

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 18985

(54) Procédé pour la détection de germes pathogènes dans des fluides par filtration sur des immunoadsorbants, et application à la détermination de la potabilité d'une eau.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 Q 1/00; G 01 N 33/18, 33/48.

(22) Date de dépôt 8 octobre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 15 du 15-4-1983.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS), établissements déclarés d'intérêt public. — FR.

(72) Invention de : André Dodin, Stratis Avrameas, Bruno Goud et Brigitte Guilbert.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Harlé et Léchopiez,
21, rue de La Rochefoucauld, 75009 Paris.

La présente invention concerne un procédé pour la détection de germes pathogènes dans des fluides par filtration sur des immunoadsorbants. Elle concerne plus particulièrement la recherche de bactéries et de particu-
5 les virales dans l'eau, notamment en vue d'en déterminer la potabilité.

La potabilité bactériologique d'une eau est fonction de la présence ou non de certains germes d'origine fécale. Pour l'Organisation Mondiale de la Santé, une
10 eau est considérée comme non dangereuse pour la santé si elle ne contient pas de germes d'origine fécale. Il est bien évident qu'une eau sera d'autant moins dangereuse qu'elle ne contient pas de véritables germes pathogènes.

Jusqu'à présent, pour déclarer une eau potable,
15 le bactériologiste ne recherche pas les germes pathogènes, mais met en évidence les germes de contamination fécale. Selon la technique utilisée, il recherche les germes soit dans 1 ml, technique par dilution, soit dans 200 ml ou plus, par filtration sur membrane.
20 La chance de rencontrer des germes pathogènes dans 1 ml est quasiment nulle. Elle augmente avec la quantité de liquide, mais est limitée par le fait que de nombreux autres germes seront présents sur la membrane, ne permettant plus un isolement des germes pathogènes ou des germes de conta-
25 mination fécale. A titre de références bibliographiques dans ce domaine on peut citer:

- . Pratique du Laboratoire, Masson et Cie, 399-422.
- . Report of the European Regional Study Group on the developpment of international Standard of drinking
30 water quality and approved methods for the examination of water OMS Genève, 1956.

On a maintenant mis au point une technique simple permettant de rechercher directement, dans les fluides, par exemple les liquides biologiques, les principaux germes
35 responsables de maladies d'origine fécale, tels que notamment Salmonella, Escherichia coli K 88 et E. Coli K 99

entéropathogènes, *Vibrio cholerae* biotype el Tor, sérotype Ogawa, souche Mz et germes similaires.

Le procédé de détection de germes pathogènes dans les fluides, selon l'invention, consiste:

- 5 1) à filtrer le fluide à analyser sur un immunoadsorbant spécifique du germe recherché;
- 2) à caractériser les germes retenus sur l'immunoadsorbant.

10 Dans la présente description, on désigne par "fluide" tout fluide susceptible de contenir des germes pathogènes, tel que par exemple l'eau ou les liquides biologiques provenant d'êtres vivants, par exemple l'urine.

15 La première étape du procédé de l'invention consiste en une filtration, sur un immunoadsorbant, du fluide à analyser. L'immunoadsorbant mis en oeuvre doit être spécifique du germe recherché.

20 L'immunoadsorbant mis en oeuvre selon l'invention est un support insoluble susceptible de constituer un élément de filtration pour un fluide et sur lequel sont fixés, par liaison chimique, des anticorps spécifiques du germe pathogène dont on souhaite déterminer la présence dans un fluide.

25 Le procédé selon l'invention convient pour la détection de tout germe pathogène qui sécrète des facteurs d'attachement spécifique de groupes antigéniques, lesquels provoquent, par immunisation d'un animal, tel que le lapin par exemple, des anticorps spécifiques.

30 Le support de l'immunoadsorbant est en général un polymère insoluble, le plus souvent sous la forme d'un gel. A titre d'exemple de tels polymères on citera les polymères d'acrylamide, d'agarose, d'acrylamide-agarose ... Le polymère connu sous la dénomination commerciale ULTROCEL ACA 34 (Industrie Biologique Française), qui est un gel de polyacrylamide-agarose, est particulièrement approprié aux fins de l'invention. Il s'agit d'un gel dont les caractéristiques sont les suivantes:

35

3% acrylamide, 4% agarose et 60 à 140 μ m de diamètre de particule.

Le support insoluble couplé avec des anticorps spécifiques du germe recherché constitue l'immunoabsorbant mis en oeuvre selon l'invention. Le couplage des anticorps spécifiques sur le support soluble est effectué selon des techniques classiques de couplage, mettant en oeuvre des agents de couplage connus, tels que le glutaraldéhyde, la benzoquinone et autres agents similaires. Pour plus de détail sur les techniques de couplage pour la réalisation d'immunoabsorbants on pourra se référer à l'article ci-après: polyacrylamide beads for the preparation of effective immunoabsorbants - J. Immun. Meth., 1971, 11, 29-33.

On indiquera ci-après le procédé de couplage au glutaraldéhyde. Ce procédé consiste à activer le support insoluble avec le glutaraldéhyde et à mettre ensuite en contact le gel ainsi activé avec une solution des anticorps spécifiques à fixer.

Les anticorps spécifiques utilisés pour la fabrication des immunoabsorbants mis en oeuvre dans le procédé de l'invention sont obtenus par immunisation d'animaux, par exemple de lapin, avec un germe pathogène ou une fraction de celui-ci. L'isolement de l'anticorps spécifique à partir du sérum ainsi obtenu se fait par des méthodes classiques bien connues de l'homme de l'art.

Après filtration du fluide à tester sur l'immunoabsorbant contenant l'anticorps spécifique du germe recherché, on procède à la caractérisation, ce qui constitue la seconde étape du procédé de l'invention, des facteurs antigéniques retenus par l'immunoabsorbant, lesquels sont spécifiques du germe recherché. Cette caractérisation est effectuée par des moyens classiques, par exemple, par dilution du gel et, en milieu liquide sélectif, culture sur gélose, caractérisation biochimique et sérologique du germe (agglutination).

Le procédé convient en particulier pour la mise

en évidence dans l'eau de bactéries, telles qu'*Escherichia coli* pathogène, *Salmonella* et *Vibrio Cholerae*, et de particules virales, par exemple celles du virus de la poliomyélite ou du virus de l'encéphalo-myocardite. Il permet donc
5 de déterminer aisément la potabilité d'une eau.

On peut également déterminer, grâce au procédé de l'invention, d'une façon très rapide, si un sujet vivant est porteur de germes pathogènes en filtrant un liquide biologique de celui-ci sur un immunoabsorbant spécifique
10 du germe susceptible d'être présent chez ce sujet.

Le procédé de l'invention présente les avantages ci-après par rapport aux techniques classiques: il permet une recherche directe sélective du germe entérique pathogène et non plus des germes témoins de décontamination
15 fécale.

L'invention va être maintenant décrite par les exemples non limitatifs ci-après.

EXEMPLE 1

Analyse d'eaux contaminées par des germes de
20 *Vibrio Cholerae*, *Salmonella* et *Escherichia coli*

Les expériences ci-après ont été réalisées avec des eaux contaminées artificiellement par des germes pathogènes ou avec des eaux brutes. Les souches bactériennes utilisées pour la contamination artificielle de l'eau et
25 l'obtention des immunoabsorbants sont indiquées ci-après:

A. Souches bactériennes

Les souches utilisées provenaient de la collection de l'Unité du Choléra [Institut Pasteur, Paris .]. Elles étaient toutes fraîchement isolées du sang du coeur
30 de souris, après injection intrapéritonéale de la souche virulente. L'isolement et le repiquage pour chacun des germes ont été effectués sur gélose ordinaire, à l'étuve à 37°C pendant 12 heures.

Les souches ci-après ont été utilisées:

Vibrio cholerae el tor souches Marquez Ogawa
Vibrio cholerae el tor souches 9292 Inaba
Salmonella typhimurium souche C5
5 Escherichia coli K88 Oudjine
Escherichia coli K99 V5.

B. Préparation des anticorps spécifiques pour la fabrication de l'immunoabsorbant

10 Les anticorps ont été obtenus à partir de sérums de lapins immunisés avec l'une des souches ci-dessus.

a. le sérum anti-vibrio cholerae a été obtenu par immunisation de lapin avec la fraction Ch 1+2 (.....) provenant de la souche Marquez el tor Ogawa. L'anti-sérum obtenu avait un pouvoir vibriocide de 1/40180 et agglutinant de 1/5120. En diffusion en gélose, il n'apparaissait qu'une
15 bande de précipité antigène-anticorps, les ultra-sonats complets de toutes les souches de V. cholérique agglutinables par le sérum polyvalent anticholérique el tor ou classique.

L'antisérum n'agglutinait pas les vibrions Nag et halophiles.

20 b. les antisérums anti-Salmonella typhimurium C5, anti-Escherichia coli K88 et K99 ont été obtenus en injectant au lapin les fractions Tm 1+2 Ec 1+2 K88 Ec 1+2 K99. La spécificité de ces antisérums a été testée par agglutination immunofluorescence et diffusion en gélose.

25 C. Préparation des immunoabsorbants

Les anticorps ont été isolés des sérums par précipitation au sulfate d'ammonium (40%). Les anticorps ont été ensuite couplés à des gels de polyacrylamide-agarose ACA 34 activés au glutaraldéhyde. La méthode de
30 couplage était la suivante: "l' Ultrogel ACA 34" (Industrie Biologique Française) a été lavé avec de l'eau distillée par décantations successives, jusqu'à ce que le surnageant soit complètement clair. Le gel a été ensuite incubé une

nuit dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 5% de glutaraldéhyde (Merck, Darmstadt, RFA), puis lavé avec de l'eau distillée par décantation ou centrifugations successives jusqu'à ce qu'une odeur de glutaraldéhyde soit décelable et que la densité optique à 280 nm du surnageant soit 0. Le gel activé a été mis en contact avec une solution de 5 mg/ml d'anticorps dans du PBS (1 volume de gel pour 1 volume de la solution d'anticorps) et laissé sous agitation rotative pendant une nuit à température du laboratoire. Le lendemain, le gel a été lavé à 4°C par centrifugations successives dans du PBS jusqu'à ce que la densité optique à 280 nm soit 0. Il a ensuite été remis en suspension (volume à volume) dans une solution de lysine 0,1 M pH 7,4 et laissé sous agitation rotative pendant 24 heures à température du laboratoire ou 24 heures à 4°C. Après lavage dans du tampon phosphate (PBS), le gel a été traité avec un tampon HCl - glycine pH 2,8, pendant 15 mn à 4°C, puis neutralisé avec une solution de K_2MPO_4 0,2 M et à nouveau lavé. A ce stade, l'immunoabsorbant a pu être conservé dans du PBS contenant 0,02% d'azide de sodium.

Les différents immunoabsorbants ont été introduits dans des colonnes en plastique de 0,8 x 3 cm. Ces colonnes ont été, avant l'expérience, stérilisées en passant sur les colonnes de l'eau physiologique contenant des radicaux libres (mélange acide ascorbique-sulfate de cuivre).

D. Analyse et résultats

Les expériences ont été réalisées en filtrant sur ces colonnes 500 ml d'eaux contaminées, soit des eaux brutes de l'Oise, soit de l'eau physiologique (tamponnée à pH 7,2 par un tampon phosphate), artificiellement contaminée par les mêmes germes. La vitesse de filtration était d'environ 100 ml/heure. Après filtration, les colonnes ont été lavées par passage de 100 ml d'eau physiologique. Dans une première série d'expériences, on a filtré des eaux "non contaminées" par environ 10^3 V. cholerae, Salmonella

typhimurium, E. coli K 88 ou E. coli K99, respectivement sur colonne Ch 1+2 (gels couplés aux anticorps anti-Ch 1+2), colonne Tm 1+2, colonne Ec 1+2 K88 et colonne Ec 1+2 K99. Dans une deuxième série d'expériences, on a filtré sur chaque colonne de l'eau contenant un mélange des 4 germes (10^3 environ de chaque germe).

Les germes V. cholerae retenus sur les colonnes ont été caractérisés en diluant 1 ml de gel dans 9 ml d'eau peptonée hypersalée. Après agitation soigneuse au Vortex, ce mélange a été dilué en série et chaque dilution étalée sur boîtes de Petri. Pour caractériser les germes S. typhimurium, E. coli K88 et K99, 1 ml de gel a été dilué dans 9 ml d'eau physiologique tamponnée, agité soigneusement au Vortex et dilué en série comme précédemment, avant étalement sur la gélose. Les résultats sont résumés dans le tableau I ci-après. Les différents germes n'ont été retenus que sur leur propre gel. L'analyse quantitative a été difficile, compte tenu de la grande vitesse de division des germes. Néanmoins, l'analyse et la caractérisation des germes contenus dans l'eau après filtration sur les colonnes a montré que la plupart des 10^3 germes étaient retenus et retrouvés après passage sur leur propre gel, c'est-à-dire le gel spécifique dudit germe.

25

TABLEAU I

Germes retrouvés	Colonnes			
	Ch 1+2	Tm 1+2	Ec 1+2	Ec 1+2
V. cholerae	+	-	-	-
S. typhimurium	-	+	-	-
E. coli K88	-	-	+	-
E. coli K99	-	-	-	+

EXEMPLE 2

Analyse d'eaux contaminées par des particules virales du virus de la poliomyélite (type II) et du virus de l'encéphalomyocardite (EMC)

5 Cet exemple montre que le procédé de l'invention est applicable aux particules virales.

A. Préparation des immunoadsorbants

10 On a opéré sensiblement selon le mode opératoire défini à l'exemple 1 en utilisant des anticorps anti-Polio II isolés d'un lapin hyperimmunisé avec le virus Polio II. L'immunisation des lapins a été réalisée par injections intraveineuse et intrapéritonéale qui permettent d'obtenir un taux élevé d'anticorps.

15 Le titre de l'antisérum en séro-neutralisation était de 1/12 800 contre 10^3 DL 50 de virus. On a ainsi obtenu un immunoadsorbant anti-Polio II.

20 De même on a préparé un immunoadsorbant anti-EMC en utilisant sensiblement le même mode opératoire que ci-dessus et des anticorps anti-EMC isolés d'une ascite de souris immunisée contre le virus EMC par injection intrapéritonéale chez la souris.

 Le titre de l'ascite était de 1/25 600 contre 10^3 DL 50 de virus.

B. Analyse

25 De 20 à 100 ml d'eau physiologique contenant des particules virales ont été filtrés sur les colonnes d'immunoadsorbants anti-Polio II et anti-EMC.

30 La spécificité des colonnes a été testée en passant sur les colonnes anti-Polio II de l'eau contenant un mélange Polio I et Polio II et sur les colonnes anti-EMC un mélange EMC et Poxvirus.

35 Comme les virus Polio II et EMC résistent bien à une exposition courte à pH acides, la récupération des particules virales accrochées sur les colonnes a été réalisée par élution avec un tampon HCl pH 2,2.

 Les résultats sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II

Colonnes	Virus	Poliovirus II		Poliovirus I	
		Titre	%	Titre	%
Anti - Polio II	Ajouté	$5,9.10^{+6}$	100	$5,5.10^6$	100
	Après filtration	10^3	< 1	$5,4.10^6$	≈ 100
	Elution de la colonne	$5,5.10^6$	92	< 10	< 10
Anti - EMC	Ajouté	EMC	nombre de particules virales %	Pox virus	nombre de particules virales %
	Après filtration	$1,2.10^6$		10^6	
	Elution de la colonne	< 10		$1,11.10^6$	≈ 100
		$1,11.10^6$	93	0	0

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la détection de germes pathogènes dans les fluides, caractérisé en ce qu'il consiste:
 - 1) à filtrer le fluide à analyser sur un immuno-
 - 5 adsorbant spécifique du germe recherché;
 - 2) à caractériser les germes retenus sur l'immuno-
 - noadsorbant.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit fluide est un liquide biologique ou de
10 l'eau.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'immunoabsorbant est constitué d'un support soluble sur lequel sont fixés des anticorps spécifiques du germe recherché.
- 15 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le support insoluble est un gel de polyacrylamide-agarose.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les anticorps spécifiques du germe recherché sont
20 fixés sur le support insoluble par couplage chimique.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le couplage est réalisé à l'aide de glutaraldéhyde, de benzoquinone, ou autre agent de couplage similaire.
7. Procédé pour déterminer la potabilité d'une
25 eau, caractérisé en ce qu'il consiste:
 - 1) à filtrer l'eau à analyser sur un immuno-
 - adsorbant spécifique du germe recherché;
 - 2) à caractériser les germes retenus sur l'immuno-
 - noadsorbant.
- 30 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les germes pathogènes sont des bactéries ou des particules virales.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les bactéries sont choisies parmi Vibrio Cholerae, Escherichia coli, Salmonella.
- 35 10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les particules virales sont des particules du virus de la poliomyélite ou du virus de l'encéphalo-myocardite.