



À Chatôgne

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE

PAR

HÉLÈNE BÉLANGER

MISE AU POINT DE LA MÉTHODE D'ADSORPTION ET D'ÉLUTION POUR LA  
CONCENTRATION DES ROTAVIRUS À PARTIR DE L'EAU USÉE

SEPTEMBRE 1992

---

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
SOMMAIRE.....	xi
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1 LES ROTAVIRUS.....	5
1.1 Description.....	6
1.2 Classification.....	7
1.3 Pathologie.....	7
1.4 Incidence.....	8
1.5 Transmission.....	9
2 CONCENTRATION DES VIRUS ENTÉRIQUES DANS L'EAU.....	11
2.1 Principe de base des méthodes d'adsorption et élution.....	13
2.2 Paramètres influençant l'adsorption et l'élution.....	14
2.2.1 Le pH.....	14
2.2.2 Les sels.....	15
2.2.3 Les filtres.....	15
2.2.4 La nature de l'eau traitée.....	17
2.2.5 Le débit d'écoulement.....	18
2.2.6 L'agent éluant.....	18
2.3 Développement de la technique d'adsorption et d'élution.....	20
3 CONCENTRATION DES ROTAVIRUS.....	25
3.1 Adsorption.....	25
3.2 Élution.....	26
3.3 Seconde étape de concentration.....	28
4 DÉTECTION DES VIRUS ENTÉRIQUES.....	31

4.1	Effets cytopathiques et technique des plages .....	31
4.2	Méthodes immunologiques .....	32
4.2.1	L'immuno-électromicroscopie.....	32
4.2.2	Les tests immuno-enzymatiques.....	33
4.2.3	L'immunofluorescence et l'immunoperoxidase.....	33
4.3	Sondes génomiques .....	34
5	MISE EN ÉVIDENCE DES ROTAVIRUS DANS L'EAU.....	36
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		38
1	PRODUCTION DU VIRUS ET CULTURES CELLULAIRES.....	39
1.1	Cultures cellulaires.....	39
1.1.1	Dispersion des cellules.....	39
1.2	Virus.....	40
1.2.1	Production du SA-11 .....	40
1.2.2	Traitement au fréon de la production virale.....	41
2	DÉTECTION ET TITRAGE DES VIRUS.....	42
2.1	Préparation des échantillons .....	42
2.2	Détection du SA-11 par immunoperoxidase indirecte .....	42
2.3	Évaluation du titre viral par la méthode du NPP .....	43
3	MISE AU POINT DE LA MÉTHODE DE CONCENTRATION .....	45
3.1	Pré-conditionnement.....	45
3.2	Évaluation de l'adsorption .....	47
3.2.1	Filtres .....	47
3.3	Évaluation de l'élution.....	48
3.3.1	Solutions éluantes.....	48
3.3.2	Préparation des solutions éluantes.....	49
3.3.3	Stabilité du SA-11 dans les solutions éluantes.....	49
4	MISE À L'ÉCHELLE .....	50
4.1	Volume de solution éluante .....	50
5	CONCENTRATION À PARTIR DE L'EAU USÉE .....	51
5.1	Clarification de l'eau usée.....	51
5.2	Re-concentration .....	51
6	MISE EN ÉVIDENCE DU ROTAVIRUS DANS L'EAU USÉE.....	53

RÉSULTATS.....	54
1 PRÉPARATION ET TITRAGE DES STOCKS DE SA-11 .....	55
2 ÉVALUATION DE LA MÉTHODE D'ADSORPTION ET ÉLUTION ...	58
2.1 Filtres électronégatifs.....	58
2.1.1 Effet du pré-conditionnement.....	58
2.1.2 Adsorption sur filtres électronégatifs placés en série 1:1:1 .....	60
2.1.3 Adsorption sur filtres électronégatifs placés en série 1:2:2 .....	60
2.1.4 Évaluation de l'éluion .....	60
2.1.5 Stabilité dans les solutions éluantes .....	64
2.2 Filtres électropositifs .....	66
2.2.1 Évaluation de l'adsorption.....	66
2.2.2 Évaluation de l'éluion .....	66
3. MISE À L'ÉCHELLE .....	69
3.1 Évaluation de l'adsorption .....	69
3.2 Évaluation de l'éluion.....	69
4 CONCENTRATION À PARTIR DE L'EAU USÉE .....	72
4.1 Évaluation de l'adsorption .....	72
4.2 Évaluation de l'éluion.....	72
5 PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM.....	74
6 RECHERCHE DE ROTAVIRUS DANS L'EAU USÉE .....	75
DISCUSSION.....	77
1. PRÉPARATION ET TITRAGE DES STOCKS DE SA-11 .....	79
2 ÉVALUATION DE LA MÉTHODE D'ADSORPTION ET ÉLUTION ...	81
2.1 Filtres électronégatifs.....	81
2.1.1 Effet du pré-conditionnement .....	81
2.1.2 Adsorption .....	82
2.1.3 Éluion .....	83
2.2 Filtres électropositifs .....	86
2.2.1 Adsorption .....	87
2.2.2 Éluion .....	87
3 MISE À L'ÉCHELLE .....	90
4 CONCENTRATION À PARTIR DE L'EAU USÉE .....	92
5 RECHERCHE DE ROTAVIRUS DANS L'EAU USÉE .....	93

CONCLUSION .....	95
REMERCIEMENTS.....	98
BIBLIOGRAPHIE.....	100

## LISTE DES TABLEAUX

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU I	Méthodes utilisées pour la concentration des virus dans l'eau	12
TABLEAU II	Filtres utilisés pour la concentration des virus	16
TABLEAU III	Solutions utilisées pour l'élution des virus	19
TABLEAU IV	Développement de la méthode d'adsorption/élution	21
TABLEAU V	Efficacité de différents agents éluants	27
TABLEAU VI	Seconde étape de concentration du rotavirus	29

## RÉSULTATS

TABLEAU VII	Titre moyen des stocks de SA-11	56
TABLEAU VIII	Proportion de SA-11 détecté suite à une dilution 1:100 dans l'eau	57
TABLEAU IX	Adsorption du SA-11 et du Sabin I sur filtres électro-négatifs placés en série 1:1:1 et 1:2:2	62
TABLEAU X	Élution du SA-11 adsorbé sur filtres électro-négatifs	63
TABLEAU XI	Stabilité du SA-11 dans les solutions éluantes	65
TABLEAU XII	Élution du SA-11 adsorbé sur filtres 1 MDS	68
TABLEAU XIII	Analyse des concentrés inoculés sur les cellules MA-104	76

**LISTE DES FIGURES****MATÉRIEL ET MÉTHODES**

<b>FIGURE I</b>	<b>Méthode d'évaluation de l'efficacité de l'adsorption et de l'élution</b>	<b>46</b>
-----------------	---	-----------

**RÉSULTATS**

<b>FIGURE II</b>	<b>Proportion de SA-11 détecté dans l'eau suite au pré-conditionnement</b>	<b>59</b>
<b>FIGURE III</b>	<b>Adsorption du SA-11 sur les filtres électro-négatifs en série 1:1:1</b>	<b>61</b>
<b>FIGURE IV</b>	<b>Adsorption du SA-11 et du Sabin sur les filtres 1 MDS</b>	<b>67</b>
<b>FIGURE V</b>	<b>Élution du SA-11 adsorbé sur filtres 1 MDS avec 10 fractions de 100 mL d'E.B. 1,5% à pH 9,8.</b>	<b>70</b>
<b>FIGURE VI</b>	<b>Élution du SA-11 adsorbé sur filtres 1 MDS avec E.B. 1,5% à pH 9,8</b>	<b>71</b>
<b>FIGURE VII</b>	<b>Élution du SA-11 ajouté à de l'eau usée</b>	<b>73</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	: acide ribonucléique
B.T.P.	: bouillon tryptose phosphate
DICT50	: dose infectieuse 50%
E.B.	: extrait de boeuf
ECP	: effet cytopathique
EDIM	: virus de la diarrhée épizootique de souris
IEM	: immuno-électromicroscopie
IF	: immunofluorescence
IFF	: foyer d'immunofluorescence
IP	: immunoperoxidase
ME	: microscopie électronique
N	: normalité
NPP	: nombre le plus probable
NPPUC	: nombre le plus probable d'unité cytopathique
NPPUI	: nombre le plus probable d'unité infectieuse
PM	: poids moléculaire
S.A.	: sulfate d'ammonium
SVF	: sérum de veau foetal
PBS -Mg -Ca:	tampon phosphate sans magnésium et sans calcium
U	: unité
UFP	: unité formatrice de plaque

## **SOMMAIRE**

---

La méthode de concentration de virus par adsorption et élution a été mise au point pour la concentration du rotavirus à partir d'eau usée. L'évaluation de la méthode qui s'est d'abord faite à partir de petits volumes d'eau dé-ionisée nous a permis de constater qu'il n'était pas possible d'obtenir une élution efficace lorsque le SA-11 était adsorbé sur les filtres de fibres de verre électro-négatifs. Une meilleure récupération (38%) a été obtenue en utilisant les filtres électro-positifs de type 1 MDS. L'élution la plus efficace a été obtenue avec de l'extrait de boeuf 1,5% à pH 9,8. Lorsque cette méthode a été utilisée pour le traitement de 20 litres d'eau du robinet artificiellement contaminée avec du SA-11, nous avons obtenu sensiblement les mêmes récupérations que pour le traitement de petits volumes d'eau. Lorsque cette méthode a été utilisée en combinaison avec la précipitation au sulfate d'ammonium pour le traitement de 20 litres d'eau usée, nous n'avons obtenu qu'une récupération de 2% du SA-11 ajouté à l'eau. À l'aide de cette méthode, nous avons pu mettre en évidence la présence de rotavirus dans de l'eau usée de la ville de Laval sans toutefois pouvoir en déterminer la quantité.

## **INTRODUCTION**

---

L'infection par les rotavirus est une des principales causes des gastroentérites chez les enfants de moins de deux ans. Bien que les mécanismes de transmission des rotavirus ne soient pas clairement identifiés, il est possible de croire que l'eau contaminée avec des matières fécales pourrait jouer un rôle important dans la propagation de ce virus (Murphy *et al.*, 1983; Hung *et al.*, 1984). Puisque les virus se retrouvent dans l'eau de façon très dilués, des techniques de concentration efficaces sont nécessaires pour mettre en évidence leur présence dans l'eau. La méthode la plus utilisée est celle qui dépend de l'adsorption des virus à la surface d'un filtre micro-poreux et de leur désorption subséquente par le passage d'un faible volume de solution éluante. Cette méthode de concentration de virus à partir de l'eau a été développée pour la concentration du poliovirus (Cliver, 1967; Wallis *et al.*, 1972b; Sobsey *et al.*, 1973; Farrah *et al.*, 1976). Récemment, la méthode d'adsorption et d'élution a été utilisée pour mettre en évidence la présence du rotavirus dans différents types d'eau (Deetz *et al.*, 1984; Gerba *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1986 et 1987). Pourtant, à l'aide de cette même méthode, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence de rotavirus dans les eaux usées de la région de Montréal. Pour être en mesure de conclure sur la présence ou l'absence de rotavirus dans les eaux de cette région, il faut dans un premier temps s'assurer de l'efficacité de la méthode utilisée pour en faire la mise en évidence. En effet, plusieurs difficultés peuvent être rencontrées lorsque l'on procède à la concentration de virus par adsorption et élution. L'efficacité de cette méthode, basée sur les interactions électrostatiques et hydrophobiques entre la surface adsorbante et les virus, est dépendante de plusieurs facteurs tels les conditions ioniques du milieu de suspension des virus, le type de filtre adsorbant ainsi que le volume et la nature de la solution éluante.

Le but de nos travaux était donc d'optimiser la méthode d'adsorption et d'élution pour la concentration des rotavirus. Pour ce faire, nous avons évalué la méthode déjà utilisée en

traitant des petits volumes d'eau artificiellement contaminés avec du rotavirus simien SA-11. Nous avons par la suite modifié les conditions d'adsorption et d'élution pour obtenir une concentration efficace du rotavirus. La méthode mise au point a ensuite été évaluée pour le traitement de grands volumes d'eau et pour le traitement de l'eau usée. Finalement, nous avons effectué un échantillonnage d'eau usée à partir duquel nous avons tenté de mettre en évidence la présence de rotavirus à l'aide de la méthode mise au point.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1 LES ROTAVIRUS

Les gastro-entérites sporadiques ou saisonnières sont les maladies d'enfants les plus communes à travers le monde. Elles ont une signification importante dans les pays en voie de développement où elles constituent une cause majeure de mortalité chez les jeunes enfants (Wyatt *et al.*, 1978).

En 1963, Adams et Kraft ont décrit, à l'aide de la microscopie électronique, des particules virales dans les tissus intestinaux de souris infectées avec le virus de la diarrhée épizootique de souris (EDIM). Mebus *et al.* ont observé en 1969 la présence d'un agent infectieux non-bactérien responsable de la diarrhée chez le veau nouveau-né. En 1973, Bishop *et al.* ont décrit des particules virales de 70 nm dans des biopsies duodénales d'enfants hospitalisés pour gastro-entérites sévères. L'apparence de ces particules isolées chez l'humain et les bovins était similaire à celle du virus EDIM. À partir de la morphogénèse observée dans les tissus, il a été suggéré de classer ces virus parmi les orbivirus dans la famille des *Reoviridae*. Peu de temps après, des particules semblables aux orbivirus ou réovirus ont été retrouvées dans des suspensions de selles partiellement purifiées provenant d'enfants souffrant de diarrhée (Flewett *et al.*, 1973). Des particules similaires ont aussi été détectées en association avec des maladies diarrhéiques chez d'autres espèces animales (McNulty, 1978). À l'aide des techniques de coloration négative, une distinction a pu être établie entre la capsid externe bien définie de ces virus ressemblant aux orbivirus et la capsid externe amorphe des véritables orbivirus. De plus, aucune réaction sérologique croisée n'a pu être trouvée entre ces nouveaux virus et les réovirus de type 1, 2, 3 et les orbivirus (Kapikian *et al.*, 1974). Les membres de ce nouveau groupe de virus ont été appelés rotavirus, duovirus ou virus de la gastro-entérite infantile, mais le terme rotavirus a été celui retenu par le Comité international de taxonomie des virus (Matthews, 1979). Plus

tard, il a été démontré que l'agent simien SA-11, isolé en 1963 par Malherbe, de même que l'agent simien O, décrit en 1967 par le même auteur, possédaient les caractéristiques morphologiques et les groupes d'antigènes communs au rotavirus (Bishop *et al.*, 1986).

### 1.1 Description

Sur la base de leurs morphologie, composition chimique et mode de répllication, les rotavirus sont classés comme genre dans la famille des *Reoviridae*. Le nom, dérivé du mot latin «rota» signifiant roue, décrit ainsi l'apparence du virus lorsqu'observé en microscopie électronique en coloration négative. Les virions parfaitement sphériques mesurent de 65 à 70 nm de diamètre. En coloration négative, trois éléments constitutifs sont visibles: un corps central de 38 nm qui contient les acides nucléiques, une capsidie majeure de 58 nm de diamètre et une capsidie périphérique de 68 nm de diamètre. Les populations virales contiennent toujours deux types de particules; soit L et D. La particule L représente le virion complet, infectieux. La particule D, qui mesure de 50 à 55 nm de diamètre, ne possède pas de capsidie périphérique et ne semble pas infectieuse (Scherrer et Cohen, 1978). Les proportions de particules L et D peuvent être variables selon le stade de la diarrhée.

Le génome du rotavirus est formé de 11 segments d'acide ribonucléique (ARN) bicaténaire dont les poids moléculaires (PM) varient de 0,2 à 2,2  $10^6$ . Ces 11 segments dirigent la synthèse de 11 polypeptides de poids moléculaire variant entre 2 000 et 125 000 (Mason *et al.*, 1980). La composante structurale principale de la particule virale est une protéine de poids moléculaire de 44 816, la VP6. Cette dernière, qui constitue la capsidie majeure, est le produit du gène situé sur le 6<sup>ième</sup> segment d'ARN. La capsidie périphérique est composée des protéines VP5, VP7 et VP8. La VP7 (PM: 33 919) est le produit du gène situé sur le 9<sup>ième</sup> segment du génome alors que les VP5 et VP8 sont le résultat du clivage de la VP4 (PM: 86 751) codée par le 4<sup>ième</sup> segment. Le nucléoïde de la particule virale est

composé de 3 polypeptides de poids moléculaire de 125 005, 94 000 et 88 000, soit les VP1, VP2 et VP3. Ces dernières sont respectivement les produits des gènes situés sur les 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> segments du génome. Les 5<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, 8<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> segments, codent pour cinq protéines non-structurales.

## 1.2 Classification

La classification des rotavirus les divise en six groupes («sérogroupes» A, B, C, D, E et F) à l'intérieur desquels on distingue différents sérotypes. Les épitopes communs de la protéine de la capsidie majeure (VP6) sont ceux qui permettent la classification en six groupes différents. Ces épitopes sont généralement détectés par tests sérologiques à l'aide d'antisérums mono-spécifiques ou d'anticorps monoclonaux (Pedley *et al.*, 1983). L'identification des différents sérotypes à l'intérieur d'un même groupe est basée sur la distinction des épitopes des protéines de la capsidie périphérique (principalement la VP7 qui est plus abondante) à l'aide de sérums hyperimmuns (Birch *et al.*, 1988; Coulson *et al.*, 1987). Jusqu'à maintenant, la classification par sérotypes a été appliquée presque exclusivement aux rotavirus du groupe A. Ainsi, neuf sérotypes ont été identifiés à l'intérieur du groupe A, dont six sérotypes humains, quatre sérotypes animaux et un sérotype aviaire.

## 1.3 Pathologie

Depuis leur description en 1973, les rotavirus se sont révélés être la cause la plus importante des diarrhées nécessitant l'admission à l'hôpital pour traitement de gastro-entérite (Senturia, 1986). La période d'incubation est de 24 à 48 heures chez les enfants et peut être de plus de trois jours chez l'adulte. Après contamination via la voie orale, la multiplication virale se fait dans les cellules épithéliales matures qui revêtent la portion supérieure des

villosités de l'intestin grêle. Suite à la lyse des cellules, les particules virales sont libérées dans la lumière intestinale. Ces infections provoquent des dommages aux tissus et résultent en une malabsorption des glucides entraînant la maladie clinique (Hrdy, 1987). Des vomissements se produisent assez tôt et sont suivis d'une diarrhée explosive et liquide qui peut durer de cinq à sept jours. Les virus sont excrétés dans les selles à partir du troisième jour suivant l'infection (Senturia, 1986). Les infections aiguës peuvent être fatales chez les jeunes enfants alors que chez l'adulte l'infection est en général asymptomatique (Riepenhoff-Talty *et al.*, 1986).

#### 1.4 Incidence

Les rotavirus ont une distribution mondiale qui est indiquée par la présence presque universelle chez l'homme d'anticorps contre le rotavirus. L'incidence des infections chez l'homme est similaire pour tous les groupes d'âges alors que le taux de maladies causées par les rotavirus est plus élevé chez les enfants de 6 à 24 mois (Bishop, 1986). Bien que la maladie à rotavirus soit aussi fréquente dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, la maladie est rarement fatale dans les pays industrialisés (Kapikian et Chanock, 1990). Cette situation peut être attribuée au développement et à l'utilisation routinière, dans ces pays, de moyens efficaces de remplacement des fluides et électrolytes perdus durant la maladie. Dans les pays à climat tempéré, les infections par le rotavirus montrent un patron saisonnier caractéristique (Hejkal *et al.*, 1984). En effet, c'est lors des saisons froides que l'on retrouve le nombre le plus élevé de gastro-entérites à rotavirus. Dans les régions tropicales, les infections à rotavirus semblent être présentes à longueur d'année avec une légère augmentation durant la période de faible précipitation ou de faible humidité.

Les études épidémiologiques sur les souches de rotavirus présentes dans les communautés ont rapporté des résultats similaires partout à travers le monde. Les rotavirus

du groupe A sont reconnus comme étant la cause des maladies intestinales chez les jeunes enfants. Les rotavirus du groupe B sont associés aux épidémies annuelles de diarrhée chez les adultes en Chine (Hung *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1985). Les rotavirus du groupe C ont été détectés sporadiquement dans les selles d'enfants malades mais leur signification clinique est encore mal connue (Nakata *et al.*, 1986).

### 1.5 Transmission

Bien que l'infection par les rotavirus soit fréquente chez les humains et les animaux, et ceci partout à travers le monde, les mécanismes exacts de propagation de ce virus ne sont pas clairement identifiés. La transmission se fait par la voie fécale-orale (Senturia, 1986). Le premier mécanisme de propagation serait probablement intra-familial par contact avec des individus infectés (McNulty, 1978). La contamination via l'environnement pourrait aussi jouer un rôle important dans la transmission des rotavirus. Étant des agents pathogènes de l'intestin, ces virus sont libérés dans l'environnement via les selles. De  $10^{10}$  et  $10^{11}$  particules virales par gramme de selles peuvent être excrétées par les individus infectés (Flewett, 1982). Ainsi, les objets et surfaces contaminés (Keswick *et al.*, 1983; Sattar *et al.*, 1986), les gouttes et poussières dans l'air (Ijaz., 1985) de même que l'eau (McDaniels *et al.*, 1983; Deetz *et al.*, 1984; Boardman et Evans, 1986; Hrdy, 1987) pourraient jouer un rôle important comme véhicules de propagation du rotavirus.

La contamination virale de l'homme à partir de l'eau peut se produire par ingestion, contact ou inhalation (McNulty, 1978). Des virus ont été détectés dans tous les types d'eau, la principale source de contamination étant toujours les excréments et les eaux usées (Bock, 1983). Des eaux dont la qualité respecte les standards bactériologiques ont montré des taux de contamination virale alarmants (Deetz *et al.*, 1984). Aux États Unis, entre 1971 et 1984, 39 épidémies de maladies d'origine hydrique touchant 6 600 cas furent causées par des virus

dont les rotavirus (Berger et Regli, 1988). On sait que les rotavirus sont capables de survivre dans l'eau suffisamment longtemps pour être transmis via cette route (Hurst et Gerba, 1980; McDaniels *et al.*, 1983; Raphael *et al.*, 1985a) et qu'ils sont capables de résister à certaines concentrations de chlore (Deetz *et al.*, 1984; Raphael *et al.*, 1987). Un faible niveau de transmission de rotavirus par l'eau pourrait jouer un rôle significatif dans la propagation de cet agent.

## 2 CONCENTRATION DES VIRUS ENTÉRIQUES DANS L'EAU

Les risques actuels pour la santé publique que représente la contamination des eaux par les rotavirus ne sont pas bien connus. Cette situation est due aux difficultés que présentent la détection et le dénombrement des rotavirus dans l'eau. Étant donné que les virus se retrouvent dans l'eau de façon très diluée, de grands volumes d'eau doivent être analysés pour mettre en évidence leur présence. Les méthodes couramment utilisées pour la détection des virus ne peuvent être pratiquées que sur des échantillons de petits volumes. Ainsi, il faut réduire la taille des échantillons à des volumes rendant possible la détection et le dénombrement. C'est ainsi qu'une grande variété de méthodes de concentration des virus à partir de l'eau furent d'abord développées pour ensuite pouvoir déterminer l'étendue de la contamination virale des eaux.

La concentration des virus dans l'eau est une stratégie selon laquelle on doit tenir compte de la complexité de l'environnement d'où les virus doivent être isolés, de la nature des virus et de leurs interactions avec leur milieu. Plusieurs procédés biochimiques utilisés pour la concentration et la purification de protéines ont été expérimentés (Tableau I). La plupart de ces méthodes se sont montrées efficaces en laboratoire pour la concentration des virus mais ont vu leur application se limiter qu'au traitement de faibles volumes d'eau hautement contaminée et de faible turbidité. Les méthodes qui se sont montrées les plus prometteuses et qui ont vu une plus grande application sont celles qui dépendent de l'adsorption des virus sur une surface adsorbante et de leur dé-adsorption subséquente par le passage d'un faible volume d'une solution éluante.

**Tableau I: Méthodes utilisées pour la concentration des virus dans l'eau**

<b>Méthode de concentration</b>	<b>Référence</b>
Tampon de gaz	Melnick <i>et al.</i> , 1954; Berg <i>et al.</i> , 1966; Liu <i>et al.</i> , 1971
Ultrafiltration	Fattal <i>et al.</i> , 1974; Nupen <i>et al.</i> , 1981; Belfort <i>et al.</i> , 1974
Hydro-extraction	Cliver, 1965; Moore <i>et al.</i> , 1974
Électrophorèse à courant forcé et électro-osmose	Sweet et Ellender, 1972; Ellender <i>et al.</i> , 1972
Séparation en deux phases	Albertsson, 1974; Philipson <i>et al.</i> , 1960; Shuval <i>et al.</i> , 1969
Ultracentrifugation	Cliver et Yeatman, 1965; Anderson <i>et al.</i> , 1967; Mack <i>et al.</i> , 1972
Floculation organique	Katzenelson <i>et al.</i> , 1976; Landry <i>et al.</i> , 1978
Concentration par gel	Rubenstein <i>et al.</i> , 1971

## 2.1 Principe de base des méthodes d'adsorption et élution

La base fondamentale des méthodes d'adsorption et élution est le mécanisme par lequel les virus s'adsorbent sur une surface.

L'adsorption des virus sur la surface de filtres micro-poreux est contrôlée par des interactions électrostatiques et hydrophobiques (Mix, 1974). Les virus sont des bi-colloïdes et leur comportement s'explique par les phénomènes électrostatiques selon les concepts de la chimie des colloïdes. Dans une solution neutre et dans la plupart des eaux naturelles, les virus sont chargés négativement (Gerba, 1983); il se fait donc une forte répulsion ou une forte attraction électrostatique entre les virus et un filtre adsorbant selon la charge portée par ce filtre. Cette répulsion ou attraction dépend des charges de surface, mais aussi de la distribution des ions dans le milieu où se passent ces interactions. Les forces électrostatiques peuvent être contrôlées en modifiant certains facteurs du milieu, tels le pH et la concentration en électrolytes.

Une particule, comme un virus, immergée dans une solution aqueuse développe des charges de surface en adsorbant des ions du milieu. Une couche fixe d'ions se développe autour de la particule annulant pratiquement la charge originale de celle-ci. Ceci a pour effet de modifier la distribution des ions du milieu l'entourant. Ainsi, pour maintenir tout le système électriquement neutre, une couche diffuse contenant un nombre suffisant de contre-ions se développe dans le voisinage de la particule. Dans cette couche diffuse, la densité de contre-ions est plus grande que dans le milieu et l'épaisseur de cette même couche dépend de la concentration des ions positifs et négatifs dans le milieu. Si la concentration en électrolytes dans le milieu devient importante, soit par addition de sels cationiques ou par un pH décroissant, l'épaisseur de la couche diffuse diminue par dispersion des contre-ions dans le

milieu. La réduction de l'épaisseur de cette couche facilitera donc l'accès vers la particule et permettra aux forces de van der Waal d'agir entre la surface adsorbante et la particule.

La dé-adsorption des virus de la surface adsorbante se fera par le passage d'un faible volume d'une solution qui sera en mesure de renverser les conditions qui, dans un premier temps, avaient permis leur adsorption et ainsi le détachement des particules virales sera favorisé par la solution éluante.

## **2.2 Paramètres influençant l'adsorption et l'éluion**

### **2.2.1 Le pH**

Le contrôle du pH est d'une importance considérable pour l'adsorption des virus. En général, les protéines comme celles qui composent la surface des virus sont chargées négativement au-dessus de leur point isoélectrique et positivement sous leur point isoélectrique (Gerba, 1983). L'adsorption des virus sur des filtres micro-poreux et autres adsorbants exploite ce phénomène. Avec des filtres chargés négativement comme la fibre de verre, l'échantillon d'eau est porté à un pH acide (inférieur à 5) qui agit pour réduire la charge négative nette sur le virus, permettant une adsorption optimale du virus à la surface du filtre. L'éluion des virus se fait en passant une solution à pH alcalin (au-dessus de 8) à travers le filtre, ce qui augmente la charge négative du virus, favorisant ainsi son détachement de la surface du filtre adsorbant. Les interactions hydrophobiques interviennent à des pH élevés alors que les interactions électrostatiques ont une influence majeure à des pH acides (Farrah et Shields, 1981). Le point isoélectrique des virus entériques varie entre les pH 3 et 7 (Gerba et Goyal, 1982). Cette variation du point isoélectrique peut entraîner des variations au niveau des conditions pour l'adsorption de différents virus sur des surfaces adsorbantes identiques et peut expliquer l'étendue des variations observées dans l'efficacité d'adsorption.

### 2.2.2 Les sels

La concentration en électrolytes dans l'échantillon à traiter est contrôlée par l'addition de sels divalents ou trivalents. Cette intervention favorise l'adsorption des virus en augmentant les forces électrostatiques entre la surface du filtre micro-poreux et les virus. Un certain nombre de sels ont été testés, notamment le chlorure de magnésium, le chlorure de calcium, le sulfate d'ammonium, le phosphate diacide de potassium, le chlorure de sodium, le chlorure d'aluminium (S.A.) et le sulfate d'aluminium (Gerba et Goyal, 1982). Ces sels ont une efficacité décroissante allant des cations trivalents aux cations monovalents (Kessick et Wagner, 1978). Ainsi les sels trivalents peuvent être utilisés à 1% des concentrations nécessaires pour les sels divalents (Kessick et Wagner, 1978). Le chlorure d'aluminium s'est montré efficace à des valeurs de pH variant entre 3,5 et 7,0 (Smith et Gerba, 1982a). Une concentration élevée de cations peut avoir comme conséquence une diminution de l'adsorption des virus sur le filtre (Gerba et Goyal, 1982).

### 2.2.3 Les filtres

Des filtres d'une grande variété de composition chimique sont disponibles sur le marché. Les filtres les plus utilisés pour la concentration des virus par adsorption et élution, sont principalement composés de cellulose, d'époxy et de fibre de verre (Tableau II).

L'aire de la surface à travers laquelle la solution est filtrée affecte la quantité de virus adsorbée sur le filtre. Puisqu'il y a un nombre fini de sites d'adsorption par unité d'aire de surface du filtre, l'adsorption des virus décroît avec la diminution de l'aire de surface (Mix, 1974). Ainsi, la taille des filtres adsorbants utilisés augmentera en fonction de la taille de

**Tableau II: Filtres utilisés pour la concentration des virus.**

<b>Composition</b>	<b>Manufacturier</b>	<b>Code</b>
Nitrocellulose	Millipore Corp., MA	HA
Époxy / fibre de verre et amiante	Cox Instrument Corp., MC	Séries AA
Époxy / fibre de verre	Filterite Corp., Timonium, MD	Duo-Fine
Cellulose, charge modifiée	AMF, CUNO Division ,CT	1MDS
Borosilicate / résine d'époxy	Blaston, Inc. Lexington, MA	Filt.tubes
Fibre de verre	Carborundum Co., Lebanon, IN	K-27
	Nucleopore, Pleasanton, CA	D39

Source: Gerba et Goyal 1982

de l'échantillon à analyser. Par contre, la capacité d'adsorption d'un filtre chargé négativement est tellement augmentée par l'addition de sels ou d'acide que sa capacité d'adsorption n'est que rarement excédée en pratique.

En plus de s'adsorber sur le filtre, les virus vont aussi s'adsorber sur les particules prises dans le filtre durant le traitement, augmentant donc le nombre de sites d'adsorption (Metcalf *et al.*, 1973).

Il existe aussi certains filtres dont la charge a été modifiée. Lorsque ces filtres électropositifs sont utilisés, l'ajout de sels et l'ajustement du pH ne sont pas nécessaires puisque la charge de surface négative des particules virales n'a pas besoin d'être renversée.

Puisque les virus sont retenus à la surface des filtres par adsorption, la porosité des filtres peut excéder la taille des virus. Les filtres de nitrocellulose, par exemple, adsorbent les virus avec une porosité excédant 285 fois le diamètre des virus (Cliver, 1968). Par contre, les filtres de faible affinité, tels les filtres de cellulose tri-acétate, n'adsorbent pas les virus lorsque la porosité excède la taille du virus d'un facteur de trois (Cliver, 1968). Les filtres en orlon, polypropylène et polyester se sont avérés être de mauvais adsorbants de virus et ont été utilisés dans les systèmes de concentration comme pré-filtres non adsorbants pour éliminer les matières organiques pouvant obstruer les filtres adsorbants. La composition chimique, la taille et la porosité des filtres à utiliser sont choisies en fonction du volume et de la nature de l'eau à traiter.

#### 2.2.4 La nature de l'eau traitée

La présence de substances organiques et protéiques dans le milieu de suspension des virus peut interférer avec l'adsorption des virus sur les filtres en entrant en compétition pour

les sites d'adsorption sur les filtres (Gerba et Goyal, 1982). Ces substances, que l'on retrouve en concentration importante dans les eaux usées, peuvent être enlevées efficacement par un pré-traitement de l'échantillon avec du charbon activé ou sur résine anionique (Farrah *et al.*, 1976). L'eau à traiter peut aussi être clarifiée par un passage sur une série de pré-filtres avant le passage sur les filtres adsorbants. L'utilisation de pré-filtres préalablement traités avec un adsorbant compétitif comme du sérum, du détergent, des protéines ou des agents mouillants empêchera l'adsorption des virus sur les filtres clarifiants (Mix, 1974).

L'acidification des eaux usées avant le passage sur les filtres pour l'adsorption peut entraîner l'agrégation de la matière organique contenue dans l'échantillon en présence d'ions métalliques; il en résulte une obstruction des filtres (Gerba et Goyal, 1982).

#### 2.2.5 Le débit d'écoulement

L'adsorption des virus sur les filtres diminue avec une augmentation du taux d'écoulement à travers ceux-ci car un temps de contact minimum est nécessaire pour que les liens électrostatiques se forment entre les virus et les sites d'adsorption (Scutt, 1971). À un débit trop élevé, les virus peuvent passer à travers les filtres. Cependant, plus la capacité d'adsorption des filtres utilisés sera grande, plus le débit d'écoulement pourra être augmenté (Payment *et al.*, 1976).

#### 2.2.6 L'agent éluant

Parmi les substances utilisées pour l'éluion (Tableau III), les tampons à pH alcalin ont d'abord été employés. Le pH alcalin affaiblit les liens électrostatiques et hydrophobiques liant les virus au filtre. Les tampons alcalins se sont montrés efficaces pour l'éluion de certains groupes de virus mais ne pouvaient être utilisés pour d'autres virus qui étaient inactivés à des pH supérieurs à 10. Pour remplacer ces tampons, des solutions riches en protéines ont été

**Tableau III: Solutions utilisées pour l'élution des virus**

Éluant utilisé	Référence
Glycine	Wallis <i>et al.</i> , 1972a; Gerba <i>et al.</i> , 1978
Acides aminés basiques	Farrah et Bitton, 1979
Caséine	Gerba et Goyal, 1982
Sérum de veau foetal	Wallis et Melnick, 1967
Bouillon tryptose phosphate	Farrah et Bitton, 1978
Tween 80	Gerba et Goyal, 1982
Bouillons nutritifs	Hill <i>et al.</i> , 1972
Albumine de sérum bovin	Goyal <i>et al.</i> , 1980
Extrait de viande de boeuf	Rao et Labzoffsky, 1969; Berg <i>et al.</i> , 1971; Katzenelson <i>et al.</i> , 1976

été utilisées. Les protéines de ces solutions entrent en compétition avec les virus pour les sites d'adsorption sur les filtres micro-poreux. L'élution avec un composé organique à pH 9 ou 10 est similaire à celle obtenue avec un tampon glycine à pH 11,5 (Gerba et Goyal, 1982). L'élution avec l'extrait de boeuf (E.B.) 3% à un pH variant entre 9,0 et 10,5 est maintenant celle qui est la plus pratiquée. En plus de pouvoir être utilisé à des pH plus bas, l'extrait de boeuf rend la re-concentration de l'éluat plus facile à pratiquer par les procédés de floculation (Katzenelson *et al.*, 1976).

La quantité de solution éluante à utiliser dépendra de la taille du filtre à éluer. Lorsque de grands volumes d'eau sont traités, l'éluat obtenu devra à son tour être réduit. L'addition d'une seconde étape de concentration peut réduire le taux de récupération virale mais, diminue aussi la taille de l'éluat en volume permettant la détection des virus. Les techniques qui sont utilisées pour la re-concentration incluent la séparation en deux phases, l'hydro-extraction, la précipitation avec des sels inorganiques, l'ultra-centrifugation, la ré-adsorption sur des filtres de plus petits diamètres et la floculation organique.

### **2.3 Développement de la technique d'adsorption et d'élution**

Les différentes techniques d'adsorption et élution des virus sur filtres micro-poreux ont initialement été développées pour la concentration des entérovirus. Leurs propriétés de stabilité dans des milieux fortement acides et alcalins ainsi que leur aisance à se multiplier en cultures cellulaires facilitent la mise au point de ces techniques. Le Tableau IV présente les grandes étapes du développement des systèmes de concentration des virus par adsorption et élution sur filtres micro-poreux. Les chiffres entre parenthèses dans le texte réfèrent aux auteurs cités dans le tableau.

Tableau IV: Développement de la méthode d'adsorption/élution

Auteur	Clarification	Pre-condition.	Filtre adsorbant	Élution	Re-concentration	Virus	Récupération (%)
-1- Cliver, 1967			Nitrocellulose	Saline phosphatée + 30% de sérum de poulet		Poliovirus 1 Coxsackie B2 Entérovirus	N.D.
-2- Wallis et Melnick, 1967	Traitement sur résine anionique	MgCl <sub>2</sub> 0,05 M	Nitrocellulose	Filtre homogénéisé sur milieu B de Melnick + 10% de sérum de veau foetal		Entérovirus	N.D.
-3- Wallis et al., 1972b	5 filtres textile + traitement sur résine anionique.	MgCl <sub>2</sub> 0,05M	Nitrocellulose	Glycine 0,05 M pH 11,5	Ads./ Elu. sur filtres de nitrocellulose de plus petit diamètre	Virus entériques	80%
-4- Homma et al., 1973	Filtres en orlon traités avec Tween	AlCl <sub>3</sub> 0,0005M pH 3,5	Cartouche filtrante de fibre de verre	Glycine 0,05M pH 11,5	Ads./ Elu. sur filtres de nitrocellulose de plus petit diamètre	Poliovirus 1	81%
-5- Sobsey et al., 1973		Sans pH 3,5	Cartouche filtrante de fibre de verre	Glycine 0,05M pH 11,5	Ads./ Elu. sur filtres de nitrocellulose de plus petit diamètre	Poliovirus 1	77 %.
-6- Farrah et al., 1976	Filtre de fibre de verre	Sans sel pH 3,5	Cartouche filtrante de fibre de verre		Floculation à l'aluminium suivie d'hydro-extraction	eau potable eau de mer eau d'égout	52% 53% 50%

Metcalf (1961) est le premier à rapporter le potentiel des filtres micro-poreux pour la concentration de virus dans des suspensions aqueuses. Par la suite, Cliver (1) rapporte l'adsorption de virus sur des filtres de nitrocellulose (Millipore). C'est à Wallis et Melnick (2) qu'est attribué le développement du premier système de filtres micro-poreux pour la concentration de virus à partir de l'eau usée. Ils ont découvert que l'adsorption des virus aux filtres pouvait être augmentée par l'addition de sels. À ce moment, les filtres de nitrocellulose, sujets à l'obstruction, étaient utilisés et les échantillons d'eau ne dépassaient pas cinq litres. Wallis *et al.*, (1972a) ont décrit par la suite une élution à l'aide de la glycine ainsi qu'un procédé de re-concentration de l'éluat où les virus sont ré-adsorbés sur des filtres de plus petits diamètres, puis élués.

Ces développements ont fourni la base pour les premiers systèmes portatifs de concentration de virus. Le système original, soit celui développé par Wallis *et al.* (3), est un appareil à débit continu dans lequel l'eau qui entre est d'abord clarifiée sur des filtres de textile et traitée sur résine anionique. L'adsorption des virus se fait sur un filtre de nitrocellulose. Une solution de  $MgCl_2$  est injectée au passage de l'eau avant l'adsorption. Par la suite, Homma *et al.* (4) ont apporté quelques modifications à ce concentrateur portatif.

Ces premiers systèmes permettaient le traitement de volumes d'eau du robinet relativement grands et de plus petits volumes d'eau d'égout et d'eau de mer, mais plusieurs problèmes sont survenus. Les matières en suspension dans les eaux usées et dans les eaux troubles avaient tendance à obstruer les filtres, diminuant ainsi le débit d'eau. Les filtres clarifiants placés avant les filtres adsorbants ont réduit l'amplitude de ce problème mais, ont aussi diminué l'efficacité de la récupération virale car ils éliminaient les virus associés aux particules.

Sans clarification (5), en adsorbant les virus sur une cartouche filtrante en profondeur de fibre de verre (K-27 Fulflo) et un filtre en époxy et fibre de verre et d'amiante (COX AA), il a été possible d'obtenir une concentration de près de 40 000 fois à partir de 378 litres d'eau du robinet. Par contre, ce système ne s'est pas montré efficace lorsqu'utilisé à grande échelle pour le traitement de plus grands volumes d'eau, ceci en raison de l'aire de surface limitée du disque plat du filtre adsorbant. De plus, l'acide humique et d'autres composés organiques sont aussi concentrés avec les virus. Ces substances interfèrent avec la re-concentration à partir du premier éluat. Pour contourner ces problèmes, Farrah *et al.* (6) ont testé une variété de filtres dont les filtres Cox AA, les filtres de fibre de verre Filterite (Duo-Fine séries), les filtres copolymère de chlorures d'acrylonitrile et de polyvinyle (Acropor série) et les filtres de nitrocellulose (Millipore). Bien que tous les filtres testés aient adsorbé plus de 90% du poliovirus ajouté, les filtres Filterite se sont montrés moins sensibles à l'obstruction que les autres filtres. Le filtre Filterite utilisé était en cartouche de 25,4 cm contenant un filtre flûté dont la surface est 280 fois plus grande que celle des filtres de 47 mm, lui permettant donc de filtrer un plus grand volume, et ce à un débit plus élevé. En raison de la présence d'acide humique et des autres composés organiques dans l'éluat, la re-concentration est accomplie par une combinaison de floculation avec de l'aluminium et d'une hydro-extraction.

Les filtres micro-poreux à charge modifiée ont récemment été utilisés pour récupérer les virus dans l'eau. Ces filtres, chargés positivement, sont composés d'un mélange de résine de terre diatomée et de cellulose et font référence à une série de filtres Zeta-Plus (AMF/CUNO, Merides, CT). Ces filtres demeurent chargés positivement à des pH supérieurs à 6 et peuvent récupérer 80% de poliovirus ajoutés dans de l'eau à pH 7,7 sans addition de sel (Hill *et al.*, 1976). Les filtres chargés positivement présentent des avantages importants par rapport aux filtres chargés négativement. Les virus peuvent être adsorbés sans pré-conditionnement de

l'eau et l'élution peut se faire à des pH moins élevés réduisant ainsi le risque d'inactivation virale. La compagnie AMF/CUNO a développé les filtres électropositifs 1MDS Virosorb conçus spécialement pour la concentration des virus à partir de l'eau. Ces filtres électropositifs simplifieront les procédures de concentration des virus. Jusqu'à maintenant, ces filtres ont été principalement utilisés pour le traitement d'eaux du robinet et des recherches se font dans le but d'optimiser leur utilisation pour le traitement d'eau avec une charge organique élevée et ainsi que pour les eaux salées.

### 3 CONCENTRATION DES ROTAVIRUS

Les méthodes de concentration par adsorption et élution ont d'abord été développées pour les entérovirus. Ces méthodes ne sont pas nécessairement directement applicables pour la concentration d'autres types de virus. En effet, les conditions qui favorisent l'adsorption et l'élution des entérovirus ne seront pas nécessairement les mêmes pour des virus de familles différentes et pourront même mener à leur inactivation. Les rotavirus diffèrent des entérovirus en ce qui a trait à plusieurs caractéristiques, incluant leurs propriétés d'adsorption et leur stabilité (Estes, 1990; Ramia et Sattar, 1980). Différents auteurs ont tenté d'adapter les méthodes d'adsorption et d'élution déjà développées à la concentration des rotavirus. En fait, ces recherches sont faites dans le but de déterminer quelles seraient les conditions qui mèneraient à un maximum de récupération de rotavirus dans différents types d'eau.

Puisque le rotavirus humain croît difficilement en culture cellulaire, le rotavirus simien SA-11 est le plus souvent utilisé pour mener ces études. Il croît rapidement en titres élevés en culture cellulaire, ressemble au rotavirus humain par sa morphologie et sa composition et partage des antigènes communs avec celui-ci (Guttman-Bass et Armon, 1983). Pour évaluer l'efficacité des différentes techniques de concentration, il s'agit d'ajouter des quantités connues de SA-11 dans différents types d'eau et d'évaluer les pourcentages de récupération dans les concentrés obtenus.

#### 3.1 Adsorption

L'adsorption du rotavirus est totale sur les différents types de filtres adsorbants dans les conditions appropriées (Smith et Gerba, 1982a). Les filtres chargés négativement en fibre de verre-époxy traités à la mélanine (Duo-Fine séries; Filterite Corp., Timonium, MD) sont ceux qui se sont révélés les moins sensibles à l'obstruction par la matière organique présente

dans les échantillons (Smith et Gerba, 1982a). Avec ce type de filtre, les meilleures conditions d'adsorption se retrouvent lorsque l'échantillon d'eau est ajusté à un pH de 3,5 et additionné d' $\text{AlCl}_3$  en concentration finale de 0,5 mM (Smith et Gerba, 1982a).

Il a été démontré qu'en plus du risque d'inactivation des rotavirus par exposition à des pH acides (Weiss et Clark, 1985), la condition chimique de l'eau peut influencer les liaisons virus-filtre ainsi que l'état d'agrégation du virus, rendant leur élution plus difficile (Guttman-Bass et Armon, 1983). À ce niveau, les filtres à charges modifiées offrent divers avantages en comparaison avec les filtres électro-négatifs de type Filterite. En effet, ils sont relativement insensibles aux changements de qualité de l'eau, ce qui permet une récupération des virus à un pH plus neutre (Guttman-Bass et Armon, 1983). Les filtres à charges modifiées de type Zetapor 1MDS et Zeta Plus (AMF-Cun Div) adsorbent 100% du rotavirus sans addition de sels et à des pH pouvant varier entre 5,0 et 8,5 (Toranzos et Gerba, 1989).

D'autres matériaux ont été utilisés pour l'adsorption du rotavirus telles la Talc-Celite et la poudre de verre (Schwartzbrod et Lucena, 1978; Ramia et Sattar, 1980; Auberger *et al.*, 1981). Ces méthodes, qui demandent un appareillage sophistiqué, sont plus compliquées à pratiquer et sont peu utilisées pour la concentration des rotavirus humains dans les eaux usées.

### 3.2 Élution

Plusieurs agents éluants ont été évalués quant à leur efficacité d'élution des rotavirus sur les filtres adsorbants. La plupart des solutions éluantes efficaces pour l'élution du poliovirus n'ont montré qu'une faible capacité d'élution du rotavirus. Le tableau V présente les solutions qui, selon différents auteurs, se sont révélées les plus efficaces pour l'élution du rotavirus sur différents types de filtres.

Tableau V: Efficacité de différents agents éluants

Éluant	Filtres adsorbants	Type d'eau traitée	Récupération (%)	Référence
B.T.P. 10% dans glycine 0,05M pH 10	Filterite	Eau distillée	80	Smith et Gerba, 1982
		Eau usée	29	
E.B. 3% pH 9	60S Zeta Plus	Eau du robinet	62	Guttma-Bass et Armon, 1983
	Cox-AA		3	
B.T.P. pH 9 arginine+glycine 6%	30 S Zeta Plus	Eau usée	70	Raphael <i>et al.</i> , 1985b
B.T.P. 10% + E.B. 3% pH 10	50S Zeta Plus	Eau du robinet	44	Toranzos et Gerba, 1989
	1 MDS		106	

### 3.3 Seconde étape de concentration

La détection des rotavirus peut se faire directement à partir de l'éluat lorsque celui-ci ne dépasse pas un volume de 50 mL. Or, étant donné que de très grands volumes d'eau sont habituellement analysés, la quantité de solution utilisée pour éluer les virus des filtres microporeux dépasse généralement 50 mL. Ainsi, une seconde étape de concentration est nécessaire pour réduire le volume de l'éluat et permettre la détection.

L'hydro-extraction contre le polyéthylène glycol est une méthode relativement facile à pratiquer pour réduire le volume de l'éluat contenant une certaine variété de virus entériques. Par contre, cette méthode ne permet que le traitement de faibles volumes et expose les virus durant de longues périodes à des substances contenues dans les concentrés et pouvant les inactiver. Elle a tout de même été évaluée quant à sa capacité de récupération de rotavirus dans divers type d'éluats (Tableau VI).

La floculation organique est une méthode qui s'est montrée très efficace pour la re-concentration du poliovirus suite à l'élution avec de l'E.B. Cette technique, décrite pour la première fois en 1976 par Katzenelson *et al.*, permet la récupération des virus dans l'éluat en abaissant son pH à 3,5. Cette diminution du pH a pour effet de précipiter les protéines et les virus de l'éluat, qui sont ensuite récupérés par centrifugation et re-suspension dans un très faible volume de solution saline (Katzenelson *et al.*, 1976). Cette méthode s'utilise particulièrement bien lorsqu'une substance riche en protéine comme l'E.B est utilisée comme agent éluant lors de la première étape de concentration. Étant donné que cette méthode se pratique à un pH de 3,5, les virus sensibles à un environnement acide risquent d'être inactivés par ce genre de traitement. Lorsque la floculation organique a été évaluée pour sa

Tableau VI: Seconde étape de concentration du rotavirus

Méthodes	Solution	Récupération (%)	Référence
Hydro-extraction	E.B. 3%	94	Ramia et Sattar, 1980
Floculation organique	E.B. 3%	61	Guttman-Bass et Armon, 1983
Hydro-extraction	B.T.P. 10% + arginine+glycine 6%	16	Raphael <i>et al.</i> , 1985b
Précipitation au S.A.	E.B. 10%	70	Bosch <i>et al.</i> , 1987
Précipitation au S.A.	E.B. 1%	97	Payment et Trudel, 1987
Floculation organique	B.T.P. 10% +	15	Toranzos et Gerba, 1989
Hydro-extraction	E.B. 3%	59	

capacité à concentrer le rotavirus dans l'E.B. et le bouillon tryptose phosphate (B.T.P.), des résultats fort divergents ont été obtenus (Tableau VI).

Pour contourner ce problème d'environnement acide, Shields et Farrah (1986) ont évalué la possibilité de précipiter les protéines de l'E.B. avec une solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisé. Cette méthode a permis d'obtenir des pourcentages de récupération d'entérovirus comparables à ceux observés avec la floculation organique. En ce qui concerne la récupération du rotavirus, cette méthode semble être celle qui s'y prête le mieux (Tableau VI).

## 4 DÉTECTION DES VIRUS ENTÉRIQUES

La concentration des virus est suivie par la détection, l'identification et le dénombrement des virus présents dans les concentrés des échantillons d'eau à analyser. Puisque les doses infectieuses virales sont généralement très faibles, une faible concentration de virus dans l'eau pourrait avoir une importance significative en ce qui concerne la propagation des maladies d'origine hydrique. Ainsi, les méthodes utilisées pour la détection des virus dans les concentrés d'échantillons d'eau doivent être capables de mettre en évidence aussi peu qu'une à dix particules infectieuses à partir de 100 à 1000 litres d'eau.

### 4.1 Effets cytopathiques et technique des plages

Les méthodes standards évaluent l'infectivité suite à l'inoculation des concentrés sur un feuillet cellulaire. Le système le plus simple est celui où l'on évalue la production d'effets cytopathiques viraux sur des cellules sensibles. Une identification préliminaire peut se faire en se basant sur l'apparence des effets cytopathiques (ECP), car la plupart des virus provoquent des modifications cellulaires variées faciles à observer et généralement spécifiques. La détermination du titre infectieux se fait par des modèles mathématiques telles les méthodes de Reed-Muench et de Kärber qui mesurent la dose infectieuse 50% (DICT50), ou par l'évaluation du nombre le plus probable d'unités cytopathiques (NPPUC) ou d'unités infectieuses (NPPUI).

Le titrage par plages rend plus facile l'évaluation des effets cytopathiques et du titre viral (Smith et Gerba, 1982b). Cette méthode consiste à inoculer le concentré de l'échantillon à évaluer sur un feuillet cellulaire en milieu nutritif gélifié (Cooper, 1969). Le milieu gélifié empêche la dispersion des virus; l'effet cytopathique demeure localisé et résulte en la formation d'une zone de destruction circulaire appelée plage. Chaque plage ayant comme

origine un virus ou un agrégat de virus est considérée comme une unité virale (unité formatrice de plaque; UFP) (Maramorosh et Koprowski, 1977).

Une technique de dénombrement par plages a été développée pour les rotavirus bovins (Matsuno *et al.*, 1977). La formation de plages par le rotavirus simien SA-11 sur des cellules sensibles de primate nécessite la présence de facilitateurs dans le recouvrement d'agar (Smith *et al.*, 1979). La technique de dénombrement par plaque est difficilement applicable à la détection des rotavirus humains puisqu'ils se propagent difficilement en culture cellulaire et qu'ils n'induisent pas d'effets cytopathiques prononcés. De plus, la détection et le dénombrement par effets cytopathiques ou par les méthodes de plages nécessitent de longues périodes d'incubation avant l'obtention de résultats complets. Pour pallier à ces inconvénients, des méthodes rapides ont été développées pour détecter les virus en l'absence de dégénérescence cellulaire.

## 4.2 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques nécessitent l'utilisation de réactifs immuns spécifiques. On retrouve entre autres parmi ces méthodes l'immuno-électromicroscopie (IEM), les tests immuno-enzymatiques (ELISA), l'immunofluorescence (IF) et l'immunoperoxidase (IP).

### 4.2.1 L'immuno-électromicroscopie

La microscopie électronique directe (ME) permet la détection et l'identification définitive des virus non-cultivables ayant une morphologie bien distincte. L'immuno-électromicroscopie combine les avantages de la microscopie électronique avec la spécificité immunologique. L'IEM procède de la même façon que la ME sauf que les échantillons sont d'abord incubés avec des sérums spécifiques avant la coloration. Les particules virales sont agrégées par des anticorps spécifiques, ce qui les rend facilement identifiables par examen au

microscope électronique. Bien que l'IEM soit peu utilisée en virologie environnementale, elle permet de confirmer l'identification des virus isolés, étant donné que la plupart des virus entériques ont d'abord été identifiés à l'aide de cette méthode (Flewett, 1978; Kapikian *et al.*, 1975).

#### 4.2.2 Les tests immuno-enzymatiques

La détection par ELISA se fait par l'indication d'homologie entre l'antigène (protéines virales) et un anticorps spécifique sur un substrat solide. Sa facilité d'utilisation de même que sa disponibilité rendent le test ELISA particulièrement attrayant pour la détection et l'identification des virus dans l'eau. De plus, la présence de matériel cytotoxique, souvent rencontré dans les concentrés, n'affecte pas le test ELISA.

Différentes troussees telles Enzignost, Rotazyme (Guttman-Bass *et al.*, 1987) et Behringwerkede (Steinmann, 1981) ont été mises au point pour la détection des rotavirus. Ces tests ELISA se sont montrés relativement spécifiques mais pas suffisamment sensibles pour la mise en évidence de virus présents en faible quantité dans l'eau. La présence d'environ  $10^7$  particules dans l'échantillon est nécessaire pour obtenir une réponse positive à l'ELISA (Agbalika *et al.*, 1985). La sensibilité de détection généralement rapportée varie de  $10^5$  à  $10^6$  particules par mL (Ellens et De Leeuw 1977a et b). De plus, les tests ELISA ne peuvent différencier les particules infectieuses des non-infectieuses (Steinmann, 1981).

#### 4.2.3 L'immunofluorescence et l'immunoperoxidase

L'immunofluorescence et l'immunoperoxidase sont deux techniques spécifiques et sensibles qui permettent une détection rapide des virus dans les concentrés. Ces techniques détectent les virus en cours de répliation en culture cellulaire et permettent l'identification des différentes souches virales ou, avec l'antisérum approprié, la distinction de sérotypes. Dans

le cas de l'immunofluorescence (IF), les cellules infectées sont colorées avec l'anticorps spécifique conjugué à une molécule fluorescente. Les cellules colorées sont ensuite observées sous microscope à la longueur d'onde appropriée. L'IF indirecte est souvent plus sensible et engendre moins de réactions non spécifiques que l'IF directe (Smith et Gerba, 1982b).

L'immunoperoxidase (IP) fonctionne selon le même principe que l'IF sauf que l'anticorps spécifique est conjugué à un enzyme dont la réaction avec son substrat colore les cellules infectées. Le produit de réaction peut être visualisé à l'aide d'un microscope ordinaire. Comme pour l'IF, la réaction indirecte est souvent utilisée et est plus sensible. L'IP est de cent à mille fois plus sensible que l'IF mais est plus longue à exécuter (Smith et Gerba, 1982b).

Banatvala *et al.* (1975) ont décrit l'utilisation de l'IF et de l'IP indirecte pour la détection des rotavirus. Aussi peu que 10 unités rotavirales infectieuses par mL d'eau usée et traitée ont pu être détectées à l'aide de l'IF indirecte (Smith et Gerba, 1982a). Il arrive que l'échantillon à analyser soit toxique et entraîne une dégénérescence précoce des cellules. Cependant il existe maintenant des méthodes qui permettent la détoxification de l'échantillon avant son inoculation sur les cellules (Oragui et Mara, 1989a).

### 4.3 Sondes génomiques

Des sondes génomiques ont récemment été développées pour la détection de certains virus dans l'eau (Hurst *et al.*, 1988; Margolin *et al.*, 1986). Une sonde d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) qui s'hybride à un acide nucléique viral rend possible la mise en évidence d'une faible quantité d'informations génétiques dans différents milieux. Les sondes génomiques se sont déjà montrées utiles pour la détection de virus dans des échantillons cliniques d'urine, de fèces et de sérum (Margolin *et al.*, 1986). Elles sont au

moins mille fois plus sensibles que les tests sérologiques (Margolin *et al.*, 1986) et peuvent ainsi être utilisées pour mettre en évidence la présence des virus directement dans les échantillons d'eau sans concentration, ou pour détecter les virus infectieux par détection *insitu* sur culture cellulaire (Hurst *et al.*, 1988). La plupart des sondes en utilisation sont capables de détecter aussi peu que 0,5 à 2 pg ou 1 à 10 TCID<sub>50</sub> de certains virus en culture cellulaire (Margolin *et al.*, 1986). Arens et Swierkosz (1989) ont développé la première sonde ADN commerciale pour la détection de rotavirus dans des échantillons cliniques. Dans ce genre d'échantillon, on retrouve suffisamment d'ARN viral pour permettre une détection sensible et spécifique par hybridation. Pour être en mesure d'appliquer la détection des rotavirus par hybridation dans des échantillons d'eau, il faudrait d'abord procéder à une amplification du génome viral par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour minimiser la purification des échantillons et éviter l'utilisation de sondes radioactives. La faible concentration de virus contenu dans les échantillons ainsi que le niveau élevé de contaminants environnementaux rendent difficiles ces opérations. Ainsi, bien que les sondes génomiques fournissent une alternative intéressante pour la détection des virus dans l'eau, il existe encore plusieurs problèmes à contourner, rendant pour l'instant cette méthode impraticable pour des contrôles de routine des eaux à grande échelle.

## 5 MISE EN ÉVIDENCE DES ROTAVIRUS DANS L'EAU

La plupart des virus qui ont été détectés durant les années 1980 sont des entérovirus. Toutefois, les études rapportant la présence de rotavirus dans les eaux deviennent de plus en plus fréquentes grâce aux récents développements des méthodes de concentration.

Du rotavirus infectieux de souche humaine a été détecté dans de l'eau usée et dans l'effluent d'une usine d'épuration moderne (Houston, TX) utilisant des boues activées (Smith et Gerba, 1982 a). Le niveau de rotavirus était aussi élevé dans l'eau usée à l'entrée de l'usine que dans l'effluent après le traitement.

L'équipe de Deetz a été la première à rapporter la présence de rotavirus dans de l'eau potable (Mexico, Mexique) (Deetz *et al.*, 1984). Cette étude laisse supposer que les rotavirus résistent non seulement aux traitements d'épuration des eaux usées mais aussi aux procédés de filtration menant à la libération de l'eau de consommation.

Une étude menée par Gerba *et al.*, (1986) dans trois usines de traitement d'eau a démontré que les procédés impliquant la floculation chimique, la clarification, la filtration sur sable et la chloration n'assuraient pas l'élimination des rotavirus. En effet, l'eau potable provenant des trois usines étudiées contenait des rotavirus en concentration allant de 45 à 233 foyers d'immunofluorescence (IFF) par 100 litres d'eau. Cette étude démontre que les paramètres standards qui contrôlent la production d'une eau bactériologiquement sécuritaire n'assurent pas nécessairement l'absence de virus potentiellement pathogènes.

Des rotavirus ont aussi été détectés dans les eaux récréatives du parc Oak Creek en Arizona (Rose *et al.*, 1987). Ces eaux sont classées sécuritaires pour différentes utilisations incluant la baignade, l'irrigation agricole et comme source d'eau domestique, d'après les

standards de qualité d'eau de surface de l'état de l'Arizona. Cette isolement de virus pathogènes dans ces eaux de récréation populaire met en évidence un potentiel de transmission de maladies virales par ces eaux.

Puisqu'une unité virale infectieuse dans un système de cellules hôtes en laboratoire peut produire une infection chez l'homme dans les circonstances appropriées, la présence de seulement une unité infectieuse dans l'environnement représente un potentiel d'infection. Il a été calculé que si une unité virale formatrice de plage par 190 litres d'eau potable dans une communauté utilisant 190 millions de litres d'eau par jour (dont 0,2% est utilisé pour la consommation), et en assumant un taux d'infection de seulement 30%, 600 individus seraient affectés journalièrement par une variété de maladies cliniques et sous-cliniques (Gerba *et al.*, 1975).

Ainsi, il est suggéré que le niveau maximum de contaminant virale dans une eau sécuritaire soit de zéro.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1 PRODUCTION DU VIRUS ET CULTURES CELLULAIRES**

La propagation des virus ainsi que l'évaluation des titres viraux se sont faites sur une lignée cellulaire de rein de singe rhésus (MA-104; Microbiol. Ass., MD).

### **1.1 Cultures cellulaires**

Les cellules ont été cultivées en flacons de polystyrène de 150 cm<sup>2</sup> (Corning glass works, NY) ainsi qu'en plateaux de 96 puits à fonds plats (Flow Lab., VA). La propagation des cellules s'est faite dans un milieu de croissance constitué en volumes égaux de milieu 199 (Base de Hanks, Gibco, NY) et de milieu minimum essentiel (MEM; Base de Earle, Gibco, NY) contenant 5% de sérum de veau foetal (SVF; Gibco, NY) et 1,35 mg/mL de bicarbonate de sodium (Gibco, N.Y.). Les cultures en flacon sont incubées dans une étuve à 37°C jusqu'à confluence des cellules. Les cultures en plateaux sont incubées dans une étuve humidifiée à atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C jusqu'à confluence des cellules.

Les cellules confluentes en flacon sont maintenues dans un milieu de maintien constitué de MEM et de 1,35 mg/mL de bicarbonate de sodium. Les cellules confluentes en plateaux sont utilisées pour la détection et l'évaluation des titres viraux dans les échantillons à analyser.

#### **1.1.1 Dispersion des cellules**

La dispersion du tapis cellulaire confluent se faisait dans du tampon phosphate sans calcium et sans magnésium (PBS -Mg -Ca; Gibco, N.Y.) à pH 7 contenant 0,05% de trypsine et 0,02% d'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA). Dans un premier temps, le surnageant de culture est vidangé et le tapis cellulaire est rincé deux fois avec 5 mL de solution dispersante. Le flacon contenant 1 mL de solution dispersante est ensuite placé à

37°C pendant 5 à 10 minutes pour permettre la dispersion des cellules. Les cellules sont ensuite suspendues dans 100 mL de milieu de croissance complet puis dénombrées par un comptage des cellules viables à l'épreuve au Trypan bleu. La suspension cellulaire est répartie dans les flacons de 150 cm<sup>2</sup> à raison de 50 000 cellules/mL et dans les plateaux de 96 puits à raison de 75 000 cellules/mL.

## 1.2 Virus

Le rotavirus simien SA-11 a été utilisé comme modèle pour la mise au point de la méthode de concentration de rotavirus à partir de l'eau. Le SA-11 a été obtenu des laboratoires du Dr. Sattar (Université d'Ottawa, Ont.) et a été propagé dans nos laboratoires (matériel et méthodes, section 1.2.1).

Du poliovirus a aussi été utilisé pour contrôler les conditions de la méthode de concentration. Le poliovirus utilisé est le Sabin LSC 2AB qui a été propagé dans le laboratoire du Dr. Payment (Institut Armand-Frappier, Laval, Qué.) sur une lignée de cellules de rein de singe cercopithèque (Vero; ATCC)

### 1.2.1 Production du SA-11

La production de SA-11 se fait en ajoutant 4 mL de suspension virale (environ 50 à 150 x 10<sup>6</sup> particules) sur des cellules MA-104 confluentes en flacon de 150 cm<sup>2</sup>. Les cellules étaient préalablement rincées trois fois avec du milieu de croissance sans SVF. Après une incubation d'une heure à 37°C, 100 mL de milieu de croissance sans SVF contenant de la trypsine en concentration finale de 50 µg/mL est ajouté. Lorsque la lyse complète des cellules est observée (après environ 24 heures), les cellules sont congelées et décongelées trois fois puis centrifugées 15 minutes à 400 x g. Le surnageant est récupéré puis réparti en aliquotes de 4 mL qui sont conservés à -70°C.

### 1.2.2 Traitement de la production virale au fréon

Après la dernière décongélation, 25% de fréon est ajouté au lysat cellulaire qui est ensuite centrifugé 15 minutes à 400 x g. Le surnageant est récupéré puis filtré sur un filtre de porosité de 0,45  $\mu\text{m}$  (Nalgen Lab., NY). Le filtrat est ensuite réparti en aliquotes de 4 mL qui sont conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **2 DÉTECTION ET TITRAGE DES VIRUS**

Tout au long des travaux, la détection du SA-11 et du Sabin dans les différents échantillons s'est faite respectivement par immunoperoxidase indirecte et par visualisation des effets cytopathiques. Les titres viraux ont été évalués par la méthode du nombre le plus probable (NPP).

### **2.1 Préparation des échantillons**

Des dilutions décimales de l'échantillon à titrer sont effectuées dans du milieu de maintien. Chacune des dilutions de l'échantillon est inoculée sur un feuillet cellulaire confluent préparé dans les plateaux de 96 puits. Huit puits successifs d'une même rangée du plateau sont inoculés avec une même dilution à raison de 25 µL par puit. Suite à la mise en contact des échantillons avec les cellules, 125 µL de milieu de maintien additionné de 50 µg/mL de gentamycine (Gibco, NY) et d'un mélange de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL) (Gibco, NY). Les plateaux sont ensuite incubés entre 48 et 72 heures à 37°C dans une étuve humidifiée à atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.2 Détection du SA-11 par immunoperoxidase indirecte**

Suite à l'incubation des échantillons en plateaux, le surnageant de culture est vidangé et les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS -Mg -Ca (Gibco, NY). Le tapis cellulaire est fixé par un contact de 15 minutes avec 100 µL de méthanol contenant 1% de peroxyde d'hydrogène. Après deux lavages avec du tampon PBS -Mg -Ca, les cellules sont mises en contact avec 100 µL d'une dilution 1:30 000 d'un anticorps monoclonal, le RO-14. L'anticorps RO-14 réagit spécifiquement avec un antigène de groupe des rotavirus et est produit dans les laboratoires du Dr. Sattar (Université d'Ottawa, Ont.). Après une incubation

de 2 heures à 37°C dans une étuve humidifiée à atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont lavées deux fois et une dilution 1:1 000 d'anti-IgG/IgM de souris conjugué à la peroxydase (Jackson Immuno. Lab.) est ajoutée (100 µL/puits). Après une incubation de 2 heures à 37°C dans une étuve humidifiée à atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont lavées deux fois. La réaction est révélée par addition de 100 µL d'une solution composée de 0,25 µg/mL de tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co., MO) dans du tampon Tris-HCl 0,05 M à pH 7,6. Cette solution est préparée juste avant son utilisation, filtrée sur un filtre de porosité de 25 µm (Filterite, Timonium, MD) et additionnée de 30 µL de peroxyde d'hydrogène 30%. La réaction est observée sous un microscope inversé jusqu'à l'apparition d'une coloration brune autour des cellules témoins (après 5 à 15 minutes). La réaction est arrêtée par un rinçage à l'eau. Les puits positifs et négatifs sont dénombrés pour chacune des dilutions de l'échantillon.

### 2.3 Évaluation du titre viral par la méthode du NPP

La méthode du nombre le plus probable (NPP; Hugues, 1981) évalue la probabilité de la densité d'une population virale en milieu liquide.

L'indice NPP (d) se calcule en résolvant l'équation suivante:

$$\sum_{i=1}^{i=k} \frac{p_i q_i e^{-q_i d}}{1 - e^{-q_i d}} = \sum_{i=1}^{i=k} (n_i - p_i) q_i$$

où:

k = le nombre de dilutions utilisées pour obtenir une réaction positive et négative

i = une série de la même dilution

n<sub>i</sub> = le nombre de puitsensemencés pour chacune des séries

$q_i$  = le volume d'inoculumensemencé dans chacun des puits

$p_i$  = le nombre de puits de la série  $i$  qui fournissent une réponse positive\*

$d$  = la densité virale qu'il est probable d'observer dans l'échantillon

Cette formule ayant été programmée en Fortran, a été utilisée sur HP 3000

\* à l'immunoperoxidase pour le SA-11  
à la visualisation d'effets cytopathiques pour le Sabin

### 3 MISE AU POINT DE LA MÉTHODE DE CONCENTRATION

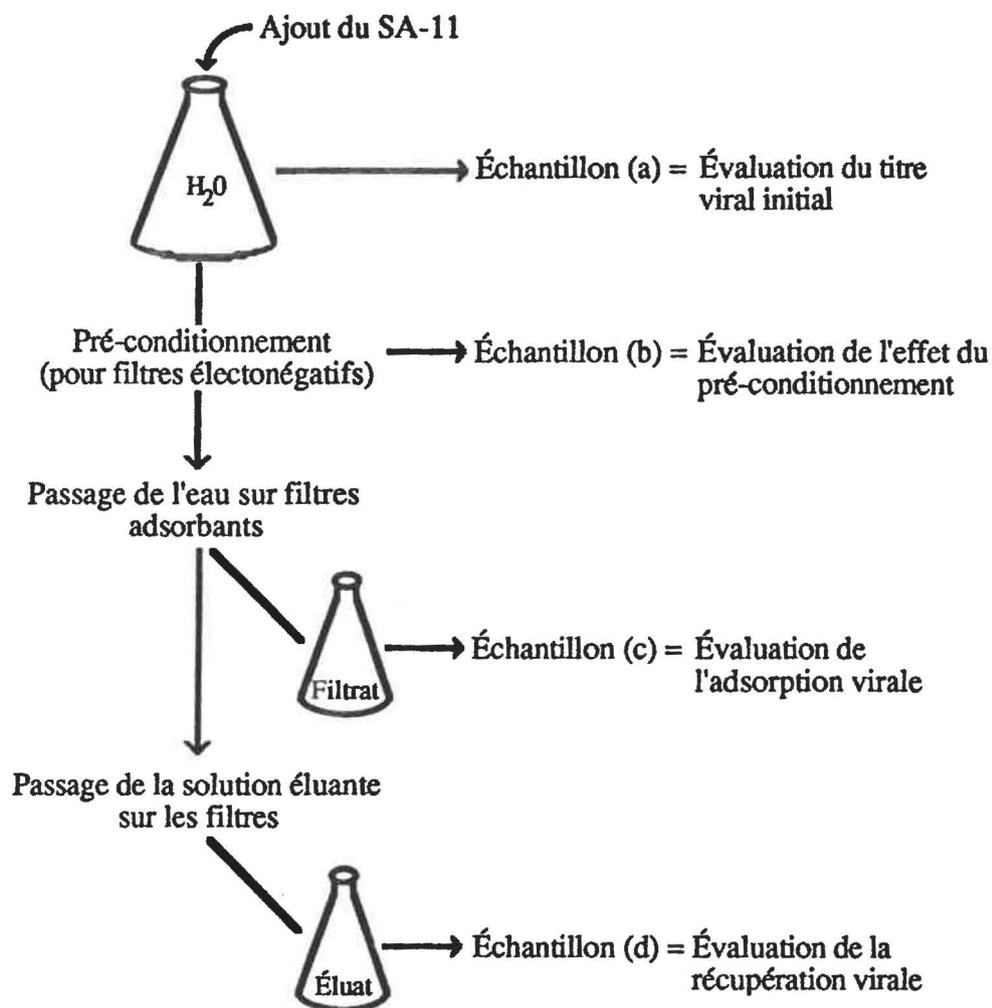
La concentration de virus à partir de l'eau par adsorption et élution se fait par le passage de l'eau sur un filtre micro-poreux à la surface duquel les virus vont s'adsorber. Les virus sont ensuite récupérés par le passage d'un faible volume de solution éluante.

Les essais visant à mettre au point cette méthode pour la concentration du rotavirus se font en traitant 250 mL d'eau dé-ionisée stérile artificiellement contaminée avec du SA-11. La figure I illustre les principales étapes permettant d'évaluer l'efficacité de l'adsorption et de l'élution. Le SA-11 est ajouté à l'eau en concentration d'environ  $30 \times 10^6$  particules/mL. Des échantillons d'eau sont prélevés à différents niveaux du traitement (Figure Ia, b, c et d). Les échantillons prélevés sont immédiatement neutralisés par une dilution 1:10 dans du milieu de maintien. La détection et l'évaluation du titre viral pour chacun des échantillons se font tel que décrit précédemment (matériel et méthodes, section 2).

#### 3.1 Pré-conditionnement

L'utilisation de filtres électronégatifs nécessite un pré-conditionnement de l'eau pour permettre l'adsorption des virus à leur surface.

Deux types de pré-conditionnement ont été évalués quant à leur capacité de favoriser l'adsorption du SA-11 à la surface des filtres électronégatifs, soit: le pré-conditionnement au chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) et celui au chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Le pré-conditionnement au  $MgCl_2$  se pratique à pH 6 alors que celui au  $AlCl_3$  se pratique à pH 3,5. Le  $MgCl_2$  a été utilisé en concentration de 50 mM et le  $AlCl_3$  en concentration finale de 1 ou de 5 mM.

**Figure I: Méthode d'évaluation de l'efficacité de l'adsorption et de l'élution**

L'eau à traiter est pré-conditionnée suite à l'ajout du SA-11 avant la filtration; les sels sont ajoutés en concentration désirée à partir de solutions stocks puis le pH est ajusté par addition lente d'acide chlorhydrique 1,2 N (HCl) ou d'hydroxide de sodium 1 N (NaOH).

L'effet du pré-conditionnement sur le SA-11 est évalué en comparant le titre viral dans l'eau suite au pré-conditionnement (Figure Ib) avec le titre viral initial (Figure Ia).

L'utilisation de filtres électropositifs ne nécessite pas de pré-conditionnement de l'eau.

### **3.2 Évaluation de l'adsorption**

L'eau artificiellement contaminée est pré-conditionnée si nécessaire, selon le type de filtre utilisé, puis passée sur les filtres adsorbants. Un échantillon est prélevé dans l'eau avant la filtration (Figure I: a) et après la filtration (Figure Ic).

La proportion de virus adsorbé à la surface des filtres micro-poreux est déterminée par la différence entre le titre viral dans l'échantillon prélevé suite à l'ajout des virus et le titre dans l'échantillon prélevé au niveau du filtrat.

#### **3.2.1 Filtres**

L'adsorption du SA-11 se fait sur des filtres plats de 47 mm de diamètre qui sont placés dans un support de type «Swinnex Disc» (Millipore, MA).

Deux types de filtres ont été évalués quant à leur capacité de retenir le SA-11 à leur surface : les filtres électronégatifs de fibre de verre (Filterite Corp., MD) de porosité de 0,45 et de 0,25  $\mu\text{m}$  et les filtres électropositifs de nitrocellulose (1 MDS; Cuno, CT). Deux séries de filtres électronégatifs ont été évalués; soit une première série où un pré-filtre AP-25

(Millipore, MA) est suivi d'un filtre de porosité de 0,45  $\mu\text{m}$  et d'un filtre de porosité de 0,25  $\mu\text{m}$  (série 1:1:1) ou une deuxième série où un pré-filtre AP-25 est suivi de deux filtres de porosité de 0,45  $\mu\text{m}$  et de deux filtres de porosité de 0,25  $\mu\text{m}$  (série 1:2:2). Les filtres électropositifs sont placés en double et précédés d'un pré-filtre AP-25.

### 3.3 Évaluation de l'élution

L'eau artificiellement contaminée est d'abord passée sur les filtres pour permettre l'adsorption des virus sur ceux-ci. Par la suite, les virus adsorbés sont récupérés par le passage de 25 mL de solution éluante. La proportion de virus élué est déterminée par la comparaison du titre viral dans l'échantillon prélevé dans l'éluat (Figure I b) avec le titre viral initial (Figure I a).

#### 3.3.1 Solutions éluantes

Les solutions suivantes ont été évaluées quant à leur capacité d'éluier le SA-11 adsorbé sur les filtres:

- Extrait de boeuf (E.B.; Difco, MC) préparé dans l'eau en concentration de 1,5, 3 et 8% à des pH variant entre 7,0 et 10,9 parfois additionné de Tween 80 (Sigma, MO) en concentration variant entre 0,5 et 5,0%.
- E.B. préparé dans la glycine 0,05 M en concentration de 3% à pH 9,0 et 10,0 parfois additionnée de Tween 80 en concentration de 1%.
- Bouillon tryptose phosphate (B.T.P; Difco, MC) préparé dans l'eau en concentration de 10 % à pH 9,8.
- B.T.P. dans la glycine 0,05 M en concentration de 10% à pH 9,0 et 10,0.

- Glycine 0,05 M à pH 9,0 et 10,0.

- Lysine 1% à pH 9,8

### 3.3.2 Préparation des solutions éluantes

L'E.B. est ajouté à de l'eau déionisée ou de la glycine, selon le cas; la solution est ensuite stérilisée à l'autoclave puis le pH est ajusté par addition de NaOH 1N. Lorsque du Tween est utilisé, celui-ci est ajouté en concentration appropriée avant la stérilisation. Le B.T.P est préparé de la même façon que l'E.B.

### 3.3.3 Stabilité du SA-11 dans les solutions éluantes

La stabilité du SA-11 dans les solutions éluantes utilisées est évaluée en ajoutant une quantité connue de SA-11 dans 100 mL de la solution étudiée. Un échantillon est prélevé après 5 minutes. La stabilité est déterminée en comparant le titre viral de l'échantillon prélevé après 5 minutes avec le titre viral initial.

## 4 MISE À L'ÉCHELLE

La mise à l'échelle de la méthode de concentration a été faite en traitant des volumes de 1 et 20 litres d'eau déminéralisée. Pour ces essais, des filtres d'un diamètre de 147 mm étaient utilisés. L'évaluation de l'efficacité de la méthode au niveau des différentes étapes s'est faite de la même façon que pour le traitement de 250 mL d'eau. Le SA-11 est ajouté à l'eau dans les mêmes proportions. Pour le traitement de 20 litres d'eau, le SA-11 était d'abord ajouté à un litre d'eau. Un échantillon était ensuite prélevé, puis l'eau contaminée était ajoutée à 19 litres d'eau, mélangée et passée sur les filtres adsorbants.

### 4.1 Volume de solution éluante

Le volume minimum de solution éluante nécessaire pour récupérer la majorité des virus adsorbés sur les filtres de 147 mm a été déterminé en procédant à une élution avec un litre de solution éluante qui était récolté en fraction de 100 mL. Le titre viral était ensuite déterminé dans chacune des fractions.

## **5 CONCENTRATION À PARTIR DE L'EAU USÉE**

L'efficacité de la méthode mise au point a été évaluée pour la concentration du SA-11 à partir de l'eau usée. Le SA-11 était alors ajouté à l'eau usée. Des volumes de 250 mL et de 20 litres ont été traités. L'évaluation de l'efficacité de l'adsorption et de l'élution s'est faite de la même façon que lors de la mise au point à partir d'eau déionisée, soit en prélevant des échantillons au niveau du filtrat et de l'éluat et en comparant les titres viraux avec les titres initiaux.

### **5.1 Clarification de l'eau usée**

Lorsque 20 litres d'eau usée étaient traités, une étape de clarification était nécessaire avant de procéder à l'adsorption. L'eau était donc passée sur une cartouche filtrante de fibre de verre de porosité de 3  $\mu\text{m}$  (Filterite Corp., MD) afin d'éliminer les matières organiques en suspension pouvant obstruer les filtres adsorbants. Les cartouches étaient préalablement traitées avec 1% de Tween 80 pour empêcher l'adsorption des virus à leur surface. L'eau usée clarifiée était ensuite passée sur les filtres adsorbants.

### **5.2 Re-concentration**

Pour re-concentrer l'éluat obtenu suite à l'adsorption et l'élution sur filtres microporeux, nous avons utilisé la technique de précipitation au sulfate d'ammonium. Cette technique s'emploie lorsqu'une solution riche en protéines, comme l'E.B., est utilisée comme solution éluante. Elle a été utilisée lorsque 20 litres d'eau étaient traités.

Suite à l'élution, le pH de l'éluat est ajusté à 7,0 à l'aide de HCl 1,2 N. Un demi-volume d'une solution saturée en sulfate d'ammonium est ajouté à un volume d'éluat. Après 15 minutes, la solution éluat-sulfate d'ammonium est centrifugée pendant 15 minutes à 1

200 x g . Le culot est récupéré dans un faible volume de solution saline stérile. Un mélange de pénicilline (100 U/mL), de streptomycine (100 µg/mL) (Gibco, N.Y.) et 50 µg/mL de gentamycine (Gibco, N.Y.) est ajouté. Ce concentré est ensuite dilué et inoculé sur les cellules en plateaux pour la détection et le titrage des particules virales.

L'efficacité de la précipitation au sulfate d'ammonium est évaluée en comparant les titres viraux dans l'éluat avec les titres viraux dans les concentrés obtenus suite à la précipitation au sulfate d'ammonium.

## **6 MISE EN ÉVIDENCE DU ROTAVIRUS DANS L'EAU USÉE**

Les échantillons d'eau usée à partir desquels nous avons tenté de faire la mise en évidence du rotavirus proviennent de l'usine d'épuration de Sainte-Rose (Laval, Qué.). L'eau usée a été échantillonnée après la première sédimentation. Cette même eau a aussi servi pour les expériences d'évaluation de l'efficacité de la méthode de concentration lors du traitement d'eau usée décrite précédemment (matériel et méthodes, section 3.5).

La concentration des rotavirus à partir de l'eau usée s'est faite par la méthode d'adsorption et d'élution dans les conditions qui ont été déterminées lors de la mise au point de la méthode.

## **RÉSULTATS**

## **1 PRÉPARATION ET TITRAGE DES STOCKS DE SA-11**

Nous avons observé une très grande variation du titre de SA-11 provenant d'une même production virale (Tableau VII, stocks 1 et 2). Les titres évalués à partir des différents aliquotes d'un même stock de SA-11 pouvaient atteindre une variation de plus de 80% (selon les écarts-types obtenus). En traitant la production virale avec du fréon et en la filtrant avant la congélation, il fut possible de diminuer cette variation à près de 30% (Tableau VII, stocks 3, 4 et 5).

Nous avons aussi remarqué une augmentation du titre du SA-11 suite à une dilution dans l'eau de la suspension virale (Tableau VIII). En effet, dans la majorité des cas où les stocks de SA-11 étaient dilués, plus de 100% du virus ajouté à l'eau était alors détecté.

**Tableau VII: Titre moyen des stocks de SA-11**

<b>Stock</b>	<b>n</b>	<b>Titre (NPP x 10<sup>6</sup>/ mL)</b>
1	6	40 ± 32
2	12	36 ± 32
3*	9	17 ± 6
4*	6	15 ± 5
5*	5	60 ± 22

\*Stock traité au fréon et filtré

n : Nombre d'essais

± : Écart-type à la moyenne des «n» essais

**Tableau VIII: Proportion de SA-11 détecté suite à une dilution 1:100 dans l'eau**

<b>Stock</b>	<b>n</b>	<b>SA-11 détecté (%)</b>
1	4	118 ± 47
2	7	144 ± 46
3*	5	148 ± 35
4*	5	138 ± 25
5*	4	142 ± 38

\*Stock traité au fréon et filtré

n : Nombre d'essais

± : Écart-type à la moyenne des «n» essais

## 2 ÉVALUATION DE LA MÉTHODE D'ADSORPTION ET ÉLUTION

### 2.1 Filtres électronégatifs

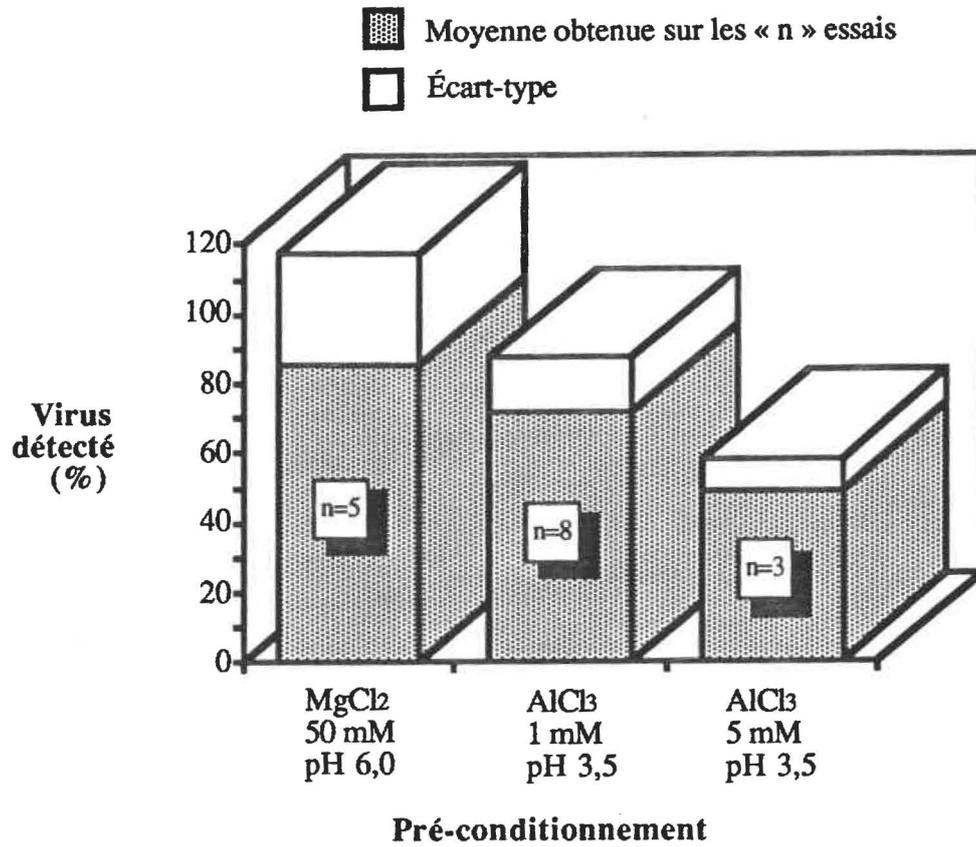
L'adsorption du SA-11 a été évaluée sur les filtres de fibres de verre chargés négativement placés en série 1:1:1 et en série 1:2:2. Les pré-conditionnements au  $MgCl_2$  et  $AlCl_3$  ont été comparés quant à leur capacité d'augmenter l'adsorption du SA-11 sur ces filtres. De plus, nous avons comparé l'efficacité de l'adsorption du SA-11 avec celle du poliovirus Sabin I. Dans tous les cas, 100% représente le titre viral évalué dans les échantillons prélevés suite à l'ajout du virus dans l'eau.

#### 2.1.1 Effet du pré-conditionnement

Nous avons remarqué une diminution du titre du SA-11 suite à l'ajustement des conditions ioniques de l'eau (Figure II).

Les différences observées entre la diminution du titre suite au pré-conditionnement au  $MgCl_2$  et celui au  $AlCl_3$  en concentration finale de 1 mM ne sont toutefois pas significatives si l'on considère l'écart-type obtenu pour les essais avec  $MgCl_2$  ( $85,3\% \pm 32$ ). Ceci nous indique une certaine variabilité des résultats pour ces essais. Par compte, lors des essais effectués avec les différentes concentrations de  $AlCl_3$ , on remarque une diminution du titre de SA-11 plus marquée, et cela de façon significative, lorsque la concentration de  $AlCl_3$  est augmentée à 5 mM ( $49\% \pm 9,4$ ).

Figure II: Proportion de SA-11 détecté dans l'eau suite au pré-conditionnement



### 2.1.2 Adsorption sur filtres électronégatifs placés en série 1:1:1

Que ce soit à l'aide d'un pré-conditionnement au  $MgCl_2$  ou au  $AlCl_3$  1 mM, nous n'observons pas de différences significatives entre les proportions de SA-11 adsorbé sur les filtres électronégatifs placés en série 1:1:1 (Figure III).

Une légère diminution de l'adsorption virale a été remarquée lorsque le  $AlCl_3$  était ajouté en concentration finale de 5 mM ( $81,4\% \pm 11,2$ ). La diminution du pH de l'eau à 6 et à 3 sans ajouter de sels n'a permis que l'adsorption de 41% du SA-11 dans le premier cas et 31% dans le second cas.

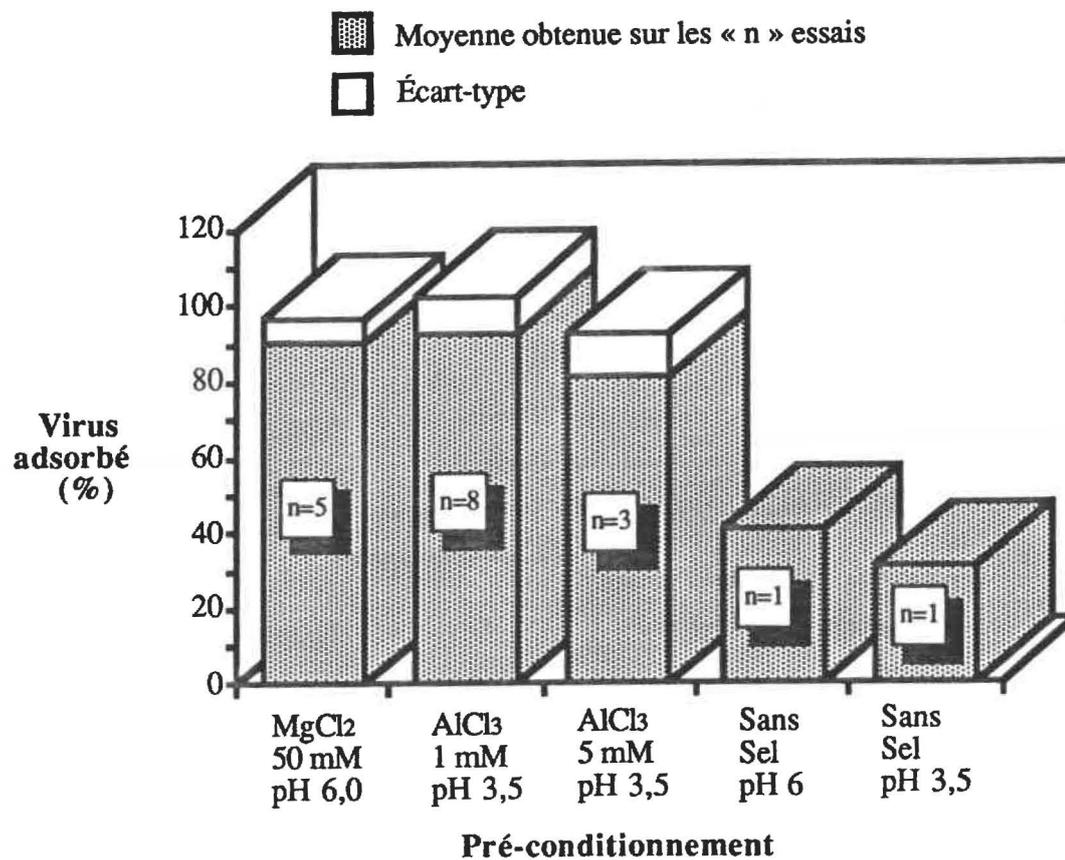
### 2.1.3 Adsorption sur filtres électronégatifs placés en série 1:2:2

L'adsorption du SA-11 sur les filtres électronégatifs à l'aide d'un pré-conditionnement au  $AlCl_3$  en concentration finale de 1 mM est similaire à celle du Sabin I dans les mêmes conditions (Tableau IX).

En ajoutant un deuxième filtre de porosité de  $0,45 \mu m$  et un deuxième filtre de porosité de  $0,25 \mu m$ , nous remarquons une augmentation significative de l'adsorption du SA-11 et du Sabin I (Tableau IX). En effet, près de la totalité des virus ajoutés à l'eau s'adsorbe sur cette série de filtres.

### 2.1.4 Évaluation de l'élution

Plusieurs solutions ont été évaluées quant à leur capacité d'éluer le SA-11 qui était adsorbé sur les filtres électronégatifs à l'aide d'un pré-conditionnement au  $AlCl_3$  en concentration de 1 mM. Le tableau X présente le pourcentage de SA-11 qui a été élué à l'aide de chacune des solutions étudiées.

**Figure III: Adsorption du SA-11 sur les filtres électro-négatifs en série 1:1:1**

**Tableau IX: Adsorption du SA-11 et du Sabin I sur filtres électronégatifs placés en série 1:1:1 et 1:2:2**

Virus	Virus adsorbé (%)			
	n	Série 1:1:1	n	Série: 1:2:2
SA-11	6	83 ± 7	38	99 ± 3
Sabin I	6	82 ± 6	4	99 ± 2

Adsorption effectuée suite à un pré-conditionnement au  $\text{AlCl}_3$  1 mM

n : Nombre d'essais

± : Écart-type à la moyenne des «n» essais

Tableau X: Éluion du SA-11 adsorbé sur filtres électronégatifs

Conditions d'éluion				n	Virus élué <sup>(1)</sup> (%)
Éluant	Concentration	pH	Tween		
E.B.	1,5%	7,0	-	1	3,0
		8,0	-	2	1,0 ± 0,0
		9,0	-	3	2,6 ± 1,5
		9,8	-	12	1,7 ± 1,0
			0,5%	2	3,5 ± 0,5
			1,0%	4	10,25 ± 7,9
			3,0%	2	1,0 ± 0,0
		5,0%	1	3,0	
	10,8	-	1	2,0	
	3,0%	9,0	-	1 <sup>(2)</sup>	4,0
		9,8	-	3	5,0 ± 5,5
		10,0	-	2 <sup>(2)</sup>	5,5 ± 4,5
			1,0%	1 <sup>(2)</sup>	1,0
	8,0%	9,8	-	1	1,0
B.T.P.	10,0%	9,0	-	1 <sup>(2)</sup>	1,0
		9,8	-	1	0,0
		10,0	-	1 <sup>(2)</sup>	5,0
Glycine	0,05 M	9,0	-	1	7,0
		10,0	-	1	5,0
Lysine	1%	9,8	-	1	1,0

(1) : Pourcentage de SA-11 détecté dans l'éluat

(2) : Essais où la solution éluante est préparée dans de la glycine 0,05 M au lieu de l'eau

n : Nombre d'essais

± : Écart-type à la moyenne des «n» essais

La meilleure élution du SA-11 ( $10,25\% \pm 7,9$ ) a été obtenue en utilisant l'E.B. en concentration de 1,5% additionné de 1% de Tween 80 à pH 9,8. Pour les autres essais où l'E.B. en concentration de 1,5% est utilisé à différents pH, la récupération du SA-11 varie entre 1 et 3%. L'augmentation de la concentration en E.B. n'a pas contribué à augmenter l'efficacité de l'élution. En effet, en concentration de 3% la récupération varie de 4 à 5,5% selon le pH, alors qu'avec l'E.B. 8% à pH 8 seulement 1% du SA-11 a été élué.

Les solutions éluantes qui ont été préparées dans la glycine ont permis des récupérations sensiblement équivalentes à celles des mêmes solutions préparées dans de l'eau. La glycine seule a permis une récupération légèrement supérieure. L'utilisation du B.T.P. et de la lysine n'a permis qu'une récupération de 1%.

Trois essais d'élution du poliovirus Sabin I ont été effectués. Le poliovirus était adsorbé sur les filtres électro-négatifs à l'aide du pré-conditionnement au  $\text{AlCl}_3$  1 mM. L'élution se faisait avec de l'E.B. 1,5% additionné de 1% de Tween. Une moyenne de  $72\% \pm 26$  du poliovirus a pu ainsi être élue.

#### 2.1.5 Stabilité dans les solutions éluantes

Une légère diminution du titre initial de SA-11 est observée lorsque celui-ci est placé dans de l'E.B. à pH alcalin (Tableau XI). En effet, le pourcentage de virus détecté passe de 108% dans l'E.B. à pH 7 à 68% dans l'E.B. à pH 10,8. Cette diminution du titre en fonction du pH s'observe aussi lorsque la glycine est utilisée. Une diminution plus marquée est observée lorsque le SA-11 est ajouté à une solution d'E.B. contenant du Tween 80.

Tableau XI: Stabilité du SA-11 dans les solutions éluantes

Solution éluante				n	Virus détecté <sup>(1)</sup> (%)
Éluant	Concentration	pH	Tween		
E.B.	1,5%	7,0	-	3	108 ± 29
		8,0	-	1	132
		9,0	-	2	97 ± 50
		9,8	-	9	65 ± 17
			0,5%	1	41
			1,0%	5	59 ± 23
			3,0%	3	54 ± 23
			5,0%	1	25
		10,8	-	1	68
		3,0%	10	-	2 <sup>(2)</sup>
8,0%	9,8	-	1	63	
B.T.P.	10,0%	9,8	-	1	69
Glycine	0,05M	9,0	-	2	88 ± 18
		10,0	-	2	52 ± 8
Lysine	1%	9,8	-	1	24

(1) : SA-11 qui est détecté dans les solutions éluantes après 5 minutes

(2) : Essais où la solution éluante est préparée dans de la glycine 0,05M au lieu de l'eau

n : Nombre d'essais

± : Écart-type à la moyenne des «n» essais

## 2.2 Filtres électropositifs

### 2.2.1 Évaluation de l'adsorption

Sur les filtres électropositifs de type 1 MDS, la quasi-totalité du SA-11 a été adsorbé sans l'aide de pré-conditionnement (Figure IV). En effet, sur 19 essais, nous avons obtenu une adsorption moyenne de 99% ( $\pm 1,6$ ) du SA-11 ajouté à l'eau.

Il en fut également ainsi en ce qui concerne l'adsorption du poliovirus Sabin I sur ces même filtres où nous avons pu observer une adsorption moyenne de 99% ( $\pm 1,0$ ) sur six essais (Figure IV).

### 2.2.2 Évaluation de l'élution

La condition d'élution qui a permis la meilleure récupération du SA-11 adsorbé sur les filtre électropositifs de type 1 MDS est celle où l'E.B. était utilisé en concentration de 1,5% à pH 9,8 (Tableau XII). En augmentant la concentration d'E.B. à 3%, il a été possible de récupérer 22% du SA-11 dans l'éluat, ce qui représente une amélioration par rapport à l'élution des filtres électronégatifs. Nous avons aussi remarqué qu'un mélange E.B.-B.T.P. pouvait donner de bons résultats. En effet, avec cette combinaison, 29% du SA-11 a été élué alors qu'en préparant l'E.B. dans la glycine, seulement 6% du SA-11 a été élué. L'addition de Tween 80 à la solution d'E.B. n'a pas aidé à augmenter l'efficacité de l'élution.

Deux essais ont été faits dans le but de vérifier si l'élution du Sabin demeurait aussi efficace lorsque les filtres électropositifs étaient utilisés. Sur ces deux essais, une moyenne de 84 % ( $\pm 13$ ) du poliovirus a été récupéré à l'aide de 1,5% d'E.B. à pH 9,8.

Figure IV: Adsorption du SA-11 et du Sabin sur les filtres 1 MDS

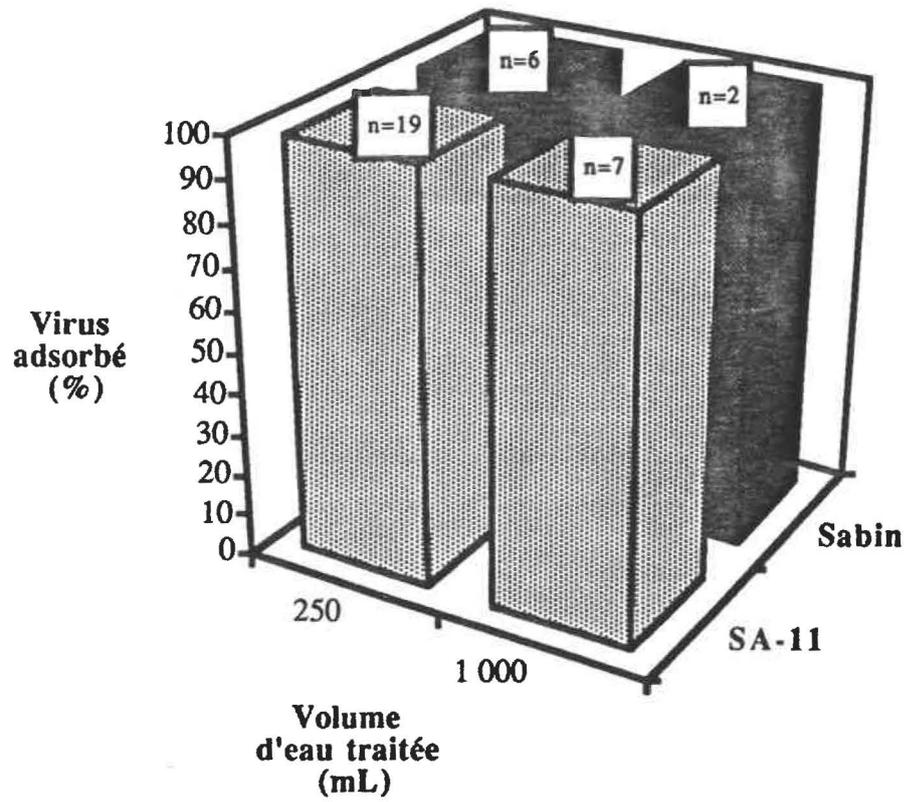


Tableau XII: Élu­tion du SA-11 adsorbé sur filtres 1 MDS

Conditions d'élu­tion				n	Virus élué <sup>(1)</sup> (%)
Éluant	Concentration	pH	Tween		
E.B.	1,5%	9,8	-	4	38 ± 20
			0,5%	6	18 ± 8
	3%	9,8	-	4	22 ± 11
			-	1(2)	6
		10,0	-	1(3)	29
			-		

(1) : Pourcentage de SA-11 détecté dans l'éluat

(2) : Essais où la solution éluante est préparée dans de la glycine 0,05 M au lieu de l'eau

(3) : Essais où la solution éluante est préparée dans du B.T.P. au lieu de l'eau

n : Nombre d'essais

± : Écart-type à la moyenne des «n» essais

### **3. MISE À L'ÉCHELLE**

Les essais préliminaires ayant été faits à partir de faibles volumes d'eau, nous avons procédé à des essais où le SA-11 était ajouté à de plus grands volumes d'eau soit 1 litre et 20 litres. Les filtres utilisés étaient des filtres 1 MDS de 147 mm de diamètre.

#### **3.1 Évaluation de l'adsorption**

Pour les essais où un litre d'eau artificiellement contaminée était traité, nous avons pu observer une adsorption du SA-11 équivalente à celle obtenue lors des essais où de faibles volumes d'eau étaient traités dans les mêmes conditions (Figure IV). En effet, sur sept essais, une proportion de  $99 \pm 1,5\%$  du SA-11 était adsorbée lorsqu'un litre d'eau était traité. La presque totalité du Sabin a aussi été adsorbée lorsque celui-ci était ajouté à un litre d'eau.

#### **3.2 Évaluation de l'élution**

Puisque les filtres étaient plus grands, nous avons d'abord dû déterminer quelle était la quantité de solution éluante qui était nécessaire pour éluer la majorité des virus adsorbés. En pratiquant une élution avec un litre d'E.B. 1,5% passé sur les filtres en 10 fractions de 100 mL, nous avons remarqué que la majorité du SA-11 se retrouvait dans les deux premières fractions éluantes (Figure V).

Ainsi, pour le traitement de grands volumes d'eau, l'élution a été pratiquée avec 300 mL d'E.B. 1,5% à pH 9,8. Dans ces conditions, l'efficacité de l'élution n'a pas diminué de façon significative comparativement au traitement de petits volumes d'eau (Figure VI). En effet, lorsque le SA-11 était ajouté à 250 mL d'eau, il a été possible d'en récupérer dans l'éluat 38 % ( $\pm 20$ ) alors que pour le traitement de 1 et 20 litres d'eau, 42 ( $\pm 22$ ) et 30% ( $\pm 15$ ) du SA-11 ont été respectivement élués.

Figure V: Éluion du SA-11 adsorbé sur filtres 1 MDS avec 10 fractions de 100 mL d'E.B. 1,5% à pH 9,8.

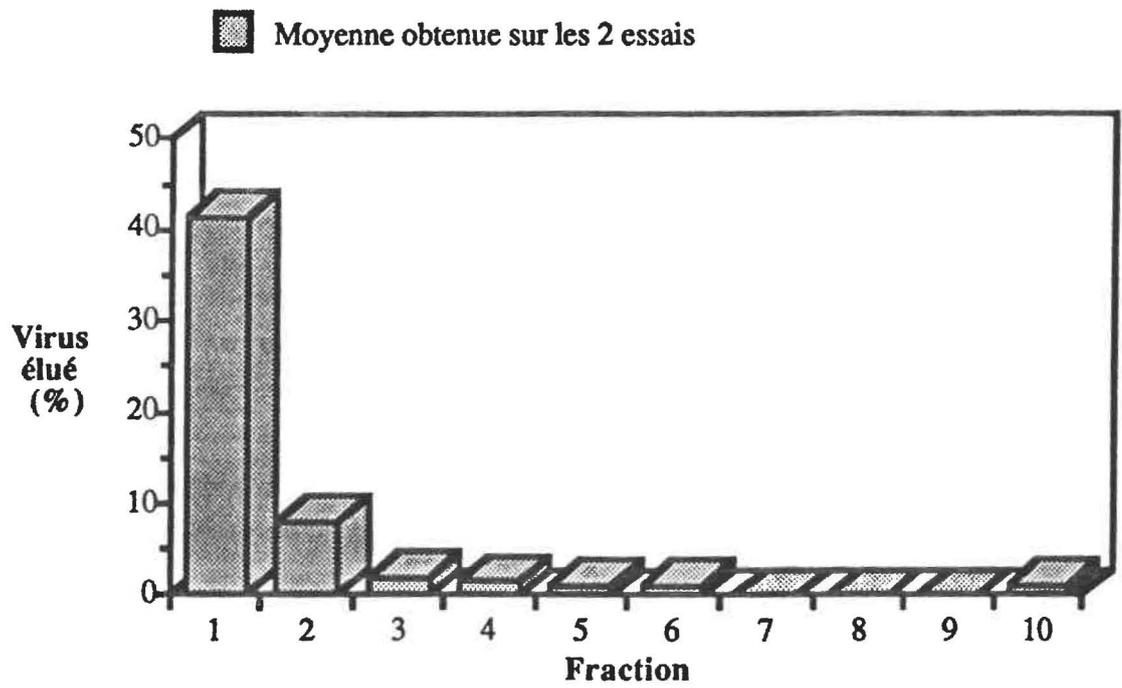
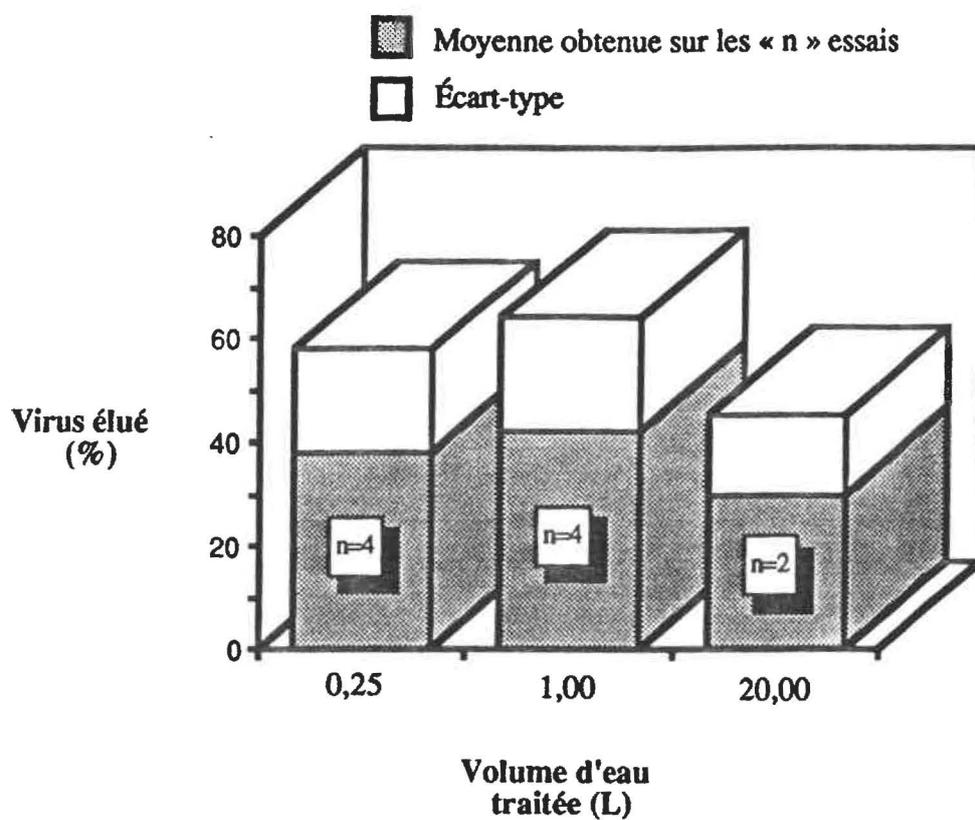


Figure VI: Élué du SA-11 adsorbé sur filtres 1 MDS avec E.B. 1,5% à pH 9,8



## **4 CONCENTRATION À PARTIR DE L'EAU USÉE**

Les expériences faites en utilisant de l'eau stérile et de l'eau du robinet nous ont permis de déterminer les conditions d'adsorption et d'élution les plus efficaces, soit une adsorption sur les filtres électropositifs 1 MDS et une élution avec l'E.B. en concentration de 1,5% à pH 9,8. Nous avons par la suite vérifié si dans ces conditions il était possible de concentrer efficacement du SA-11 ajouté dans de l'eau usée.

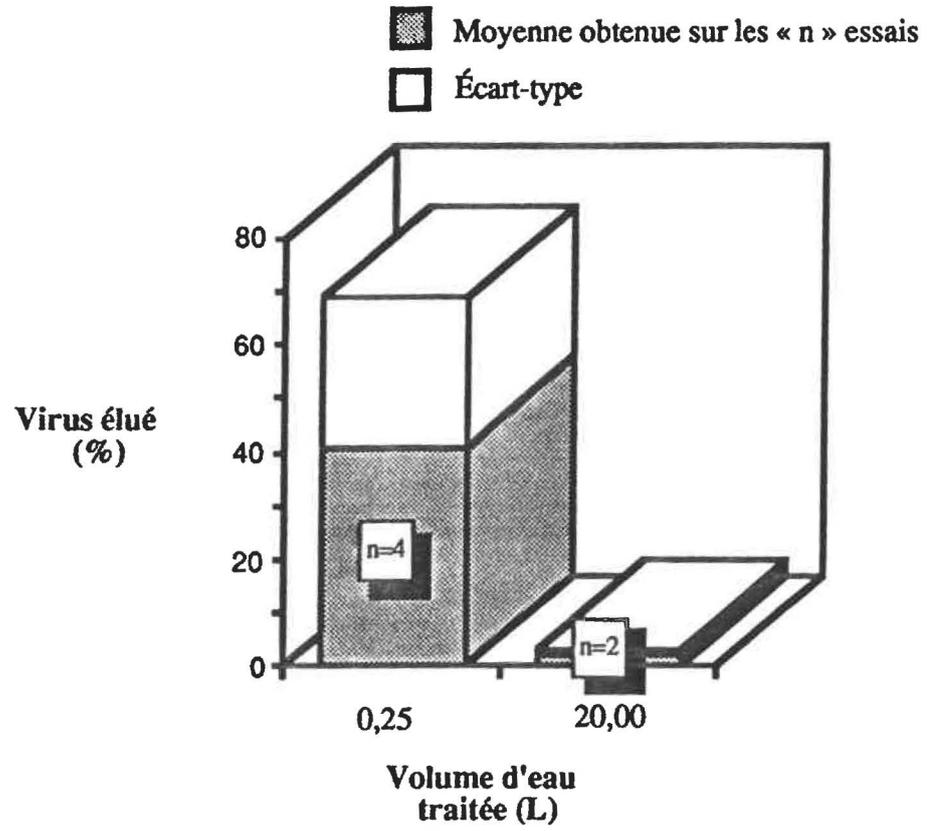
### **4.1 Évaluation de l'adsorption**

L'efficacité de l'adsorption est demeurée la même lorsque le SA-11 était ajouté à 250 mL d'eau usée. Sur quatre essais, une moyenne de 99% ( $\pm 1,2$ ) du SA-11 était adsorbée sur les filtres électropositifs 1 MDS.

### **4.2 Évaluation de l'élution**

Lors du traitement de 250 mL d'eau usée artificiellement contaminée avec le SA-11, nous avons récupéré dans l'éluat une moyenne de 41% ( $\pm 38$ ) du SA-11 adsorbé sur les filtres 1 MDS (Figure VII). Lorsque le SA-11 était ajouté à 20 litres d'eau usée, le pourcentage de récupération dans l'éluat était alors de 2% ( $\pm 1$ ). Dans les deux cas, la solution éluante utilisée était de l'E.B. en concentration de 1,5% à pH 9,8.

Figure VII: Élué du SA-11 ajouté à de l'eau usée



## 5 PRÉCIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM

Pour les expériences de mise aux point de la méthode, le SA-11 était ajouté à 250 mL d'eau en concentration suffisamment grande pour qu'il soit possible de le détecter dans le filtrat et dans l'éluat, ce qui nous permettait de déterminer l'efficacité de l'adsorption et de l'élution. Pour pouvoir effectuer la recherche de rotavirus à partir de grands volumes d'eau usée, il faut procéder à l'étape de concentration de l'éluat pour être en mesure de détecter les rotavirus pouvant y être présents. Cette seconde étape se fait à l'aide de la précipitation au sulfate d'ammonium.

Pour vérifier l'efficacité de cette méthode, nous avons comparé le titre de SA-11 dans l'éluat, suite à l'adsorption et l'élution du SA-11 ajouté dans 20 litres d'eau, avec celui du concentré obtenu suite à la précipitation au sulfate d'ammonium. Sur deux essais, une moyenne de 75% ( $\pm 0,5$ ) du SA-11 présent dans les éluats était récupérée par la précipitation au sulfate d'ammonium dans un volume de 4 mL de solution saline.

## 6 RECHERCHE DE ROTAVIRUS DANS L'EAU USÉE

Six tentatives de mise en évidence de rotavirus dans les eaux usées ont été faites. Dans tous les cas, il a été possible de détecter du rotavirus dans la dilution 1:2 des concentrés (Tableau XIII). Par contre, lorsque les concentrés étaient inoculés sans être dilués, il a été impossible de déterminer le nombre de puits positifs ou négatifs puisque dans les 32 puits inoculés, les cellules étaient complètement dégénérées. Aux dilutions 1:5, un moins grand nombre de puits présentaient des cellules dégénérées. À cette dilution, dans tous les puits où les cellules étaient saines, aucun rotavirus n'a été détecté.

Ainsi un essai a été fait où les inoculums ont été enlevés après deux heures d'incubation. Les cellules étaient observées à toutes les demi-heures. Dès le premier 30 minutes, les cellules semblaient affectées. Après une heure, un début de dégénérescence était observé et après deux heures plus de 50% des cellules mises en contact avec les concentrés purs étaient dégénérées. Ainsi un deuxième essai a été fait, mais cette fois-ci en retirant les inoculums après 30 minutes d'incubation. Lors de ces essais, aucun rotavirus n'a été détecté par immunoperoxidase dans les échantillons analysés ainsi que dans les témoins.

**Tableau XIII: Analyse des concentrés inoculés sur les cellules MA-104**

Dilution des concentrés	Nombre de puits (%) <sup>(1)</sup>		
	Positif <sup>(2)</sup> au SA-11	Négatif <sup>(2)</sup> au SA-11	Sans cellule <sup>(3)</sup>
Pur	?	?	100
1:2	53	9	38
1:5	0	94	6

(1) : Pourcentage moyen calculé à partir de six expériences, où 32 puits étaient inoculés pour chacune des dilutions

(2) : À l'immunoperoxidase

(3) : Puits où la totalité des cellules étaient dégénérées

## **DISCUSSION**

La méthode de concentration de virus dans l'eau par adsorption et élution est utilisée de façon routinière pour mettre en évidence la présence de virus entérique dans différents types d'eau. Jusqu'à maintenant, il n'a pas été possible d'isoler du rotavirus dans l'eau usée de la région de Montréal avec cette méthode. Pourtant, selon différentes études, il semblerait que le rotavirus puisse se retrouver dans les eaux usées en concentration allant de 1 450 à 65 300 foyers d'immunofluorescence par 100 litres d'eau (IFF/100 L; Smith et Gerba, 1982a; Raphael *et al.*, 1985a et Bosch *et al.*, 1988) et en concentration de 1 à 1 000 IFF/ 100 L dans l'eau potable (Deetz *et al.*, 1984; Rose *et al.*, 1986; Gerba *et al.*, 1986 et Toranzos *et al.*, 1986).

Nous avons donc étudié les conditions de concentration par adsorption et élution afin d'en évaluer l'efficacité pour la concentration des rotavirus. En ajoutant une quantité connue de rotavirus dans de l'eau et en procédant aux étapes d'adsorption et d'élution, il a été possible d'évaluer la quantité de rotavirus à chacune des étapes de la méthode, ceci dans le but d'identifier à quel niveau se produisait la perte du virus. De la même façon et en modifiant les conditions d'adsorption ou d'élution, nous avons pu déterminer quelles étaient les conditions qui permettraient une concentration plus efficace du rotavirus.

## 1. PRÉPARATION ET TITRAGE DES STOCKS DE SA-11

Le rotavirus simien SA-11 a été utilisé comme modèle pour la mise au point de la méthode de concentration. Le SA-11 a été utilisé par plusieurs chercheurs comme modèle de rotavirus car le rotavirus humain est difficile à propager en culture cellulaire.

Lors de chacune des expériences, la concentration de SA-11 ajouté à l'eau était déterminée à partir du titre des suspensions virales suite à leur décongélation. Nous avons noté de très grandes variations entre les titres évalués dans les aliquotes provenant d'une même production de SA-11. L'agrégation des virus empêcherait la détection de la totalité des particules virales présentes et pourrait expliquer ces variations de titres (Floyd et Sharp, 1978). Un traitement au fréon suivi d'une filtration des suspensions virales ont permis une diminution de 50% des écarts de titre. Le traitement au fréon briserait les agrégats et la filtration permettrait une sélection des virus moins agrégés (Toranzos et Gerba, 1989).

La présence d'agrégats s'est manifestée à nouveau lorsque nous avons procédé à l'ajout du SA-11 dans l'eau. Les titres supérieurs à 100% du virus ajouté que nous avons obtenus, sont probablement dûs à la dispersion, au contact de l'eau, des agrégats toujours présents dans les suspensions virales (Floyd et Sharp, 1977). Ainsi, il a été possible d'uniformiser la population virale à l'aide du traitement au fréon et de la filtration sans toutefois éliminer la totalité des agrégats dans les suspensions virales. À la lumière de ces résultats, nous avons donc décidé d'utiliser comme titres initiaux de SA-11 ceux évalués suite à la dilution du virus dans l'eau puisque qu'ils semblent être plus représentatifs de la réalité comparativement aux titres évalués à partir des suspensions virales.

Les écarts-types obtenus, qui sont parfois relativement grands, demeurent dans la marge d'erreur permise par la méthode du nombre le plus probable (NPP) que nous avons

utilisée pour calculer les titres viraux. En effet, pour obtenir des résultats significatifs, il faut utiliser un minimum de 40 inoculums par dilution, sinon la valeur de l'indice NPP peut varier d'un facteur de 10 (Hugues, 1981).

Pour la mise au point de la méthode de concentration, nous utilisons huit inoculums par dilution pour évaluer les titres de SA-11 dans les différents échantillons. Ainsi, l'indice NPP obtenu nous laissait une marge d'erreur relativement grande. Il aurait été fastidieux d'utiliser un plus grand nombre d'inoculums puisque pour un seul traitement d'eau, au moins quatre échantillons était analysés avec un minimum de quatre dilutions par échantillon.

## 2 ÉVALUATION DE LA MÉTHODE D'ADSORPTION ET ÉLUTION

### 2.1 Filtres électronégatifs

Parce qu'une méthode de concentration efficace devrait permettre la récupération de différents virus, nous avons tenté de conserver dans la mesure du possible les conditions déjà utilisées pour la concentration des autres virus. Ainsi nous avons, dans un premier temps, évalué la possibilité d'utiliser les filtres électronégatifs pour la concentration des rotavirus. Les filtres de fibres de verre chargés négativement sont les filtres qui se sont montrés les plus résistants au colmatage et qui sont capables de supporter les plus grands débits d'eau (Smith et Gerba, 1982a; Rao *et al.*, 1986). À l'aide de ces types de filtres, Smith et Gerba (1982a) ont obtenu des récupérations de 80% lorsque le SA-11 était ajouté à de l'eau distillée et de 29% lorsque le SA-11 était ajouté à de l'eau usée. L'adsorption se faisait à l'aide d'un pré-conditionnement au  $\text{AlCl}_3$  en concentration finale de 0,5 mM à pH 3,5 et l'élution à l'aide du B.T.P. préparé dans la glycine 0,05 M à pH 10.

#### 2.1.1 Effet du pré-conditionnement

Lorsque des filtres électronégatifs sont utilisés, la première étape consiste à pré-conditionner l'eau en diminuant le pH pour renverser les charges de surface des virus à une valeur positive et en y ajoutant des sels pour favoriser les interactions électrostatiques entre les particules virales et la surface adsorbante (revue de littérature section 2.2.1 et 2.2.2). La diminution du pH ainsi que l'ajout de cations sont deux facteurs pouvant affecter l'intégrité des virus. En effet, nous avons observé une diminution du titre du SA-11 suite aux deux types de pré-conditionnement que nous avons utilisés. Le rotavirus est instable à pH 3,5 (Palmer *et al.*, 1977; Guttman-Bass et Armon, 1983). Cette instabilité a été observée suite au pré-conditionnement au  $\text{AlCl}_3$  qui se pratique à pH 3,5 comparativement à celui au  $\text{MgCl}_2$

à pH 6. Toutefois, la diminution du titre de SA-11 suite au pré-conditionnement ne semble pas uniquement dûe au pH acide puisque nous observons aussi une diminution plus marquée du titre lorsque le  $\text{AlCl}_3$  est cinq fois plus concentré. Ainsi, la présence de sels dans le milieu de suspension semble aussi avoir un effet sur le SA-11. Toutefois, la diminution du titre de SA-11 suite au pré-conditionnement n'est pas suffisamment grande pour expliquer l'inefficacité de la méthode de concentration.

### 2.1.2 Adsorption

En évaluant l'efficacité de l'adsorption du SA-11 sur les filtres électronégatifs simples (série 1:1:1), nous avons constaté que l'addition de sels était essentielle à l'adsorption du SA-11 et qu'une diminution de l'efficacité de l'adsorption était observée lorsque le  $\text{AlCl}_3$  était utilisé en concentration de 5 mM. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Smith et Gerba (1982a) où une adsorption de 60% du SA-11 a été observée sur les filtres électronégatifs à pH 3,5 en absence de sels. De plus, ces auteurs ont noté une diminution de l'adsorption lorsque le  $\text{AlCl}_3$  était utilisé à des concentrations supérieures à 1,5 mM. Une trop grande concentration de sels pourrait entraîner un renversement des charges de surface des virus créant une répulsion entre les virus et la surface des filtres (Mix, 1974).

De façon générale, le facteur limitant d'une méthode de concentration par adsorption et élution ne se retrouve pas au niveau de l'efficacité de l'adsorption des virus. Ainsi, les pourcentages d'adsorption que nous avons obtenus à l'aide des pré-conditionnements au  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{AlCl}_3$  en concentration de 1 mM sur les filtres plats n'étaient pas suffisamment élevés. Pourtant, plusieurs auteurs ont obtenu une adsorption totale du SA-11 sur les filtres de fibre de verre électronégatifs à l'aide du pré-conditionnement au  $\text{AlCl}_3$  à pH 3,5 (Smith et Gerba, 1982a; Goyal et Gerba, 1983; Guttman-Bass et Armon, 1983; Rao *et al.*, 1986). De plus, la plupart des filtres utilisés dans les conditions appropriées devrait permettre

l'adsorption complète des virus présents dans l'eau; il est rare que la capacité d'adsorption des filtres ne soit excédée (Smith et Gerba, 1982a).

Le fait qu'un problème indépendant du type de virus se manifestait au niveau de l'adsorption s'est vu confirmé lorsque nous avons constaté que l'adsorption du Sabin dans les mêmes conditions que pour le SA-11 n'était pas totalement efficace non plus. Normalement, dans nos laboratoire, 100% du Sabin est adsorbé sur des filtres électronégatifs en cartouche à l'aide du  $\text{AlCl}_3$  en concentration finale de 1 mM à pH 3,5. En ajoutant un filtre supplémentaire de chacune des porosités, nous avons réussi à obtenir une adsorption complète du SA-11. Cette augmentation de l'efficacité d'adsorption suite à l'ajout de ces filtres s'est vue confirmée lorsque nous l'avons vérifiée à l'aide du Sabin.

Avec les filtres placés en simple, l'eau devait circuler au travers des filtres trop rapidement pour permettre l'adsorption de la totalité des virus. En effet, un temps de contact minimum est nécessaire pour que les interactions virus-surface adsorbante se fassent (Scutt, 1971). Sans diminuer le débit de l'eau, mais en ajoutant un second filtre de chacune des porosités, nous avons pu augmenter la quantité de virus adsorbés en augmentant le temps de passage de l'eau sur les filtres.

### 2.1.3 Élu­tion

La capacité des solutions contenant des protéines qui interfèrent avec l'adsorption des virus sur les filtres rend ces composés très utiles pour l'élu­tion des virus adsorbés à la surface de filtres. L'efficacité de composés comme l'E.B. et le B.T.P. pour l'élu­tion de virus entériques adsorbés sur filtres électronégatifs a souvent été rapportée. De plus, ces solutions riches en protéines rendent plus facile la seconde étape de concentration par des méthodes comme la floculation organique ou la précipitation au sulfate d'ammonium.

À l'aide du B.T.P. 10% préparé dans la glycine 0,05 M à pH 10, des pourcentages d'éluion de 68% (Rao *et al.*, 1986) et de 80% (Smith et Gerba, 1982a) du SA-11 adsorbé sur les filtres électronégatifs ont été rapportés. Dans notre étude, cette même solution n'a permis que l'éluion de 5% du SA-11. À pH 9 et 9,8, cette même solution ne s'est pas montrée plus efficace.

Par ailleurs l'équipe de Rao (1986) a pu éluer 54% du SA-11 adsorbé sur filtres électronégatifs avec de l'E.B. 3% préparé dans la glycine 0,05 M. Ici aussi, les résultats que nous avons obtenus à l'aide de la même solution éluante sont nettement inférieurs. Par contre, Guttman-Bass et Armon (1983) ont obtenu des résultats sensiblement équivalents aux nôtres en utilisant de l'E.B. 3 % à pH 9. En fait, ils n'ont réussi qu'à éluer 3,1 % du SA-11 adsorbé sur filtre électronégatif avec cette solution. Ici, l'augmentation du pH de la solution d'E.B. à 9,8 ou 10 n'a pas permis l'amélioration de l'éluion.

Dans nos laboratoires, l'éluion des virus entériques adsorbés sur les cartouches filtrantes de fibres de verre est pratiquée de façon efficace à l'aide d'une solution de 1,5% d'E.B. à pH 9,8 additionnée de 0,5% de Tween 80. Le Tween 80 est utilisé pour favoriser l'éluion des bactériophages. Aucune autre étude ne rapporte l'utilisation de ce détergent pour favoriser l'éluion du SA-11 adsorbé sur filtres électronégatifs. Dans nos expériences, bien que l'on ait obtenu le pourcentage d'éluion le plus élevé lorsque 1 % de Tween 80 était ajouté à l'E.B. 1,5 %, on ne peut conclure que l'augmentation de SA-11 élué est dû à la présence de Tween dans la solution éluante. En effet, avec 0,5 ,3 ou 5% de Tween, l'éluion n'est pas plus efficace qu'en absence de Tween. Nous devons aussi tenir compte de l'écart-type qui représente une variation de près de 80% entre les quatre essais où 1% de Tween était utilisé. Ainsi, il serait possible que cette moyenne élevée du pourcentage d'éluion ne soit dûe en fait qu'aux résultats d'une seule expérience.

Devant l'inefficacité de l'E.B. en différentes concentrations et à différents pH, nous avons évalué la possibilité d'utiliser un tampon glycine ou une solution de lysine pour éluer le SA-11. Ces solutions se sont montrées tout aussi inefficaces que toutes les autres solutions testées. Les tampons à pH élevé ainsi que certains acides aminés se sont pourtant montrés très efficaces pour l'élution de certains virus moins sensibles à des pH extrêmes. Mais il a été démontré que le rotavirus était instable à des pH de 10 et plus (Palmer *et al.*, 1977). Ceci concorde avec les résultats que nous avons obtenus lors de l'évaluation de la stabilité du SA-11 dans les différentes solutions éluantes. En effet, nous avons observé une relation entre la diminution des titres de SA-11 et l'augmentation du pH.

Bien que certains auteurs aient réussi à obtenir des pourcentages d'élution du SA-11 satisfaisants, dans notre étude, pour aucune des conditions testées, il ne fut possible d'éluer efficacement le SA-11 adsorbé sur les filtres électronégatifs. Hurst *et al.* (1984) rapportent qu'il est possible d'observer des différences significatives de la capacité d'élution d'E.B. provenant de différents lots. Bien que dans nos laboratoires chacun des nouveaux lots d'E.B. soit testé quant à son efficacité d'élution du poliovirus, on ne peut prendre pour acquis que les lots utilisés avaient les mêmes capacités d'élution pour le rotavirus. Une seconde possibilité serait, comme l'ont mentionné Toranzos et Gerba (1989), que plusieurs chercheurs ne purifient pas les stocks de SA-11 à l'aide d'un traitement au fréon. Ainsi, l'observation d'une récupération élevée peut n'être en fait qu'un artefact dû à la dispersion des agrégats de virus par les conditions d'élution.

En procédant à l'adsorption du Sabin sur les filtres électronégatifs plats à l'aide du pré-conditionnement au  $AlCl_3$  en concentration de 1 mM, nous avons obtenu une récupération moyenne de 72%. L'élution se faisait avec l'E.B. 1,5% à pH 9,8. Ce pourcentage de récupération est similaire à celui obtenu lorsque les virus entériques sont concentrés à l'aide

des filtres électronégatifs en cartouche. Ainsi, la difficulté que nous éprouvons à éluer le rotavirus des filtres électronégatifs semble être reliée aux caractéristiques du virus lui-même.

La force des interactions électrostatiques entre les particules virales et les filtres adsorbants peut varier selon le type de virus (Farrah et Shields, 1981). Le point isoélectrique des rotavirus est plus bas que celui du poliovirus (4,5; Matsuno et Inouye, 1983); donc la charge positive créée à la surface du rotavirus suite au pré-conditionnement sera plus grande que celle du poliovirus. Les liaisons qui retiennent les rotavirus à la surface adsorbante seront donc plus difficiles à renverser. Ainsi, le détachement des rotavirus de la surface des filtres à l'aide de la solution éluante sera plus difficile à réaliser. De plus, les ions qui favorisent l'adsorption des virus sur les filtres sont ceux qui favorisent les interactions hydrophobiques (Hatefi et Hanstei, 1979). Comme les interactions hydrophobiques interviennent de façon plus marquées à des pH alcalins, l'addition de sels pour favoriser l'adsorption aura pour effet de rendre l'élution plus difficile. Ainsi, pour pouvoir éluer les rotavirus qui sont adsorbés sur les filtres électronégatifs, des conditions d'élution plus drastiques que celles utilisées pour les autres virus seraient nécessaires.

## **2.2 Filtres électropositifs**

Les filtres chargés positivement ont été développés et mis sur le marché récemment. Ces filtres ont été évalués par certains auteurs pour la concentration des virus entériques et se sont montrés être tout aussi efficaces que les filtres chargés négativement. Ceux-ci pourraient présenter une alternative intéressante pour la concentration des rotavirus puisque aucun pré-conditionnement n'est nécessaire pour permettre l'adsorption des virus à leur surface. Par contre, les filtres électropositifs se sont montrés plus sensibles à l'obstruction par diverses matières en suspension dans l'eau (Smith et Gerba, 1982a). Ceci pourrait être un facteur limitant en ce qui concerne le traitement des eaux usées.

### 2.2.1 Adsorption

La totalité du SA-11 ajouté à de l'eau distillée devrait être adsorbé à la surfaces des filtres électropositifs à des pH variant de 5,0 à 8,5 (Toranzos et Gerba, 1989; Guttman-Bass et Armon, 1983; Raphael *et al.*, 1985b). Nous avons aussi obtenu une adsorption complète du SA-11 ajouté à de l'eau dé-ionisée stérile sur les filtres électropositifs de type 1 MDS. Ainsi, à des pH ambiants, le SA-11 est suffisamment chargé pour que les interactions électrostatiques et hydrophobiques entre la surface adsorbante et les particules virales puissent se faire. De cette façon, le SA-11 peut donc être adsorbé efficacement sans être soumis aux conditions extrême de pH ou de forte concentration d'ions.

L'adsorption du poliovirus est demeurée tout aussi efficace sur les filtres électropositifs. Ceci est important si l'on désire concentrer d'autres virus entériques à l'aide d'une même méthode.

### 2.2.2 Éluion

L'éluion du SA-11 adsorbé à la surface des filtres électropositifs a été pratiquée à l'aide de différentes solutions. Le pourcentage de récupération le plus élevé que nous ayons obtenu fut avec de l'E.B. 1,5% à pH 9,8. Pourtant, c'est avec de l'E.B. 3% à pH 9 que Guttman-Bass et Armon (1983) ont obtenu l'éluion la plus efficace (61%) du SA-11 adsorbé sur les filtres électropositifs. Les peptides présents dans la solution éluante agissent au niveau de sites spécifiques sur la surface adsorbante (Toranzos et Gerba, 1989). Ainsi, pour une solution comme l'E.B., même si la concentration en protéines est augmentée, il est possible de ne pas observer d'augmentation de l'efficacité d'éluion puisque les sites d'action des protéines peuvent tout simplement être saturés. En utilisant une seconde solution protéique contenant des peptides autres que ceux présents dans l'E.B et qui agiraient donc au niveau de

différents sites sur les filtres, il serait possible d'augmenter la quantité de virus élués (Toranzos et Gerba, 1989). C'est ce que nous avons fait en utilisant un mélange d'E.B. 3% et de B.T.P. 10%. La récupération que nous avons obtenue à l'aide de cette solution a été supérieure à celle obtenue avec l'E.B. 3% seul, mais inférieure à celle obtenue avec l'E.B. 1,5%. De plus, le pourcentage de récupération que nous avons observé avec l'E.B./B.T.P. est nettement inférieur à celui rapporté dans la littérature (106%; Toranzos et Gerba, 1989). L'importance de la compétition entre les protéines de la solution éluante et les virus adsorbés sur les filtres électropositifs a pu être observée lorsque nous avons constaté que seulement 5% du SA-11 était élué avec le tampon glycine à pH 10.

Bien que nous n'ayons pas obtenu des pourcentages de récupération aussi élevés que ceux rapportés dans la littérature, l'élution du SA-11 adsorbé sur les filtres électropositifs a été beaucoup plus efficace que lorsque les filtres électronégatifs étaient utilisés. Les résultats obtenus suite aux expériences sur les filtres électropositifs supportent l'hypothèse selon laquelle le pré-conditionnement effectué pour permettre l'adsorption des virus sur les filtres électronégatifs rend plus difficile l'élution du SA-11. Les liens électrostatiques qui permettent l'adsorption du SA-11 à la surface des filtres électropositifs sont moins forts, donc plus faciles à briser. De plus, comme il a été mentionné plus tôt, les interactions hydrophobiques ont une influence majeure au niveau de l'élution et puisque ce type d'interactions ne joue pas un rôle important dans l'adsorption des virus sur les filtres électropositifs, il en résulte une diminution de l'interférence lors de l'élution. (Toranzos et Gerba, 1989).

Les meilleures conditions d'adsorption et d'élution du rotavirus que nous ayons obtenues sont celles où le SA-11 est adsorbé sur les filtres électropositifs sans pré-conditionnement et élué avec de l'E.B. 1,5% à pH 9,8. Dans ces conditions, nous avons récupéré 38% du SA-11 ajouté à 250 mL d'eau dé-ionisée. De plus, nous avons pu récupérer

87% du Sabin qui était adsorbé sur les filtres électro-négatifs 1 MDS et élué à l'aide de l'E.B. 1,5% à pH 9,8. Ces résultats nous démontrent que l'efficacité des filtres électro-positifs demeure équivalente à celle des filtres électro-négatifs en ce qui concerne l'adsorption et l'élu-tion du Sabin. Par conséquent, il serait possible d'utiliser les filtres électro-positifs pour concentrer différents virus entériques dans l'eau.

### 3 MISE À L'ÉCHELLE

La méthode a été mise au point à partir de petits volumes d'eau, afin de diminuer l'ampleur des manipulations. Cela nous permettait de procéder à un plus grand nombre d'essais. À ce moment, de l'eau dé-ionisée stérile était utilisée pour nous permettre de contrôler les conditions ioniques. Nous devions donc ensuite procéder à des essais où le SA-11 était ajouté à de plus grands volumes d'eau du robinet puisque, pour mettre en évidence la présence de virus dans l'eau, de grands volumes doivent être échantillonnés.

L'adsorption du SA-11 et du Sabin ajouté à un litre d'eau est demeurée tout aussi efficace que lors du traitement de 250 mL d'eau. Cependant, lorsque nous avons traité 20 L d'eau du robinet artificiellement contaminée, nous n'avons pas tenté de déterminer le pourcentage de virus adsorbé puisque le facteur de dilution au niveau du filtrat devenait trop grand pour nous permettre de procéder à la détection du SA-11.

Le facteur de concentration de la méthode dépend du volume de solution éluante utilisé. Nous avons pu constater que 300 mL de solution éluante était suffisant pour éluer le SA-11 adsorbé sur les filtres plats de 145 mm de diamètre. En effet, pour une efficacité d'élution totale de 56% nous avons détecté 50% dans les premiers 300 mL d'éluat et 6% dans les 700 mL suivants. Évidemment, l'emploi d'un plus faible volume de solution éluante serait souhaitable; cependant, dans notre cas il a fallu compenser la faible efficacité de l'élution par l'utilisation d'un plus grand volume de solution éluante.

La quantité de virus élué suite au passage de 1 L d'eau du robinet ne diminue pas par rapport à celle élue lors du traitement de 250 mL d'eau dé-ionisée stérile. Par contre, en traitant 20 L d'eau stérile nous avons observé une baisse de près de 10% du SA-11 élué. Il est fort probable que cette faible diminution de récupération soit causée par une adsorption

moins efficace du SA-11. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation du débit d'eau et par une interférence causée par la présence de sels et de différentes particules en suspension dans l'eau du robinet.

#### 4 CONCENTRATION À PARTIR DE L'EAU USÉE

Peu de méthodes permettant une concentration efficace du rotavirus à partir de l'eau usée ont été décrites. Une des seules études portant sur la concentration des rotavirus à partir d'eau usée par la méthode d'adsorption et d'élution sur filtres électropositifs est celle de Raphael *et al.* (1985b). Ces auteurs récupèrent 70 et 16% du SA-11 ajouté respectivement à 250 mL et 20 L d'eau usée. Cela représente une diminution d'efficacité de plus de 50%. Dans notre étude, l'efficacité de la concentration du SA-11 ajouté à 250 mL d'eau usée est demeurée sensiblement équivalente à celle où le SA-11 était ajouté à l'eau dé-ionisée. Par contre, lorsque nous avons traité 20 L d'eau usée contaminé artificiellement avec du SA-11, nous n'avons récupéré dans l'éluat que 2% du virus ajouté.

Un très grand nombre de facteurs peuvent influencer l'efficacité de la méthode lorsque de l'eau usée est traitée. Les filtres électropositifs étant particulièrement sensibles à l'obstruction, nous devons procéder à un premier passage de l'eau sur des filtres clarifiants pour éliminer les matières en suspension. Cette clarification de l'eau peut résulter en une perte de virus. En effet, même si les filtres clarifiants sont traités avec un détergent, il est possible qu'une faible proportion de virus s'adsorbe à leur surface (Sobsey *et al.*, 1985). De plus, les virus peuvent s'adsorber aux particules en suspension dans l'eau et sont retenues par les filtres clarifiants. Même après la clarification, il reste dans l'eau usée une grande variété de composés pouvant interférer avec l'adsorption ou l'élution des virus (Sobsey *et al.*, 1985). De plus, les virus peuvent être inactivés par différentes matières organiques ou inorganiques qui sont concentrées en même temps que ceux-ci (Raphael *et al.*, 1985b).

## 5 RECHERCHE DE ROTAVIRUS DANS L'EAU USÉE

Bien que nous ayons pu mettre en évidence la présence de rotavirus dans les eaux usées échantillonnées, il nous a été impossible d'en déterminer précisément la quantité. En effet, la dégénérescence des cellules empêchait le dénombrement de tous les puits positifs ou négatifs. Cette dégénérescence des cellules semble être causée par des substances toxiques présentes dans les concentrés puisqu'elle commence à apparaître très tôt après l'inoculation des concentrés peu dilués. La destruction du feuillet cellulaire ne semble donc pas résulter d'une infection des cellules puisque qu'aucun effet cytopathique n'est apparu dans les puits où les concentrés plus dilués étaient inoculés et ceci même après plus de 72 heures.

Comme il a été mentionné précédemment, un grand nombre de composés pouvant être toxiques pour les cellules sont concentrés en même temps que les virus (Sobsey *et al.*, 1985). Smith et Gerba (1982a) ont réussi à éliminer ce problème de cytotoxicité en retirant les inoculums après seulement 15 minutes de contact avec le feuillet cellulaire. De cette façon, ils ont réussi à éliminer le problème de cytoxicité sans toutefois diminuer l'efficacité de la détection des rotavirus par immunoperoxidase. Pourtant, dans notre étude, un temps d'incubation de 30 minutes ne s'est pas avéré suffisamment long pour permettre la pénétration des virus dans les cellules puisque même dans les témoins positifs, le SA-11 n'a pu être détecté. De plus, la détection se faisait sur la même lignée cellulaire que celle utilisée par Smith et Gerba. Il est possible que nos cellules aient été moins sensibles. En effet, des différences de sensibilité de cellules peuvent apparaître selon la souche et le nombre de passages (Ayache, 1984). Les cellules MA-104 sont les cellules qui se sont montrées les plus utiles pour la propagation des souches de rotavirus adaptés à la culture de tissus (Aboudy *et al.*, 1989). Par contre, certains auteurs ont rencontré des difficultés à faire croître certaines souches de rotavirus sauvage sur ces mêmes cellules (Hung *et al.*, 1983; Eiden *et al.*, 1985).

Ce problème de cytotoxicité des cellules n'est pas apparu lorsque nous avons mis au point la méthode de concentration pour le traitement des 20 L d'eau usée. En effet, dans notre modèle, une grande quantité de SA-11 était ajoutée à l'eau usée, ce qui nous permettait de détecter le virus à des dilutions des concentrés où l'effet cytotoxique n'apparaissait plus. Il en est ainsi pour la mise en évidence des autres virus entériques qui sont concentrés plus efficacement que les rotavirus. Ainsi, si la méthode de concentration était plus efficace un plus grand nombre de rotavirus serait concentré et nous pourrions procéder à la détection dans des inoculums plus dilués pour éviter la cytotoxicité.

## **CONCLUSION**

---

Notre étude avait pour but de mettre au point une méthode d'adsorption et d'élution efficace pour la concentration des rotavirus à partir de l'eau usée. La méthode déjà utilisée pour la concentration des virus entériques s'est montrée inefficace, au niveau de l'élution, pour la concentration du rotavirus. Bien que l'on ait testé plusieurs solutions éluantes, aucune d'entre elles n'a permis d'augmenter la récupération des rotavirus qui étaient adsorbés sur les filtres électro-négatifs. Puisque le pré-conditionnement qui favorise l'adsorption des virus semblait être responsable de cette difficulté d'élution, nous avons utilisé des filtres électro-positifs qui ne nécessitent pas de pré-conditionnement pour permettre l'adsorption des virus. En utilisant ces filtres, nous avons réussi à augmenter la quantité de rotavirus élués sans toutefois atteindre des pourcentages de récupération équivalents à ceux obtenus pour la concentration du poliovirus. De plus, l'efficacité de la méthode mise au point a diminué de façon significative lorsque de grands volumes d'eau usée étaient traités. Ainsi, il semble que le comportement des rotavirus face aux conditions d'adsorption et particulièrement aux conditions d'élution, diffère de celui du poliovirus.

Les différentes équipes qui ont travaillé sur la mise au point de la méthode de concentration du rotavirus par adsorption et élution en sont venues à des conclusions divergentes sur le choix des filtres ou du type de pré-conditionnement ainsi que sur la nature de la solution éluante à utiliser pour obtenir une concentration efficace des rotavirus (Toranzos et Gerba, 1989; Raphael *et al.*, 1985b; Guttman-Bass et Armon, 1983; Smith et Gerba, 1982a). Par contre, toutes ces équipes ont rencontré des difficultés lorsque les rotavirus étaient concentrés à partir de l'eau usée. Ceci est probablement dû à la nature plus instable des rotavirus comparativement aux autres virus entériques. En effet, l'infectivité du rotavirus dépend de l'intégrité de sa capsid externe. Ainsi, les conditions dans lesquelles se retrouvent les particules virales, lorsqu'elles sont concentrées à partir de l'eau usée,

pourraient entraîner la perte d'une partie ou de la totalité de cette capsid e et donc la perte de l'infectivité des rotavirus.

À l'aide de la méthode mise au point, nous avons pu mettre en évidence la présence de rotavirus dans de l'eau usée provenant de l'usine d'épuration de Sainte Rose (Laval, Qué) sans toutefois pouvoir en estimer la quantité. Étant donné la faible efficacité de la méthode de concentration ainsi que les faibles volumes d'eau échantillonnée ces résultats nous laissent croire que les rotavirus sont présents dans ces eaux usées en concentration relativement grande.

Pour pouvoir poursuivre ces études, il faudra donc se tourner vers des méthodes plus douces afin de concentrer efficacement les rotavirus. Des auteurs ont obtenu de très bons résultats en utilisant l'ultrafiltration (Oragui et Mara, 1989b). Bien que cette méthode soit longue à pratiquer, elle pourrait être utile pour approfondir l'étude de la distribution des rotavirus dans les eaux de la région montréalaise. Une seconde alternative serait l'utilisation de sondes génomiques qui permettent la détection de virus dans de grands volumes d'eau sans avoir à procéder à la concentration des échantillons. Toutefois, l'utilisation de ces sondes en virologie environnementale n'en n'est qu'à ses débuts et présente encore des difficultés en ce qui concerne, entre autre, la distinction entre les particules infectieuses edes paricules non-infectieuses ainsi que l'interférence causée par la présence de différentes substances dans les eaux usées.

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à ceux et celles qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je remercie tout spécialement le Dr Pierre Payment, professeur au Centre de recherche en virologie de l'Institut Armand-Frappier, pour avoir accepté la direction de mes travaux, pour son support tout au long de la réalisation de ce projet ainsi que pour la confiance qu'il a su m'accorder.

Je tiens aussi à remercier Mme Nicole Fillion ainsi que Mme Louise Courtemanche, pour leurs conseils et l'aide technique qu'elles m'ont si judicieusement dispensés.

Je remercie M. Serge Corbeil, étudiant à la maîtrise, sans qui je n'aurais entrepris ces travaux.

Mes remerciements vont tout spécialement à M. Claude Daniel et M. Alain Lamarre, étudiants au doctorat, dont les encouragements et le soutien moral ont été si importants tout au long de mon séjour à l'Institut Armand-Frappier.

Des remerciements tout particuliers s'adressent à Mme Sylvie LaBoissière, étudiante au doctorat, qui en plus d'avoir corrigé cet ouvrage avec attention, rigueur, et enthousiasme, a été et sera toujours une amie précieuse et inestimable. Merci est un faible mot pour lui exprimer toute ma gratitude.

## **BIBLIOGRAPHIE**

---

- ABOUDY, Y., I. SHIF, I. SILBERSTEIN et T. G. STEMATSKY. 1989. Efficiency of isolation of human rotavirus in primary African Green monkey kidney cells. *J. Virol. Meth.* **25**: 251-258.
- ADAMS, W. R. et L. M. KRAFT. 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: Identification of the etiologic agent. *Science* **141**: 359.
- AGBALIKA, F., M. WULLENWEBER et J. PREVOT. 1985. Preliminary evaluation of the ELISA as a tool for the detection of rotaviruses in activated sewage sludge. *Zbl. Bakt. Hyg* **180**: 534-539.
- ALBERTSSON, P. A. 1974. Concentration of virus from water by phase partition. *Water Res.* **16**: 8.
- ANDERSON, G., G. B. CLINE, W. W. HARRIS et J. G. GREEN. 1967. Isolation of viral particles from large fluid volumes. *In*: Transmission of viruses by the water route. Édité par G. Berg, CRC Press, FL. pp. 77-88.
- ARENS, M. et E. M. SWIERKOSZ. 1989. Detection of rotavirus by hybridization with a nonradioactive synthetic DNA probe and comparison with commercial enzyme immunoassays and silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1277-1279.
- AUBERGER, M., H. LAWREN, J. B. LALUQUE et D. BEYTOUT. 1981. Concentration de rotavirus par adsorption-élution sur poudre de verre. Résultats préliminaires. *J. Fran. Hydrol.* **12**: 229-238.
- AYACHE, R. 1984. Contribution à l'étude des méthodes de concentration des virus dans les eaux d'égouts: application aux eaux d'égouts urbaines de Montréal et Laval. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier, Laval, Québec.
- BANATCALA, J. E., B. TOTTERDELL, I. L. CHRYSTIE et G. N. WOOD. 1975. *In vitro* detection of human rotavirus. *Lancet* **2**: 821.
- BELFORT, G., Y. ROTEM et E. KATZNELSON. 1974. Virus concentration using hollow fiber membranes. *Water Res.* **9**: 79-85.
- BERG, G., D. BERMAN, S. I. CHANG et N. A. CLARKE. 1966. A sensitive quantitative method for detection of small quantities of virus in large volumes of water. *Am. J. Epidemiol.* **83**: 196-203.
- BERG, G., D. R. DAHLING et D. BERMAN. 1971. Recovery of small quantities of viruses from clean waters on cellulose nitrate membrane filters. *Appl. Microbiol.* **22**: 608-614.
- BERGER, P. S. et S. REGLI. 1988. Drinking water regulation: outlook on viruses and parasites. Office of drinking water. U.S. Environmental protection agency. Washington DC.

- BISHOP, R. F. 1986. Epidemiology of diarrheal disease caused by rotavirus. *In: Vaccines & drugs against diarrhea. 11th Nobel Conf. Stockholm. Édité par Holmgren, A. Londberg et R. Molby. Student Literature Lund. Suède. pp. 158-170.*
- BISHOP, R. F., G. P. DAVISON, I. H. HOLMES et J. RUCK. 1973. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1: 149-151.
- BIRCH, C. J., R. L. HEATH et I. D. GUST. 1988. Use of serotype-specific monoclonal antibodies to study the epidemiology of rotavirus infection. *J. Med. Virol.* 24: 45-53.
- BOARDMAN, G. D. et S. M. EVANS. 1986. Detection and occurrence of waterborne viruses. *J. Water Pollut.* 58: 717-721.
- BOCK, J. C. 1983. Viruses in environmental waters. *In: Viral pollution of the environment. Édité par G. Berg, CRC Press, FL. pp. 117-145.*
- BOSCH, A., R. M. PINTO, A. R. BLANCH et J. T. JOFRE. 1987. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Water Res.* 27: 343-348.
- BOSH, A., R. M. PINTO et J. JOFRE. 1988. Non-seasonal distribution of rotavirus in barcelona raw sewage. *Zbl. Bakt. Hyg. B.* 186: 273-277.
- CHEN, G. M., T. HUNG, J. C. BRIGER et M. A. MCCRAE. 1985. Chinese adult rotavirus is a group B rotavirus. *Lancet* 2: 1123-1124.
- CLIVER, D. O. 1965. Detection of enteric viruses by concentration with polyethylene glycol. *In: Transmission of viruses by the water route. Édité par G. Berg, CRC Press, FL. pp. 109-120.*
- CLIVER, D. O. 1967. Enterovirus detection by membrane chromatography. *In: Transmission of viruses by the water route. Édité par G. Berg, CRC Press, FL. pp. 139-149.*
- CLIVER, D. O. 1968. Virus interactions with membrane filters. *Biotech. Bioeng.* 10: 877-889.
- CLIVER, D. O. et J. YEATMAN. 1965. Ultracentrifugation in the concentration and detection of enteroviruses. *App. Microbiol.* 13: 387-392.
- COOPER, P. D. 1969. The plaque assay for poliovirus and rotavirus specific RNAs. *In: Fundm. Tech. Virol. Édité par K. Habel et N.P. Salzman, N.Y. pp. 131-145.*
- COULSON, B. S., L. E. UNICOMB, G. A. PITSON et R. F. BISHOP. 1987. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 25: 509-515.

- DEETZ, T. R., E. M. SMITH, S. M. GOYAL, C. P. GERBA, J. J. VOLLET, L. TSAI, H. L. DUPONT et B. H. KESWICK. 1984. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Res.* **18**: 567-571.
- EIDEN, J., S. VONDERFECHT et R. H. YOLKEN. 1985. Evidence that a novel rotavirus-like agent of rats can cause gastroenteritis. *Lancet* **2**: 8-11.
- ELLENDER, R. D., F. MORTON, J. WHELAN et B. H. SWEET. 1972. Concentration of virus from water by electro-osmosis and forced-flow electrophoresis. II Improvement of methodology and application to tap water. *Prep. Biochem.* **2**: 215-228.
- ELLENS, D. J. et P. W. DE LEEUW. 1977a. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 546-551.
- ELLENS, D. J. et P. W. DE LEEUW. 1977b. Detection of infantile gastroenteritis virus (Ro-Tavirus) by ELISA. *Lancet* **2**: 1363
- ESTES, M. K. 1990. Rotaviruses and their replication. *In*: *Virology*. Vol. 2. 2ième édition. Édité par B.N. Fields et D.M. Knipe, Raven Press, N.Y. pp. 1329-1352.
- FARRAH, S. R. et G. BITTON. 1978. Elution of poliovirus adsorbed to membrane filters. *App. Environ. Microbiol.* **36**: 982-984.
- FARRAH, S. R. et S. M. BITTON. 1979. Low molecular weight substitutes for beef extract as eluents for poliovirus adsorbed to membrane filters. *J. Can. Microbiol.* **25**: 1045-1051.
- FARRAH, S. F. et P. A. SHIELDS. 1981. Factors influencing the association of viruses with membrane filters. *Proceeding of the international symposium on viruses and wastewater treatment*. Pergamon Press. University of Surrey, Oxford. pp. 101-106.
- FARRAH, S. R., C. P. GERBA, C. WALLIS et J. L. MELNICK. 1976. Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. *App. Environ. Microbiol.* **31**: 221-226.
- FATTAL, B., E. KATZENELSON et H. I. SHUVAL. 1974. Comparison of methods for isolation of viruses in water. *Water Res.* **8**: 19-30.
- FLEWETT, T. H. 1978. Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **173**: 538-543.
- FLEWETT, T. H. 1982. Clinical features of rotavirus infections. *In*: *Virus Infections of the Gastrointestinal*. Édité par D.A. Tyrrell et A.Z. Kapikian Tract, Marcel Dekker Inc., N.Y. pp. 125-145.
- FLEWETT, T. H., A. S. BRYDEN et H. DAVIES. 1973. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* **2**: 1497.

FLOYD, R. et D. G. SHARP. 1977. Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 159-167.

FLOYD, R. et D. G. SHARP. 1978. Viral aggregation: quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 1079-1083.

GERBA, C. P. 1983. Methods for recovering viruses from the water environment. *In: Viral pollution of the environment.* Édité par C. Berg, CRC Press, FL pp. 19-35.

GERBA, C. P. et S. M. GOYAL. 1982. (Éditeurs) Concentration of viruses from water by membrane filters. *In: Methods in environmental virology.* Marcel Dekker Inc., N.Y. pp. 59-144.

GERBA, C. P., S. M. FARRAH, C. WALLIS et J. L. MELNICK. 1978. Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 540-548.

GERBA, C. P., C. WALLIS et J. L. MELNICK. 1975. The virus in water: the problem, some solutions. *Environ. Sci. Technol.* 9: 1122-1126.

GERBA, C. P., J. B. ROSE, R. DELEON, G. A. TORANZOS, S. N. SINGH et B. H. KESWICK. 1986. Isolation of rota- and entero-viruses from three drinking water supplies. *AWWA* 451-459.

GOYAL, S. M. et C. P. GERBA. 1983. Viradel method for detection of rotavirus from seawater. *J. Virol. Meth.* 7: 279-285.

GOYAL, S. M., H. HANSEN et C. P. GERBA. 1980. Simple method for the concentration of influenza virus from allantoic fluid on microporous filters. *J. Virol. Meth.* 1: 79-85.

GUTTMAN-BASS, N. et R. ARMON. 1983. Concentration of simian rotavirus SA-11 from tap water by membrane filtration and organic flocculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 850-855.

GUTTMAN-BASS, N., Y. TCHORSH et E. MARVA. 1987. Comparison of methods for rotavirus detection in water and results of a survey of Jerusalem wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 761-767.

HATEFI, Y. et W. G. HANSTEIN. 1979. Destabilization of membrane with chaotropic ions. *Meth. Enzymol.* 31: 770-790.

HEJKAL, T. W., E. M. SMITH et C. P. GERBA. 1984. Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 588-590.

- HILL, W. F., E. W. AKIN, W. H. BENTON et T. G. METCALF. 1972. Virus in water. II Evaluation of membrane cartridge filters for recovering low multiplicities of poliovirus from water. *App. Environ. Microbiol.* **23**: 880-888.
- HILL, W. F., W. JAKUBOWSKI, E. W. AKIN et N. A. CLARKE. 1976. Detection of virus in water: sensitivity of the tentative standard method for drinking water. *App. Environ. Microbiol.* **31**: 254-261.
- HOMMA, A., M. D. SOBSEY, C. WALLIS et J. L. MELNICK. 1973. Virus concentration from sewage. *Water Res.* **7**: 945-950.
- HRDY, D. B. 1987. Epidemiology of rotaviral infection in adults. *Rev. Infect. Dis.* **9**: 461-469.
- HUGUES, B. 1981. Nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable en virologie. Application à la mise en évidence et à la quantification des virus dans le milieu hydrique. Thèse de doctorat, Université de Metz, Centre des sciences de l'environnement.
- HUNG, T., G. CHEN, C. WANG, T. CHOU, T. CHAU, W. YE, H. YAO et N. ISHIDA. 1983. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *Lancet.* **2**: 1078-1079.
- HUNG, T., C. WANG et Z. FANG. 1984. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet.* **1**: 1139-1142.
- HURST, C. J., D. R. DALHLING, R. S. SAFFERMAN et T. GOYKE. 1984. *Can. J. Microbiol.* **30**: 1253-1263.
- HURST, C. J. et C. P. GERBA. 1980. Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 1-5.
- HURST, C. J., K. A. MCCLELLAN et W. H. BENTON. 1988. Comparison of cytopathogenicity immunofluorescence and *in situ* DNA hybridization as methods for the detection of adenoviruses. *Water Res.* **12**: 1547-1552.
- IJAZ, M. K. 1985. Effect of relative humidity, atmospheric temperature and suspending medium on the airborne survival of human rotavirus. *Can. J. Microbiol.* **31**: 681.
- KAPIKIAN, A. Z. et R. M. CHANOCK. 1990. Rotaviruses. *In: Virology*. Vol. 2. 2ième édition. Édité par B.N. Fields et D.M. Knipe, Raven Press, N.Y. pp. 1353-1387.
- KAPIKIAN, A. Z., H. W. KIM, R. G. WYATT, W. J. RODRIGUEZ, W. L. CLINE, R. H. PARROTT et R. M. CHANOCK. 1974. Reovirus agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* **185**: 1049.
- KAPIKIAN, A. Z., S. M. FEINSTONE, R. H. PURCELL, R. G. WYATT, T. S. THORNHILL, T. S. KALICA et R. M. CHANOCK. 1975. Detection and identification by

immune electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute nonbacterial gastroenteritis and hepatitis A. *Persp. in Virol.* **2**:9-45.

KATZENELSON, E., B. FATTAL et T. HOSTOVESKY. 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *App. Environ. Microbiol.* **32**: 638-639.

KESSICK, M. A. et R. A. WAGNER. 1978. Electrophoretic mobilities of virus adsorbing filter materials. *Water Res.* **12**: 263-268.

KESWICK, B. H., L. K. PICKERING, H. L. DUPONT et W. E. WOODWARD. 1983. Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centres. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 813-816.

KESWICK, B. H., C. P. GERBA, J. B. ROSE et G. A. TORANZOS. 1985. Detection of rotavirus in treated drinking water. *Water Sc. Tech.* **17**: 1-6.

LANDRY, E. F., I. M. VAUGHN, M. Z. THOMAS et T. J. VICALE. 1978. Efficiency of beef extract for the recovery of poliovirus from wastewater effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 544-548.

LIU, O. C., D. A. BRASHEAR, H. R. SERAICHEKAS, J. A. BARNICK et T. G. METCALF. 1971. Virus in water. I A preliminary study on a flow-through gauze sample for recovering virus from waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **21**: 405-410.

MACK, W. N., L. YUE-SHOUHG et D. B. COOHON. 1972. Isolation of poliomyelitis virus from a contaminated well. *Health Serv. Rep.* **87**: 271-274.

MALHERBE, K. H. et M. STRICKLAND-CHOLMEY. 1967. Simian virus SA-11 and the related O agent. *Arch. ges. Virusforsch.* **22**: 235-245.

MARAMORSCH, K. et H. KOPROWSKI. 1977. *Methods in virology I-IV*. American press, New York.

MARGOLIN, A. B., M. J. HEWLETT et C. P. GERBA. 1986. Use of a cDNA dot-blot hybridization technique for detection of enterovirus. *Proceeding of Water quality technology conference, TX.* pp. 87-95.

MASON, B. B., D. Y. GRAHAM et M. K. ESTES. 1980. *In vitro* transcription and translation of simian rotavirus SA-11 gene product. *J. Virol.* **33**: 111-1121.

MASTUNO, S. et S. INOUE. 1983. Purification of an outer capsid glycoprotein of neonatal calf diarrhea virus and preparation of its antisera. *J. Infect. Immun.* **39**: 155-158

MATSUNO, S., S. INOUE et R. KONO. 1977. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 1-4.

MATTHEWS, R.E.F. 1979. Classification and nomenclature of viruses. Third report of International committee on taxonomy of viruses. *Intervirol* **12**: 1-296

MCDANIELS, A. E., K. W. COCHRAN, J. J. GANNON et G. E. WILLIAMS. 1983. Rotavirus and reovirus stability in microorganims -free distilled water and wastewater. *Water Res.* **17**: 1349-1353.

MCNULTY, M. S. 1978. Rotavirus, review article . *J. Gen. Virol.* **40**: 1-18.

MEBUS, C. A., N. R. UNDERDAHL, M. B. RHODES et M. J. TWEIHAUS. 1969. Reserch Bulletin 233, University of Nebraska College of agriculture and home economics, Lincoln.

MELNICK, J. L., J. EMMONS, E. M. OPTON et J. H. COFFEY. 1954. Coxsackie viruses from sewage. *Am. J. Hyg.* **59**: 183-195.

METCALF, T. G. 1961. Use of membrane filters to facilitate the recovery of virus from aqueous suspensions. *App. Environ. Microbiol.* **2**: 376-379.

METCALF, T. G., C. WALLIS et J. L. MELNICK, 1973. Concentration of viruses from seawater. *In: Advances in water pollution research.* Édité par S.H. Jenkins, Pergamon Press, Oxford. pp. 109-115.

MIX, T. W. 1974. The physical chemistry of membrane-virus interaction. *Devel. Indus. Microbiol.* **15**: 136-142.

MOORE, B. E. D., L. FUNDERBURG et B. P. SAGIK. 1974. Application of viral concentration techniques to field sampling. *In: Virus survival in water and wastewater systems, water resources symposium.* Édité par J.F. Melina et B.P. Sagik, Austin, TX. pp. 3-15.

MURPHY, A. M., G. S. GROHMAN, et M. F. SEXTON. 1983. Infectious gastroenteritis in Norfolk Island and recovery of viruses from drinking water. *J. Hyg.* **91**: 139-146

NAKATA, S., M. K. ESTES et D. Y. GRAHAM. 1986. Antigenic characterization and ELISA detection of adult diarrhea rotaviruses. *J. Infect. Dis.* **154**: 448-455.

NUPEN, E. M., N. C. BASSON et W. O. K. GRABOW. 1981. Efficiency of ultrafiltration for the isolation of enteric viruses and coliphages from large volumes of water in studies on waste water reclamation. *Water Sc. Technol.* **13**: 851-864.

ORAGUI, J. I. et D. MARA. 1989a. Simple methode for the detoxification of waste water ultrafiltration concentrates for rotavirus assay by indirect immunofluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 401

- ORAGUI, J. I. ET D. MARA. 1989b. Enumeration techniques for rotaviruses and their removal in tropical water and wastewater treatment. Overseas development administration research scheme, Final report. University of Leeds, Angleterre.
- PALMER, E. L., M.L. MARTIN et F.A. MURPHY. 1977. Morphology and stability of infantile gastroenteritis virus: comparison with reovirus and bluetongue virus. *J. Gen. Virol.* 35: 403-414.
- PAYMENT, P. et M. TRUDEL. 1987. Second-step reconcentration of environmental samples by ammonium sulfate flocculation of beef extract. *Can. J. Microbiol.* 33: 571-572.
- PAYMENT, P., C. GERBA, C. WALLIS et J. L. MELNICK. 1976. Methods for concentrating viruses from large volumes of estuarine water on pleated membranes. *Water Res.* 10: 893-896.
- PEDLEY, S., J. C. BRIDGER, J. F. BROWN et M. A. MCCRAE. 1983. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J. Gen. Virol.* 64: 2093-2101.
- PHILIPSON, L., P. ALBERTSON et G. FRICK. 1960. The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems. *Virology* 11: 553.
- RAMIA, S. et S. A. SATTAR. 1980. Concentration of seeded simian rotavirus SA-11 from potable waters by using talc-celite layers and hydroextraction. *App. Environ. Microbiol.* 39: 493-499.
- RAO, N. U. et LABZOFFSKY. 1969. A simple method for the detection of low concentration of viruses in large volumes of water by the membrane filter technique. *Can. J. Microbiol.* 15: 399-403.
- RAO, V. C., T. G. METCALF et J. L. MELNICK. 1986. Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters. *App. Environ. Microbiol.* 52: 484-488.
- RAPHAEL, R. A., S. A. SATTAR et V. S. SPRINGTHORPE. 1985a. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can. J. Microbiol.* 31: 124-128.
- RAPHAEL, R. A., S. A. SATTAR et V. S. SPRINGTHORPE. 1985b. Rotavirus concentration from raw water using positively charged filters. *J. Virol. Meth.* 11: 131-140.
- RAPHAEL, R. A., S. A. SATTAR et V. S. SPRINGTHORPE. 1987. Lack of human rotavirus inactivation by residual chlorine in municipal drinking water systems. *Rev. Int. Sc. Eau.* 3: 67-69.
- RIEPENHOFF-TALTY, M., L. DUFFY, E. OFFOR, H. SUZUKI et P. L. OGRA. 1986. Pathogenic mechanisms and immunity to rotavirus infections. In: *Development of vaccines & drugs against diarrhea*. 11th Nobel Conf. Stockholm. Édité par J. Holmgren, A. Lindberg et R. Mollby, Student litteratur. Lund., Suède. pp. 171-184.

ROSE, J. B., C. P. GERBA, S. N. SINGH et G. A. TORANZOS. 1986. Isolation of entero- and rotaviruses from a drinking water treatment facility. *J. Am. Works Ass.* 78: 56-61

ROSE, J. B., R. L. MULLINAX, S. N. SINGH, M. V. YATES et C. P. GERBA. 1987. Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Water Res.* 21: 1375-1381.

RUBENSTEIN, S. H., H. ORBACH, N. SHUBER et E. KING. 1971. Freeze concentration of viral agents from large volumes of water. *J. Am. Water Work Assoc.* 63: 301-301.

SATTAR, S. A., N. LLOYDEVANS, V. S. SPRINGTHORP et NAIR. 1986. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhea - Potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J. Hyg.* 2: 277-290.

SCHERRER, R. et J. COHEN. 1978. Structures of rotaviruses. *Ann. Med.Vet.* 122: 323-336.

SCHWARTZBROD, L. et F. LUCENA. 1978. Concentration des enterovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre: proposition d'un appareillage simplifié. *Microbiol* 4: 55-65.

SCUTT, J. E. 1971. Virus retention by membrane filters. *Water Res.* 5: 183-185.

SENTURIA, Y. D. 1986. Epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *J. Epidemiol. Community Health.* 40: 236-239.

SHIELDS, P. A. et S. R. FARRAH. 1986. Concentration of virus in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 211-213.

SHUVAL, H. I., B. FATTAL, S. CYMBALISTA et N. GOLDBLUM. 1969. The phase separation method for concentration and detection of viruses in water. *Water Res.* 3: 225-240.

SMITH, E. M. et C. P. GERBA. 1982a. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *App. Environ. Microbiol.* 43: 1440-1450.

SMITH, E. M. et C. P. GERBA. 1982b. Laboratory methods for the growth and detection of animal viruses. *In: Methods in environmental virology.* Édité par C.P. Gerba et S.M. Goyal, N.Y. pp. 15-39.

SMITH, E. M., M. K. ESTES, D. Y. GRAHAM et C. P. GERBA. 1979. A plaque assay for the simian rotavirus SA-11. *J. Gen. Virol.* 43: 513-519.

- SOBSEY, M. D., C. WALLIS, M. HENDERSON et J. L. MELNICK. 1973. Concentration of enteroviruses from large volumes of water. *App. Environ. Microbiol.* **26**: 529-534.
- SOBSEY, M. D., T. CROMEANS, A. R. HICKEY et J. S. GLASS. 1985. Water quality on microporous filter methods for enteric virus concentration. *Water Sci. Technol.* **17**: 665-679.
- STEINMANN, J. 1981. Detection of rotavirus in sewage. *App. Environ. Microbiol.* **41**: 1043-1045.
- SWEET, B. H. et R. D. ELLENDER. 1972. Electro-osmosis: a new technique for concentrating virus from water. *Water Res.* **6**: 775-779.
- TORANZOS, G. A. et C. P. GERBA. 1989. An improved method for the concentration of rotaviruses from large volumes of water. *J. Virol. Meth.* **24**: 131-140.
- TORANZOS, G. A., H. HANSEN et C. P. GERBA. 1986. Occurrence of enteroviruses and rotaviruses in drinking water in Colombia. *Wat. Sci. Tech.* **18**: 109-114
- WALLIS, C. et J. L. MELNICK. 1967. Concentration of enteroviruses on membrane filters. *J. Virol.* **1**: 472-477.
- WALLIS, C., M. HENDERSON et J. L. MELNICK. 1972a. Enterovirus concentration on cellulose membranes. *App. Environ. Microbiol.* **23**: 476-480.
- WALLIS, C., A. HOMMA et J. L. MELNICK. 1972b. A portable virus concentrator for testing water in the field. *Water Res.* **6**: 1249-1256.
- WEISS, C. et H. F. CLARCK. 1985. Rapid inactivation of rotaviruse by exposure to acid buffer or acidic gastric juice. *J. Gen. Virol.* **66**: 2725-2730.
- WYATT, R. G., A. R. KALICA, C. A. MEBUS, H. W. KIM, W. T. LONDON, R. M. CHANOCK et A. Z. KAPIAKAN. 1978. Reovirus-like agents (rotavirus) associated with diarrhea illness in animal and man . *Persp. in Virol.* **10**: 121-145.

