

HEPATITIS A VIRUS CONCENTRATION FROM WATER

Evangelos BIZIAGOS^o, Jacques PASSAGOT^o, Jean-Marc CRANCE^o,
Chantal PIETRI^{oo} and Robert DELOINCE^o

^o Division de Microbiologie, CRESSA, 108 boulevard Pinel, Lyon (France)
^{oo} I.N.S.E.R.M., U. 303, Nice (France)

Hepatitis A is the first waterborne disease in the U.S.A. (1) and many outbreaks due to contaminated water have been reported. In order to decrease the risk of epidemic, current hepatitis A virus (HAV) detection in water are needed, which is only possible after concentration by an efficient method.

In the adsorption-elution method (2) we describe, HAV was firstly adsorbed on microporous membrane, then eluted from the filter. In a second-step, eluted viruses were further concentrated by precipitation either with polyethylene-glycol (PEG 6000) (2) or by organic flocculation (3).

For every experiment, 30 liters of distilled water containing 0.15 M NaCl were seeded with about 10⁵ tissu cultures infectious dose 50 % (TCID₅₀) of cell culture adapted HAV-strain CF 53 (4). The sample was then adjusted to pH 4.0 before filtration through two nitrocellulose membranes (one with 1.2 µm porosity over one with 0.45 µm porosity). Adsorbed HAV was eluted with 80 ml of 3 % beef-extract at pH 8.5. The eluted viruses were further concentrated :

- by addition of PEG 6000 to a final concentration of 10 % (wt/vol.) and 2.3 % NaCl. After 12 hours at 4°C, the precipitate was collected by centrifugation (10,000xg, 30 min.) and the pellet suspended in 3 ml of PBS.

- or by organic flocculation by adjusting the eluate at pH 3.5 and stirring slowly for 20 min. at room temperature. The resulted floc is collected by centrifugation (3,000xg, 15 min.) and the pellet suspended in 3 ml of 0.15 M Na₂HPO₄.

HAV was detected by solid phase radioimmunoassay (RIA) according to Purcell's procedure (5) and quantified using two enumerative assay procedures : RIA-endpoint titration for hepatitis A antigen (HAAg) (using the P/N value of 2.1 as endpoint titration) and cell culture titration for infectious virus (expressed in terms of TCID₅₀/ml). Recovery percentage is the ratio between the sample titer after the second-step concentration and the initial HAV titer.

Results are summarized in tables 1 and 2, and were analysed by statistical tests.

Table 1. Recovery of HAAg and infectious HAV from 30 liters of water after adsorption-elution and PEG 6000 precipitation

	% Recovery	
	HAAg	Infectious HAV
Mean and Standard Deviation	85.9 ± 8.5	92.2 ± 22.3
Number of Experiments	14	
Concentration factor	10,000	

Table 2. Comparison between the two second-step concentration methods :

	% Recovery			
	PEG 6000		Organic Flocculation	
	HAAg	Infectious HAV	HAAg	Infectious HAV
Mean and Standard Deviation	91.0 ± 5.4	78.7 ± 16.2	34.7 ± 13.4	20.3 ± 11.0
Number of experiments	5		5	
Concentration factor	10,000			

Statistical studies shows :

- no significant differences between the HAAg and infectious HAV recovery efficiencies (t-test ; P<0.05).
- significant differences between the PEG 6000 precipitation and organic flocculation (t-test ; P<0.05).

HAV can be efficiently concentrated by this method from large volumes of seeded water. Comparison of the two second-step concentration methods pointed out the higher efficiency of PEG 6000 precipitation. Such a method can be applied to follow up HAV contamination of drinking water, but further studies are needed to detect HAV in seawater.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) MELNICK J.L., GERBA C.P. and WALLIS C., 1978 - Viruses in water. *Bull. Wld. Hlt. Org.*, 56 : 499-508.
- (2) PASSAGOT J., CRANCE J.M., DELOINCE R., LAVERAN H., BEYTOUT D. and FONTANGES R., 1985 - Concentration du virus de l'hépatite A sur des membranes de cellulose. *Water Res.*, 19 (9) : 1167-1170.
- (3) KATZENELSON E., FATTAL B. and HOSTOVESKY T., 1976 - Organic flocculation : an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32 : 638-639.
- (4) CRANCE J.M., PASSAGOT J., VERWAERDE N., BIZIAGOS E., GANDRE H. and DELOINCE R., 1985 - Adaptation à la lignée cellulaire PLC/PRF/5 du virus de l'hépatite A libéré dans le surnageant de culture. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 301, Série III, n° 7, 361-363.
- (5) PURCELL R.H., WONG D.C., MORITSUGU Y., DIENSTAG J.L., ROUTENBERG J.A. and BOGGS J.D., 1976 - A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J. Immunol.*, 116 (2) : 349-356.

PERSISTENCE DES VIRUS ENTÉRIQUES DANS LES EAUX LITTORALES
PROBLÈME DE L'AUTOÉPURATION VIRALE DE CES EAUX

Ioan NESTOR

Institut d'Hygiène et Santé Publique, Cluj-Napoca (Roumanie)

Depuis les premières recherches, soit depuis l'année 1968, il s'est accumulé jusqu'à ce jour, sur la présence des virus entériques dans l'eau de mer, un grand nombre de données qui indiquent la détection de ces agents pathogènes pour l'homme dans plusieurs zones du littoral de la mer Méditerranée et des autres mers et océans.

L'intensité de la pollution virale des eaux littorales est élevée, allant quelquefois jusqu'à la totalité des échantillons examinés, avec des densités virales souvent importantes, aussi bien dans l'eau que dans les sédiments et les mollusques.

La propagation de ces virus dans les eaux littorales se reflète dans l'apparition de nombreux cas d'hépatite virale et de gastro-entérites bactériennes, à la suite de la consommation de mollusques. L'implication de l'eau de mer comme telle dans la transmission des viroses entériques est difficile à évaluer du fait des caractéristiques épidémiologiques de ces maladies : rareté relative des cas de maladie manifeste par rapport au nombre des cas d'infection dépourvue des symptômes de maladie, polymorphisme de l'aspect clinique des maladies causées par un même virus, comme aussi le fait qu'un même syndrome de maladie peut être dû à des virus différents.

La présence des virus entériques dans l'eau de mer s'est avérée de longue durée dans beaucoup de cas. Cette persistance est plus longue dans les sédiments marins que dans l'eau de mer. Les mollusques peuvent également garder pendant longtemps les virus entériques dans leur organisme. Dans ce processus, le phénomène d'adsorption des virus sur les sédiments marins, à effet protecteur pour les virus, joue un rôle important. En dehors de l'adsorption, qui constitue l'un des facteurs les plus importants dans le maintien des virus dans l'eau de mer, la survie des virus dans ce milieu est favorisée par de nombreux autres facteurs : température basse, composition (le pH très proche de la neutralité, présence des cations favorisant l'adsorption des virus sur les particules solides, présence de matière organique à rôle protecteur pour les virus), présence de mollusques.

La limitation de la survie des virus, voire leur inactivation, est attribuée à plusieurs facteurs : température élevée, pH trop bas ou trop élevé, irradiation solaire importante, certaines substances de provenance microbienne (enzymes protéolytiques, MAVA - marine antiviral activity, VIC - virus inactivation capacity).

La survie des virus est généralement plus courte dans l'eau de mer que dans les eaux douces, même si la salinité de l'eau de mer ne semble pas jouer un rôle important.

Il faut encore ajouter que, contrairement aux bactéries intestinales qui peuvent se multiplier dans certaines conditions de température et de composition de l'eau de mer, les virus entériques ne se multiplient généralement pas en dehors de la cellule vivante réceptrice. Ces virus parvenus dans l'eau de mer ne se multiplient donc pas, mais, au contraire, diminuent progressivement en nombre, en rapport avec l'intensité des facteurs en question.

En comparaison avec les bactéries coliformes, les virus persistent plus longtemps dans l'eau de mer grâce à leur plus grande résistance aux facteurs nocifs dans ce milieu. Les distances jusqu'où l'on peut détecter les virus dans l'eau de mer sont plus grandes que pour les bactéries coliformes.

La possibilité de l'inactivation des virus dans l'eau de mer pose, tel un corollaire, le problème de l'autoépuration de celle-ci. Cependant, tout comme l'autoépuration bactérienne qui est un phénomène complexe, quelquefois de longue durée, l'autoépuration virale est, elle aussi, un processus souvent lent et prolongé, mais réel. Certaines de nos propres observations attestent cette possibilité.

En tout cas, dans le processus de l'autoépuration virale de l'eau de mer, il intervient une série de facteurs dont les uns sont communs avec ceux de l'autoépuration bactérienne. La résistance des virus entériques, plus grande que celle des bactéries, à l'égard des divers facteurs nocifs dans le milieu hydrique marin, est également un facteur important dans l'autoépuration virale de l'eau de mer.

Le contrôle de l'autoépuration virale et de l'état de pureté en général de l'eau de mer, en ce qui concerne les virus, peut s'effectuer par la monitoring virale de celle-ci dans des situations épidémiologiques où elle s'impose. Mais alors il faut aussi poser le problème des bio-indicateurs de l'eau de mer.

Bien qu'une bonne partie des aspects du problème ait déjà été étudiée, certaines précisions restent encore à fournir.