



HAL
open science

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ VIRUCIDE IN VITRO DES DÉSINFECTANTS AU MOYEN DE DEUX MÉTHODES

P. Maris

► **To cite this version:**

P. Maris. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ VIRUCIDE IN VITRO DES DÉSINFECTANTS AU MOYEN DE DEUX MÉTHODES. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1986, 17 (2), pp.115-122. <hal-00901638>

HAL Id: hal-00901638

<https://hal.science/hal-00901638v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ VIRUCIDE *IN VITRO* DES DÉSINFECTANTS AU MOYEN DE DEUX MÉTHODES

P. MARIS

Avec la collaboration technique de Madame R. FRESNEL

Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Laboratoire National des Médicaments Vétérinaires, La Haute-Marche, Javené, 35133 Fougères, France

Summary

TWO TEST METHODS FOR THE EVALUATION OF VIRUCIDAL ACTIVITY OF DISINFECTANTS. -- The assessment of the virucidal activity of disinfectants and antiseptics is a permanent care. That is why, in recent years, studies have been developed in order to standardize these techniques. The present work describes two methods, the method of instantaneous dilution and that of gel filtration. The kinetics of inactivation of two viruses (the Talfan and the Canine Contagious Hepatitis viruses) which were obtained after contact with 10 disinfectants commonly used in agriculture and the food industry are compared. Usually these products exhibit a weak virucidal activity at the dosages recommended by the manufacturer. The present study emphasizes the necessity to have available viruses with a high titer and the inconvenience of using only the gel filtration technique when a precipitation takes place between the disinfectant and the viral suspension.

Dans le domaine des désinfectants à usage agricole, toutes les spécialités doivent faire l'objet d'une demande d'homologation (loi du 22 décembre 1972). Cette autorisation de vente concerne les usages bactéricide, fongicide et virucide. Pour les premiers, des tests normalisés ont déjà été publiés (Recueil de Normes Françaises, 1981). Pour le troisième usage, les premières tentatives de standardisation des protocoles d'évaluation datent de plus de 25 ans et depuis, de nombreuses méthodes ont été proposées (Blackwell et Chen, 1970; Gaustad *et al.*, 1974; Drulak *et al.*, 1978; Beytout *et al.*, 1979; Garrigue *et al.*, 1980; Gévaudan *et al.*, 1980; Van der

Groen *et al.*, 1980). Un groupe de travail de l'Association Française de Normalisation a repris certaines d'entre elles à fin de normalisation.

Les problèmes majeurs qu'il faut résoudre sont l'élimination rapide de l'excès de désinfectant, la neutralisation de ces produits toxiques pour les cellules et l'obtention de suspensions virales de hauts titres.

L'objet de notre travail est la détermination de l'activité virucide de quelques désinfectants couramment employés dans le domaine agricole, à l'aide de deux méthodes, la technique de dilution brutale et la technique de filtration sur gel, appliquées à 10 désinfectants différents et deux virus.

Tableau 1. — Composition en matières actives des désinfectants

Matières actives (teneur)	Dose d'emploi (%)
désinfectant A bromure de lauryldiméthylbenzylammonium (16 %)	1
désinfectant B dérivés phénoliques (22 %)	0,4
désinfectant C chlorure de didécyldiméthylammonium (6 %) formaldéhyde (2 %)	0,2
désinfectant D chlorure de didécyldiméthylammonium (10 %) formaldéhyde (3 %) glutaraldéhyde (4 %) glyoxal (3 %)	0,5
désinfectant E chlorhydrate de poly (hexaméthylène) biguanide (10 %) formaldéhyde (6 %)	0,2
désinfectant F phénols de goudron à haut point d'ébullition (55 %)	1,25
désinfectant G hypochlorite de sodium (12 degrés chlorométriques)	1
désinfectant H acide peracétique (2 %) acide acétique (6 %) peroxyde d'hydrogène (20 %)	0,2
désinfectant I soude (0,8 %)	100
désinfectant J eau de Javel (1 degré chlorométrique)	100

Matériel et Méthodes

1. Les désinfectants

Nous avons sélectionné 10 désinfectants représentatifs des principales formulations rencontrées dans la pratique. Pour les uns, les compositions sont simples : soude, hypochlorite de sodium, acides crésyliques ; pour les autres, ce sont des produits plus récemment arrivés sur le marché : composés phénoliques de synthèse, acide peracétique, ammonium quaternaire + aldéhyde, biguanide + formol. Des précisions sur la composition de ces désinfectants sont apportées dans le tableau 1.

Les produits I et J ont été choisis car ce sont deux produits de référence agréés pour la désinfection dans le cas de maladies légalement contagieuses des animaux.

Le jour de l'essai, les solutions de désinfectants sont

préparées à une concentration double de la dose d'emploi dans de l'eau distillée stérile.

2. -- Virus

2.1 -- Le virus de la maladie de Talfan est la souche DK 15 E distribuée par la Station de Pathologie Porcine de Ploufragan, entretenue sur cellules PK (15).

2.2 -- Le virus de l'Hépatite Canine Contagieuse (HCC) est la souche Utrecht (ATCC VR 293), entretenue sur MDCK.

3 -- Cultures cellulaires et milieux

Les cellules de lignées continues sont inscrites à l'American Type Culture Collection (PK (15): ATCC CCL 33; MDCK: ATCC CCL 34) et cultivées en milieu essentiel minimum d'Eagle (MEM 011, Eurobio).

Le milieu est additionné d'antibiotiques (pénicilline:

Tableau 2. — Étude de l'activité virucide des désinfectants par la méthode de dilution brutale

Dilution non cytotoxique PK (15)- MDCK (a)	Titre (b) des virus sur cellules			
	Traitées		Non traitées	
	Virus Talfan	Virus HCC	Virus Talfan	Virus HCC
désinfectant A - 3	7,8	6,6	8,1	6,7
désinfectant B - 2	7,9	6,7	7,8	6,9
désinfectant C - 3	7,8	7,0	7,8	7,1
désinfectant D - 3	7,6	7,2	7,8	7,1
désinfectant E - 2	7,7	6,8	8,0	7,1
désinfectant F - 2	7,5	7,0	7,9	7,1
désinfectant G - 1	7,8	6,9	8,1	7,1
désinfectant H - 3	8,1	7,1	8,1	7,1
désinfectant I - 1	8,0	6,9	8,1	7,1
désinfectant J - 3	7,9	6,9	8,0	7,0

a: dilution V/V à partir de la dose d'emploi du désinfectant exprimée en puissance de dix.

b: exprimé en logarithme décimal de la DCP 50.

100 UI/ml; streptomycine: 0,1 mg/ml) et de sérum de veau fœtal à raison de 10% dans le milieu de croissance et de 1 % dans le milieu de post-infection lors de la production des suspensions virales représentant les lots de virus qui serviront aux expériences. Les milieux sont tamponnés au moyen de bicarbonate de sodium à la concentration de 2 mg/ml (pH 7,2 - 7,4).

Ces cultures cellulaires sont réalisées en flacon plastique Falcon de 75 cm².

Vingt-quatre heures avant l'essai, les cellules sont mises en suspension (100 000 cellules/ml) dans le MEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal, puis distribuées dans les micro-plaques à 96 puits à raison de 150 µl par cupules avant d'être placées dans une étuve à 37°C (5 % CO₂).

4 -- Titrage des virus

La préparation des lots de virus est faite sur tapis cellulaire établi après 24 h. Les flacons pour culture de cellules ainsi tapissés par une monocouche sont vidés de leur milieu, rincés par une solution saline équilibrée de Earle puis inoculés par une suspension virale titrant 10⁷ DCP 50 par ml. Après une heure de contact à 37° C, le surnageant est éliminé et remplacé par le MEM contenant 1 % de sérum de veau.

Le titrage est réalisé en microplaques (Greiner, M 24 ARTL) en utilisant des dilutions de raison 10 et 5 cupules de cultures par dilution. Le titre est représenté par l'inverse de la plus forte dilution de suspension virale donnant un effet cytopathique dans 50 % des cupules de cultures (DCP 50), calculé par la méthode de Reed et Muench (1938).

4 -- La méthode de dilution brutale

4.1 -- Préparation

-- Les cellules

Vingt-quatre heures avant l'essai, les cellules sont mises en suspension (100 000 cellules/ml) dans le MEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, puis distribuées dans les microplaques à 96 puits à raison de 150 µl par cupules avant d'être placées dans une étuve à 37° C (5% CO₂).

-- Préparation des solutions mères de désinfectants

Le jour de l'essai, les solutions de désinfectants sont préparées à une concentration double de la dose d'emploi dans de l'eau distillée stérile.

-- Virus

Les virus sont décongelés et maintenus à + 4°C.

-- Tubes de dilutions

Ils sont préparés en mettant 1,8 ml de milieu MEM par tube et 8 tubes par série de titrage. Ces tubes sont déposés dans un lit de glace.

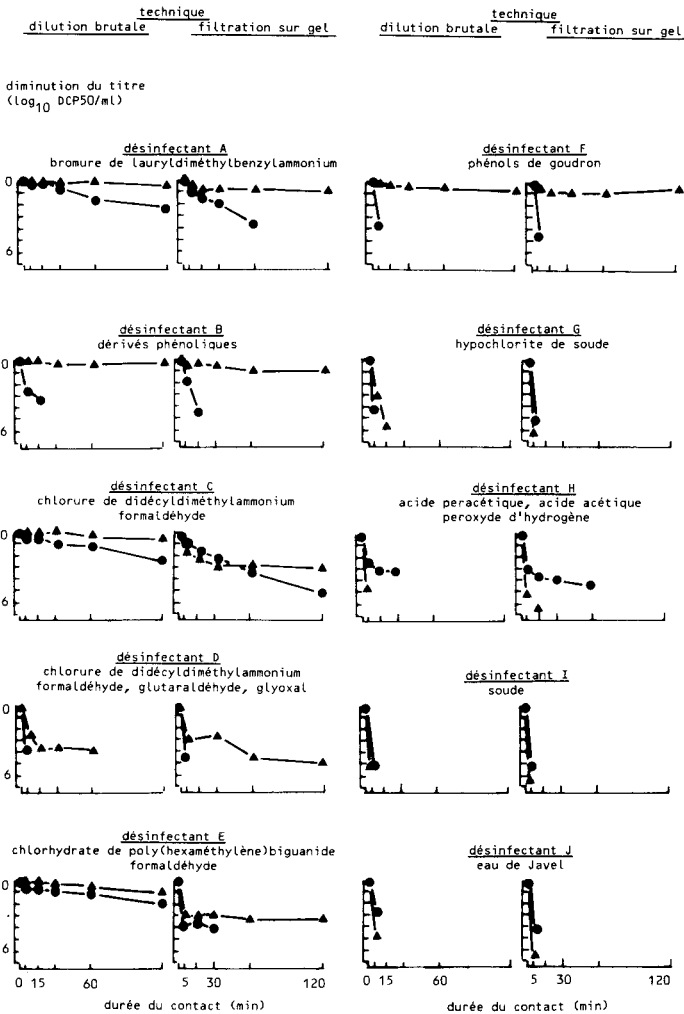


Fig.1. -- Cinétiques d'inactivation des virus de la maladie de Talfan (triangle) et de l'hépatite canine contagieuse (cercle) obtenues par les techniques de dilution brutale et de filtration sur gel.

Tableau 3. -- Étude de l'activité virucide des désinfectants par la méthode de filtration sur gel

	Titre (a) des virus					
	Mis en contact avec l'éluat		Témoins			
			Non filtrés		Filtrés sur LH20	
Virus Talfan	Virus HCC	Virus Talfan	Virus HCC	Virus Talfan	Virus HCC	
désinfectant A	8,1	6,7	8,2	6,7	8,1	6,7
désinfectant B	7,9	6,7	7,8	6,9	7,8	6,7
désinfectant C	7,6	7,0	7,8	6,9	7,9	6,8
désinfectant D	8,1	7,4	8,1	7,4	8,1	7,4
désinfectant E	8,2	6,8	8,1	7,0	7,9	6,8
désinfectant F	8,1	7,0	8,1	7,1	8,0	7,1
désinfectant G	7,8	6,9	8,1	7,1	8,1	7,1
désinfectant H	8,1	7,1	8,1	7,1	8,1	6,9
désinfectant I	8,1	7,4	8,1	7,1	8,1	6,9
désinfectant J	8,2	7,1	8,1	7,4	7,9	7,1

a : exprimé en logarithme décimal de la DCP50.

4.2 -- Déroulement de l'essai

L'essai se déroule en 3 étapes :

-- La première étape consiste à déterminer à quelle dilution le désinfectant ne produit plus d'effet toxique visible sur les cellules.

-- La deuxième étape permet de vérifier si, à cette dilution, les cellules conservent leur capacité à multiplier le virus.

-- La troisième étape concerne l'essai proprement dit au cours duquel nous réalisons une cinétique d'inactivation des virus par une concentration donnée de désinfectant pendant cinq temps de contact (5, 15, 30, 60 et 120 min) à la température du laboratoire.

-- Détermination du seuil non cytotoxique du désinfectant

Après addition d'un volume de solution mère de désinfectant à un volume de milieu MEM, le mélange est dilué en progression géométrique de raison 10, de 10^{-1} à 10^{-5} , dans le MEM. Chaque dilution est répartie dans 5 cupules tapissées de cellules à raison de $50 \mu\text{l}$ par cupule. Les 4 jours suivants les cellules sont observées au microscope inversé et on note la première dilution du désinfectant ne donnant pas d'effet cytotoxique.

-- Capacité des cellules traitées à produire le virus

Chaque virus est titré simultanément sur des cellules traitées 1 h à 37°C à la première dilution non cyto-

toxique du désinfectant et sur des cellules non traitées. Si le titre varie, l'essai doit être refait en utilisant la dilution supérieure.

-- Essai proprement dit

Pour étudier les cinétiques d'inactivation de chacun des virus, on prépare un tube essai et un tube témoin :

-- Dans un *tube essai*, on mélange volume à volume la suspension virale et la solution mère de désinfectant.

-- Dans le *tube témoin*, le désinfectant est remplacé par de l'eau distillée stérile.

Ces tubes étant portés à la température du laboratoire, on prélève à 5, 15, 30, 60 et 120 min une partie du mélange que l'on dilue à la dilution non cytotoxique définie précédemment dans les tubes mis dans la glace fondante. Ces échantillons sont ensuite titrés et le titre est comparé au titre témoin effectué au temps 120 min.

5.1 -- Préparation

La préparation des cellules, des solutions de désinfectants et des virus sont identiques au 4.1.

La filtration sur gel est préparée de la manière suivante : le gel LH 20 (limite d'exclusion 4 000 D, Pharmacia) est mis à gonfler 24 h à la concentration de 22 g/100 ml de tampon PBS 0,15 M, pH 7,2, à la température du laboratoire, puis stérilisé en 20 min à 120° C, avant d'être stocké à + 4° C en flacon de 15 ml. Au moment de l'emploi, ce gel est porté au bain-marie à 80° C pendant 30 min et coulé dans un corps de seringue à usage unique de 10 ml (réf. 09.1.11.6, Becton-Dickinson France) au fond duquel on a déposé du coton hydrophile stérile. Après un tassement de 90 min, le corps de seringue est déposé dans un tube en polycarbonate (réf. 34 411 50 capacité 35 ml, O S I) et le tout est centrifugé 5 min à 2 500 tours/min (centrifugeuse Jouan E 96). La colonne de gel est alors prête à être utilisée.

5.2 -- Déroulement de l'essai

Cet essai consiste tout d'abord à vérifier que l'éluat récupéré après centrifugation du désinfectant ne possède pas d'effet virucide. Pour cela 1 ml du désinfectant dilué à la dose d'emploi est déposé en tête de colonne et le dispositif (corps de seringue, gel, tube polycarbonate) est centrifugé pendant 3 min à 2 500 tours/min. L'éluat est ensuite mis en contact avec 1 ml de suspension virale et après 30 min, le virus est titré et comparé à un témoin non traité.

Dans un deuxième temps, on prépare 2 tubes, un tube essai et un tube témoin. Dans le premier, on mélange volume à volume la suspension virale avec la solution mère de désinfectant et dans le deuxième la suspension virale avec de l'eau distillée stérile. Aux temps 5, 15, 30, 60 et 120 min, 1 ml de ce mélange est déposé à la partie supérieure de la colonne de gel et centrifugé 3 min à 2 500 tours/min. La filtration du mélange témoin est faite à 120 min. Le titrage du virus contenu dans ces filtrats est alors réalisé.

Lors de cette étude comparative, les cinétiques d'inactivation obtenues par les deux techniques se déroulent en parallèle. C'est-à-dire que pour un désinfectant donné et un virus donné, les prélèvements nécessaires pour l'application des deux méthodes ont été faits à partir du même tube essai. Par ailleurs, chaque point de cinétique correspond à une moyenne de trois essais.

Résultats et Discussion

1. Essais préliminaires

Avant congélation des lots de virus, un dosage de protéines totales donne une valeur de 1,3 mg/ml de stock virus HCC et 1 mg/ml de stock virus de la maladie de Talfan. Cette quantité de protéines, importante à connaître, est relativement faible, ce qui permet de limiter les interférences entre certains désinfectants, les oxydants notamment, et les matières organiques.

Par ailleurs, les titres moyens de ces lots de virus sont de 1×10^7 DCP 50/ml pour le virus de l'HCC et de $1 / 10^8$ DCP 50/ml pour le virus de la maladie de Talfan

1.1 -- La technique de la dilution brutale

Les résultats obtenus lors de ces essais préliminaires sont rapportés dans le tableau 1.

Les titres sont exprimés par le logarithme décimal de la DCP 50. Nous constatons que la première dilution non cytotoxique du désinfectant est le plus souvent 10^{-2} ou 10^{-3} et que les cellules ainsi traitées ne présentent pratiquement pas de perturbation au niveau de leur capacité à produire le virus par rapport à des cellules non traitées. Ceci est vérifié aussi bien pour les cellules PK (15) que les cellules MDCK. Ces produits désinfectants s'avèrent donc relativement toxiques n'empêchant pas toutefois l'étude *in vitro* de leur activité, mais ayant pour conséquence d'augmenter les limites du titrage des virus.

1.2 -- La technique de filtration sur gel

Dans le tableau 2, les résultats indiquent l'absence d'écart entre les titres des virus témoins et des virus traités pendant 30 min avec l'éluat résultant d'une filtration du désinfectant pendant 3 min à 2 500 tours/min. Nous concluons ainsi que le désinfectant est retenu dans le gel et que ces conditions permettront dans le même temps d'exclure totalement le virus déposé en tête de colonne.

2 -- Essais proprement dit

Les résultats de ces essais sont présentés par les 10 séries de cinétiques d'inactivation de la figure 1. Ces cinétiques sont représentées par la chute du titre viral (\log_{10} DCP 50) en fonction du temps, exprimé en minutes.

Deux remarques importantes peuvent être faites :

2.1 -- Au niveau des méthodes utilisées

Les désinfectants peuvent être regroupés en deux catégories.

La série de produits A, C et E pour lesquels nous voyons un écart important entre les cinétiques obtenues par la méthode de filtration sur gel et

celle de dilution brutale et ceci quel que soit le virus. Cet écart peut être de 2 à 3 log suivant le produit testé. La conséquence de ceci est que si on utilisait uniquement la technique de filtration sur gel, on pourrait conclure à une chute de titre de 3 ou 4 log qui n'est en fait qu'apparente. Dans le même temps, nous constatons pour ces trois produits, après le mélange désinfectant-virus, un précipité qui évolue du léger trouble en 5 min au précipité important au fond du tube au bout de 2 heures. Nous expliquons cet écart par ce phénomène de précipitation qui piège une partie des particules virales en haut de la colonne de gel LH 20.

Pour la série de produits B, D, F, G, H, I et J, nous voyons d'emblée la très grande similitude des cinétiques quels que soient la méthode ou le virus employés. Par ailleurs, des phénomènes de précipitation ne sont pas observés avec ces désinfectants.

2.2 -- Au niveau de l'activité des désinfectants testés

En règle générale, le virus de la maladie de Talfan est plus résistant que le virus de l'HCC, ce qui confirme les nombreux travaux démontrant la plus grande résistance des entérovirus par rapport aux adénovirus.

Si on tient compte des critères d'activité virucide définis dans le cadre de l'homologation des désinfectants à usage agricole, par le Ministère de l'Agriculture, seules les spécialités D, G et H

obtiennent une chute du titre viral au moins égale à 3 log en 30 min sur les deux virus; sur ces trois désinfectants, deux peuvent être classés dans la même famille des produits oxydants (G et H). Quant aux désinfectants I et J, ce sont deux produits simples agréés par le Ministère de l'Agriculture pour combattre les agents responsables des maladies légalement contagieuses et considérés comme les désinfectants de référence. Les autres spécialités (A, B, C, E, F) n'ont pas, à cette dose d'emploi, même au bout de deux heures, une activité suffisante.

Les deux méthodes d'étude de l'activité virucide des désinfectants que nous avons retenues apportent un progrès certain dans la standardisation de ces méthodes, en supprimant l'interférence de la cytotoxicité de ces formulations. Elle nécessitent l'emploi de suspensions virales de titre élevé, égal au moins à 10^7 DCP 50/ml et une attention tout à fait particulière au phénomène de précipitation qui peut se produire entre le désinfectant et le virus. Ce dernier point nous conduit à envisager une étude complémentaire en employant cette fois une méthode utilisant la filtration moléculaire (Gévaudan *et al.*, 1980, Groupe Virucide AFNOR) comme technique de séparation des particules virales du désinfectant.

Reçu, le 7 février 1984

Version corrigée, le 24 mai 1985

Accepté, le 3 juillet 1985.

Résumé

L'évaluation de l'activité virucide des désinfectants et des antiseptiques est un souci constant. Pour cette raison, des études se sont développées ces dernières années dans le but de standardiser ces techniques. Notre travail décrit deux méthodes, la méthode de dilution brutale et celle de filtration sur gel. Il compare les cinétiques d'inactivation de deux virus (virus de la maladie de Talfan et virus de l'Hépatite Canine Contagieuse) obtenues après contact avec 10 désinfectants couramment utilisés dans le domaine agricole et agro-alimentaire. Ces produits montrent, en général, une faible activité virucide aux doses recommandées par le fabricant. Cette étude souligne également la nécessité d'avoir à sa disposition des virus de titre élevé et le risque qu'il y a à n'utiliser que la technique de filtration sur gel lorsqu'il existe un phénomène de précipitation entre le désinfectant et la suspension virale.

Références

- ANONYME, 157. Arrêté du 28 février 1957 Désinfection dans le cas de maladies légalement contagieuses des animaux. *Journal Officiel* du 1^{er} mars 1957.
- ANONYME, 1972, Loi n° 72-1139 du 22.12.72 étendant le champ d'application de la loi validée modifiée du 2 novembre 1943 relative à l'organisation du contrôle des produits antiparasitaires à usage agricole. *Journal Officiel* du 23 décembre 1972.
- ANONYME, 1981. *Recueil de normes françaises. Antiseptiques et désinfectants*, 1^{re} éd., 331 pp, Afnor, Paris.
- BEYTOUT A., BEYTOUT D., LALUQUE J. B., LAVERAN H., 1979. Méthode d'étude *in vitro* de l'activité virucide des antiseptiques et désinfectants. *Rev. Inst. Pasteur, Lyon*, **12**, 473-482.
- BLACKWELL J.H., CHEN J.H.S., 1970. Effects of various germicidal chemicals on H. Ep. 2 cell culture and Herpes simplex virus. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 1229-1236.

- DRULAK M., WALLBANK A.M., LEBTAG I., WERBOSKI L., POFFENROTH L., 1978. The relative effectiveness of commonly used desinfectants in inactivation of Coxsackie-virus B5. *J. Hyg. Camb.*, **81**, 389-397.
- GARRIGUE G., FLOCH J.J., COLETTE J., ARBORIO M., 1980. Étude de l'activité virulicide *in vitro* de la noxytioline. *Rev. Inst. Pasteur, Lyon*, **13**, 209-215.
- GAUSTAD J.W., Mc DUFF C.R., HATCHER H.J., 1974. Test method for the evaluation of virucidal efficacy of three common liquid surface disinfectants on a simulated environmental surface. *Appl. Microbiol.*, **5**, 748-752.
- GEVAUDAN M.J., CHARREL J., GEVAUDAN P., 1980. Note préliminaire sur la mise au point d'une méthode de mesure de l'activité virulicide des antiseptiques en phase aqueuse. *Rev. Inst. Pasteur, Lyon*, **13**, 353-357.
- GROUPE DE TRAVAIL VIRUCIDE, Association française de normalisation, Tour Europe 92080 Paris La Défense.
- REED L.J., MUENCH H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end point. *Am. J. Hyg.*, **27**, 493-497.
- VAN DER GROEN G., EL MEKKI A.A., PATTYN S.R., 1980. New method for virucide testing. *J. Virol. Meth.*, **1**, 27-31.