

UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1 – FACULTE DE PHARMACIE
LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE ET CONTROLE
MICROBIOLOGIQUE
Rapport définitif – 04 mai 1998

M. Siméon de Buochberg, Professeur
G. Dusart, MCU
A.M. Lacoste-Armynot, MCU
E. Bilak, ATER

EFFICACITE VIRUCIDE DU « STERIGERMS » (Occigerm)

Souche virale

Entérovirus polio 1, souche SABIN, cultivé sur cellules VERO
Suspension virale préparée et titrée selon la norme **AFNOR T 72J**, au Laboratoire de la Faculté de Pharmacie, Université P. Sabatier, Toulouse (Dr C. Roques).
Le titre de la suspension est de 5.10^8 virus ml⁻¹

Cultures de cellules VERO :

La culture des cellules VERO est réalisée en milieu Dulbecco Mod Eagle Medium (DMEM) avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (GibcoBRL, Lot n° 21F8073), additionné de 200 unités/ml de pénicilline et 50µg/ml de streptomycine, dans des boîtes de culture cellulaire (Costar, 25cm², lot n° 7183).

Après 24h d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂, on obtient une monocouche confluyente de cellules VERO.

Les subcultures sont réalisées de la façon suivante :

Une boîte contenant une culture confluyente de cellules VERO est traitée par 10ml d'une solution de trypsine-EDTA 1X GibcoBRL (lot n° 3004878) pendant 10 min à 37°C. Les cellules en suspension sont centrifugées 10 mn à 2500 tr/min et le culot est réparti dans de nouvelles boîtes contenant 20ml de milieu de culture frais.

Préparation de la galette témoin négatif :

Les sacs contiennent 400g de coton hydrophile, 40 compresses 20x20, 10 tubes en polypropylène bouchés coton, contenant chacun une compresse, 5 paires de gants en latex et 100ml de PSB (1X) contenant 1% de Serum Albumine Bovine.

Après traitement du sac par l'appareil « Stérigerms » selon le process suivi pour les tests d'efficacité bactéricide, sporicide et fongicide, la galette est découpée stérilement au massicot.

Préparation des galettes contenant les virus :

Les sacs ont un contenu identique à celui décrit pour la galette témoin auquel on ajoute 5 10⁷ poliovirus en suspension dans 100ml de PBS (1X) contenant 1% de Sérum Albumine Bovine. Les 100ml sont inoculés en répartissant 10 fois 10ml en divers points du sac.

Après traitement du sac par l'appareil « Sterigerm » selon le process suivi pour les tests d'efficacité bactéricide, sporicide et fongicide, la galette est découpée stérilement au massicot.

Préparation de l'éluat de galette :

Immédiatement après l'obtention des galettes témoin et « virus », on réalise l'éluat. Les galettes ne sont pas conservées à sec.

Chaque ½ galette témoin ou « virus » est placée dans 2 l. de sérum physiologique à température ambiante sous agitation à 120 rotations par minute pendant 1 nuit.

L'éluat est filtré sur membrane Millipore 0.22 micron.

Inoculation du filtrat aux cellules VERO :

Deux millilitres du filtrat de chacune des deux demi galettes sont alors inoculés dans des boîtes de culture cellulaire contenant des cellules VERO confluentes (24h de subculture). Avant l'inoculation, le milieu de culture à 10% de sérum de veau fœtal est remplacé par le même milieu mais à 2% de sérum de veau fœtal .

L'éluat de la galette témoin est inoculé dans les mêmes conditions.

Inoculation du témoin d'infectivité :

106 virus sont mis en suspension dans 100ml de PBS (1X) contenant 1% de sérum Albumine Bovine (SAB). Une boîte de 20ml de culture est inoculée par 10µl de la suspension soit 100 virus.

Observation :

Les boîtes sont observées au microscope inversé après 24h, 48h, 72h et 5 jours après l'inoculation.

Un effet cytopathogène suivi d'une destruction du tapis cellulaire signe la présence de poliovirus.

Les aspects des cultures cellulaires témoins galettes, témoin d'infectivité et « virus » sont comparés.

La réponse donnée est uniquement qualitative : présence d'un effet cytopathogène viral / absence d'effet cytopathogène viral.

Protocole :

Nous avons réalisé une galette témoin et 3 galettes contenant des virus. Pour chaque galette « virus », nous avons inoculé 2 boîtes de culture cellulaire avec l'éluat de galette « virus », une boîte témoin négatif avec l'éluat de la galette témoin et une boîte témoin positif d'infectivité.

Résultats :

1 – Un effet cytopathogène a été observé dans les cultures témoin positif d'infectivité après 24h d'incubation, suivi d'une destruction totale du tapis cellulaire à partir de 48h d'incubation. Ce résultat valide donc le système virus / cellule et les conditions de culture virale.

2 – Aucun effet cytopathogène n'est visible dans les boîtes témoins négatifs après 24h, 48h, 72h et 5 jours. L'éluat de galette n'est donc pas intrinsèquement cytotoxyque. Il peut donc être utilisé comme témoin négatif. De plus, il montre que des purifications par tamisage moléculaire des éluats de galette ne sont pas nécessaires.

3- Aucun effet cytopathogène n'est visible dans les boîtes inoculées par les éluats des trois galettes « virus » après 24h, 48h, 72h et 5 jours d'incubation. Il y a donc moins de 10^3 virus présents dans les éluats de ces galettes ; ce qui prouve que le traitement par l'appareil « Sterigerm » entraîne une chute d'au moins 5.10^4 de la charge virale initiale des sacs testés.

Conclusion :

Le traitement par l'appareil « Sterigerm » entraîne une chute d'au moins 5.10^4 de la charge virale initiale des sacs testés.

Ce résultat est en accord avec la définition de l'activité virucide fixée par la **Norme**

NF T 72-180

Après 7 jours, 14 jours et 28 jours de maintien à température ambiante des déchets compactés sous forme de galette, nous n'avons jamais observé l'apparition de microorganismes revivifiables dans les séries où l'on avait noté une absence de germes dans les prélèvements P1

Pr. M. SIMEON DE BUOCHBERG

Laboratoire de Bactériologie

U.F.R. Sc. Pharmaceutique UM1

Montpellier