermination du pouvoir pathogène

La détermination du pouvoir pathogène du virus isolé et identifié peut être pratiquée par inoculation au singe qui est l'animal de choix. Cette recherche tout à fait spéciale est actuellement confiée au Service des virus de l'Institut Pasteur de Paris (Service de M. le Professeur Lépine).

9. Le problème de la cytotoxicité

Le problème de la cytotoxicité des eaux s'est trouvé posé du fait même de l'emploi de cellules vivantes pour la recherche des virus dans les milieux extérieurs. En effet, les cultures cellulaires nécessaires à la croissance et à la multiplication de ces virus constituent par elles-mêmes, en dehors de toute présence virale, un test biologique des plus sensibles.

Actuellement, la cytotoxicité des eaux correspond à deux notions distinctes:

- le pouvoir cytotoxique direct:
- l'aptitude des eaux à la survie et à la croissance des explants cellulaires.

9.1. — *Le pouvoir cytotoxique direct*, d'origine inconnue, correspond à l'effet toxique qu'exercent les inoculums sur les cultures cellulaires au cours des essais d'isolement des virus. Il est indépendant de l'effet cyto-pathogène de source virale et, contrairement à ce dernier, il n'est pas transmissible en série et ne se produit qu'au premier passage, s'éliminant par simple effet de dilution.

9.2. — *L'aptitude des eaux à la survie et à la croissance des explants cellulaires* est une notion plus nouvelle. Elle est mise en évidence en prenant l'eau à tester comme moyen de dilution des milieux nutritifs concentrés utilisés pour les cultures de tissus.

Des essais de cette nature sont pratiqués systématiquement au Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris depuis plusieurs mois sur les eaux de surface et sur les eaux d'alimentation. La technique de ces essais est la suivante:

- L'eau à étudier est traitée tout d'abord:
 - soit par l'autoclave à 120 °
 - soit par les antibiotiques usuels (néomycine, pénicilline)
 les deux procédés de stérilisation sont actuellement utilisés conjointement dans le but de déterminer la méthode convenant le mieux aux recherches poursuivies.
- Le milieu d'hydrolysats de caséine est réalisé en employant comme eau de base l'eau à étudier:

hydrolysats de caséine
concentré 10 fois 10 ml

eau à étudier après auto-clavage ou addition d'antibiotiques 90 ml
sérum de veau filtré 10 ml
néomycine 50 mg/l
pénicilline 100 000 unités
bicarbonate au rouge de phénol Q. S. pour la neutralisation

- L'épreuve se fait sur cellules KB.
On prend 5 tubes par échantillon comprenant chacun:
0,1 ml de suspension cellulaire à 1 000 000 cellules/ml et on ajoute
1 ml du milieu ci-dessus.
Une épreuve témoin est effectuée avec de l'eau bidistillée.
- Les tubes sont portés à l'étuve à 37 ° C.
- Deux lectures sont pratiquées:
une première au troisième jour (changer le milieu des tubes avec du milieu conservé à + 4 ° C)
une deuxième au huitième jour.
- La notation des résultats s'effectue pour chaque tube de la manière suivante:

Notation	Etat des cellulesensemencées	
	Survie	Croissance
0	Destruction totale	—
1	Destruction subtotale	Absence de multiplication
2	Destruction partielle	Croissance faible
3	Destruction nulle	Culture abondante
4	—	Culture confluyente

Annexe

Milieux nutritifs spéciaux pour la culture des tissus

Solution de Earle

NaCl 6,80 g
KCl 0,40 g
CaCl₂ 0,20 g
MgSO₄ - 7 H₂O 0,10 g
NaH₂PO₄, H₂O 0,125 g
Dextrose 1,00 g
NaHCO₃ 2,20 g
Eau bidistillée Q. S. pour 1 litre

Solution de Hanks

1° Préparer séparément les solutions suivantes:

Solution A:

NaCl 80 g
KCl 4 g
Mg SO₄ - 7 H₂O 2 g
Ca Cl₂ 1,4 g

Dissoudre successivement les sels dans de l'eau bidistillée puis compléter avec eau bidistillée jusqu'à 500 ml.

Solution B:

Na₂HPO₄, 12 H₂O 1,5 g
ou Na₂HPO₄, 2 H₂O 0,6 g

KH ₂ PO ₄	0,6 g
Glucose	10,0 g

Compléter avec de l'eau bidistillée jusqu'à 400 ml. Ajouter 100 ml de solution de rouge phénol à 0,1 % et stériliser à la vapeur fluente (autoclave ouvert).

2° Pour obtenir la solution de Hanks concentrée:

Mélanger les deux solutions, filtrer sur filtre de Seitz ou de Schott, conserver à la glacière (+4° C).

3° Pour obtenir la solution de Hanks finale, préparer à l'avance la

Solution C:

Na HCO ₃	1,4 g
Eau bidistillée	100 ml

Stériliser à l'autoclave.

On mélange une partie de la solution de Hanks concentrée avec neuf parties d'eau bidistillée stérile. A 100 ml de ce mélange, on ajoute 2,5 ml de solution C au moment de l'emploi. On y ajoute, le cas échéant, 50 à 100 unités de pénicilline et 50 µg de streptomycine par ml de milieu.

Hydrolysats de caséine concentrée

Pour 2 litres de milieu:

ClNa	136 g
ClK	8 g
Cl ₂ Ca	5,3 g
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	4 g
PO ₄ H ₂ Na pur cristallisé	3,12 g
Dextrose	20 g
Hydrolysats	20 g
A. Ascorbique	1 g
Cystéine	0,2 g
Glutamine	3 g
A. Folique	20 g
Biotine	20 g
Nicotinamide	20 g
Pyridoxine ou adermine	20 g
Thiamine	20 g
Penthotenate de Ca	20 g

A. Paraminobenzoïque	20 g
Choline	20 g
Riboflavine	2 g

Antibiotiques:

Streptomycine	1 g
Pénicilline	2 000 000 u
Mycostatine	20 mg

Sérum de poulain ou de veau

Le sérum est prélevé chez des animaux neufs et sains et filtré sur bougie Chamberland L₃. Il est conservé à +4°.

On l'emploie à des concentrations variant de 10 à 40 % dans les milieux naturels ou synthétiques.

Entretien des souches de cellules KB

- Hydrolysats de caséine sous forme concentrée (10 fois). Diluer au moment de l'emploi en versant 96 ml pour 960 ml de bouillon.
- Solution de Bicarbonate à 55‰ au rouge de phénol. Verser deux ampoules de 20 ml chacune.
- 100 ml de sérum de veau, donc 1/10 du volume de milieu. Il faut en mettre entre 10 à 15 %.
- Un flacon de poudre de pénicilline soit 1 000 000 d'unités.
- Néomycine 50 mg/l. On utilise des flacons de 150 mg. On ajoute 3 ml d'eau physiologique à la poudre du flacon. On verse 1 ml dans le milieu.
- Mycostatine pour lutter contre les moisissures (3 ou 4 gouttes).

Entretien des cellules de rein de singe

- Changer les tubes avec le milieu suivant:
 - 1 ampoule de 50 ml de solution de Hanks
 - 1 ampoule de 50 ml de solution de Parker
 - 1 ampoule de 20 ml de la solution de bicarbonate + rouge de phénol.
- Eau distillée: quantité suffisante 1000 ml (c'est-à-dire 880 ml).
- Additionner les antibiotiques suivants:

Pénicilline	1 000 000 d'unités
Néomycine	50 mg
Mycostatine	quelques gouttes

Virologische Untersuchungsmethoden

Coin und Ménétrier

Die Forschung nach Viren in Gewässern bedingt spezielle Untersuchungsmethoden, schon im Hinblick auf das Untersuchungsobjekt, den Virus, der nur im Elektronenmikroskop festgestellt werden kann und dessen Vermehrung

nur in der lebenden Zelle möglich ist. Die dargestellten Methoden sind das Resultat der Arbeiten des Hygienelaboratoriums der Stadt Paris, welches letzteres seit mehreren Jahren an Flüssen, bei Ausläufen von Spitälern und beim Trinkwassernetz systematische Proben entnimmt, um allfällig vorhandene Viren festzustellen. Die Proben werden konzentriert, um Viren feststellen zu können;

sie werden gereinigt, um andere Krankheitskeime oder Saprophyten davon zu trennen, und schliesslich werden die Viren auf Zellkulturen oder dafür empfindliche Tiere eingimpft. Auf diesen Kulturen müssen die Viren identifiziert und ihr pathogener Wirkungsgrad bestimmt werden. Ein spezieller Anhang informiert über die einzelnen Nährlösungen u. a. m.