



Air & Santé, un équilibre à trouver
Challenges et Innovations

23 & 24 novembre 2021, Paris

DETECTION DE L'ARN DE SARS-COV-2 DANS L'AIR INTERIEUR D'UN BATIMENT

Le groupe Conidia regroupe 3 Business Units



Etude des contaminations microbiologiques environnementales et industrielles.



Etude des maladies des plantes: vigne, céréale...



Etude de la qualité microbiologique de l'air.

Les différents secteurs d'activité



Industrie



Hôpitaux



BTP



Collectivités

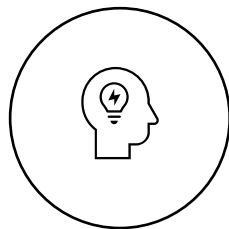


Coopératives agricoles

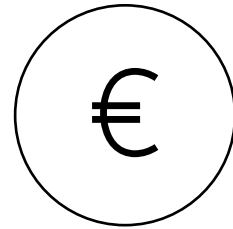


Industries chimie

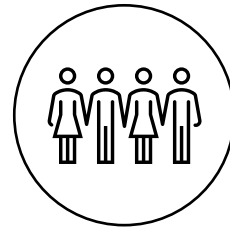
Quelques chiffres clés



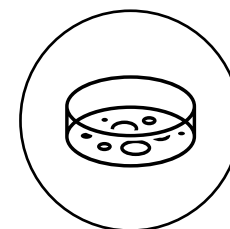
Création
2005



CA 2020
1,7 M€



14 personnes



+350 m² de
laboratoire

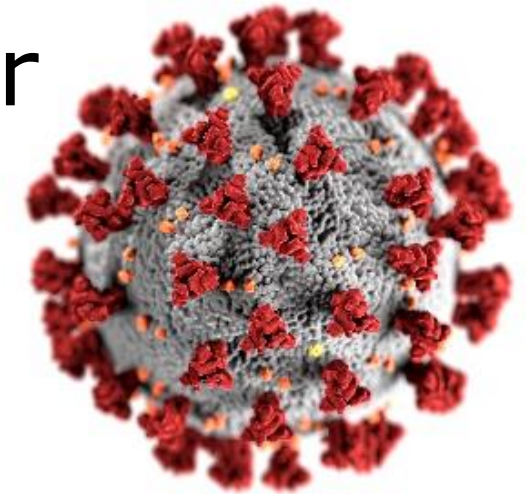


CIR



ISO 9001

REX : Détection du Covid-19 dans l'air



La situation

- Deuxième vague Covid
- Homme de 50 ans environ porteur du virus
- En quarantaine à son domicile, avec son épouse (non infectée)
- En télétravail (chambre)
- Evaluation de la présence du virus dans l'air du logement

La campagne de mesure

- Prélèvement dans différents points du logement
- Prélèvement air et surface

Objectif

- Valider la méthode de prélèvement
- Valider la méthode d'analyse du virus

Plan d'échantillonnage



- Prélèvement air
- Prélèvement surface

Résultats

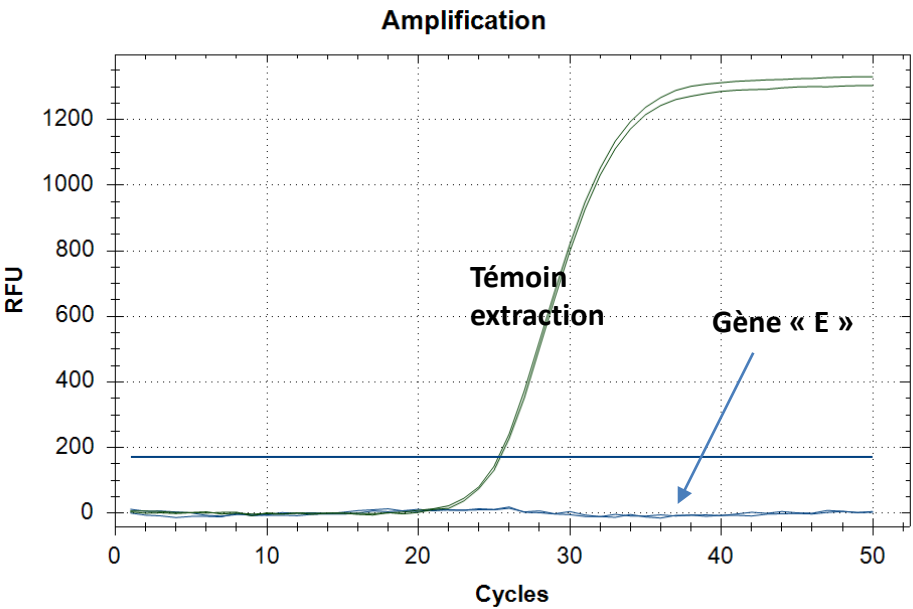
AIR

Localisation	Conditions	Détection du virus
Chambre	Personne malade avec masque	NON
	Personne malade sans masque (1)	NON
	Personne malade sans masque (2)	OUI
Salle de bain	Personne dans la chambre sans masque	NON
Séjour	Personne dans la chambre sans masque	NON

⇒ Entre 10 et 20 minutes pour détecter le virus dans l'air lorsqu'une personne malade est située à proximité

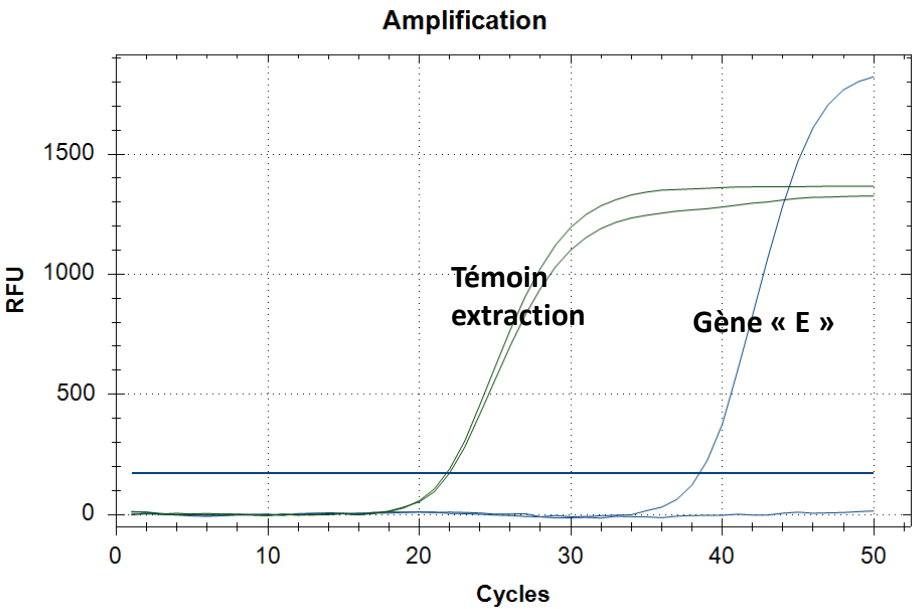
⇒ Limite de détection ?

⇒ Gestion des flux d'air (VMC simple flux)



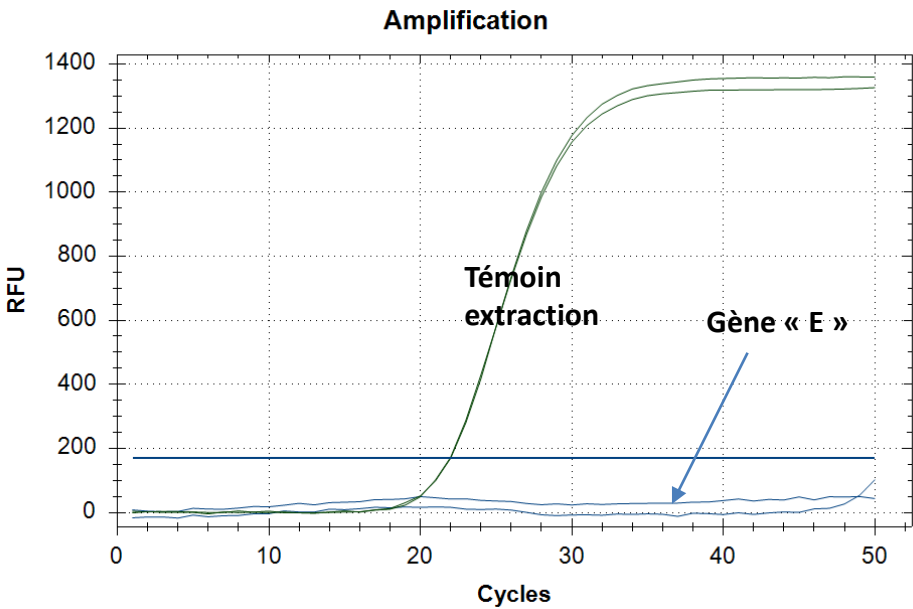
Chambre
Patient avec masque

ARN virus non détecté



Chambre
Patient sans masque

ARN virus détecté mais non quantifiable



Salle de bain
-

ARN virus non détecté

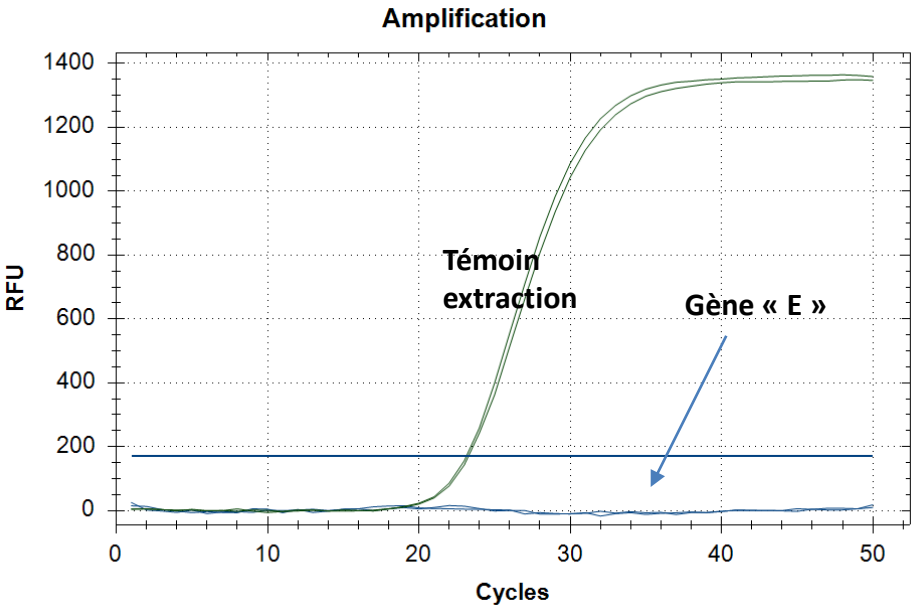
Résultats

SURFACE

Localisation	Conditions	Détection du virus
Chambre	Clavier ordinateur	OUI
	Ecran smartphone	OUI
	Poignée porte	NON
Séjour	Table	NON

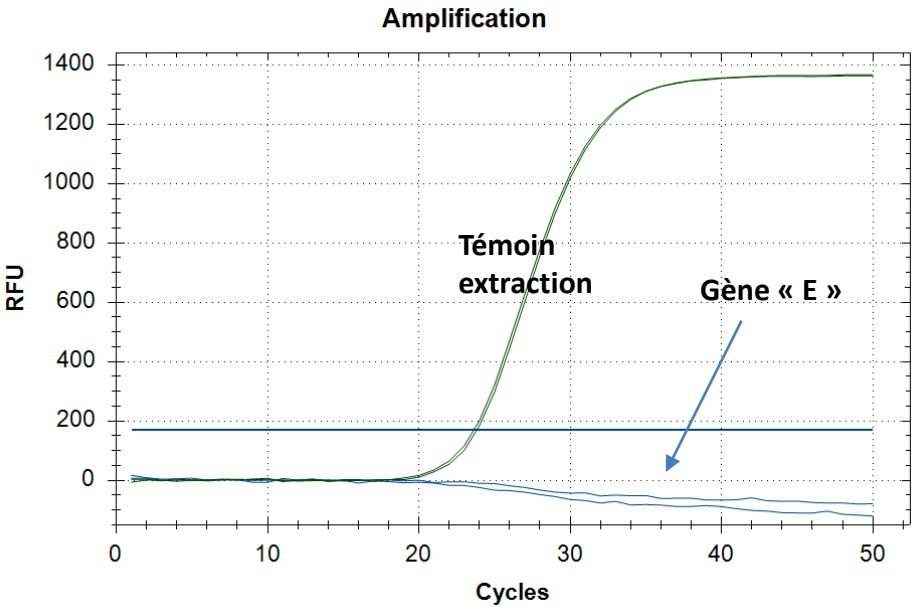
⇒ Ecran smartphone et poignée de porte
« désinfectées » moins d’une heure avant
prélèvement

⇒ Présence de l’ARN du virus sur des surfaces
utilisées régulièrement par un patient
Covid+



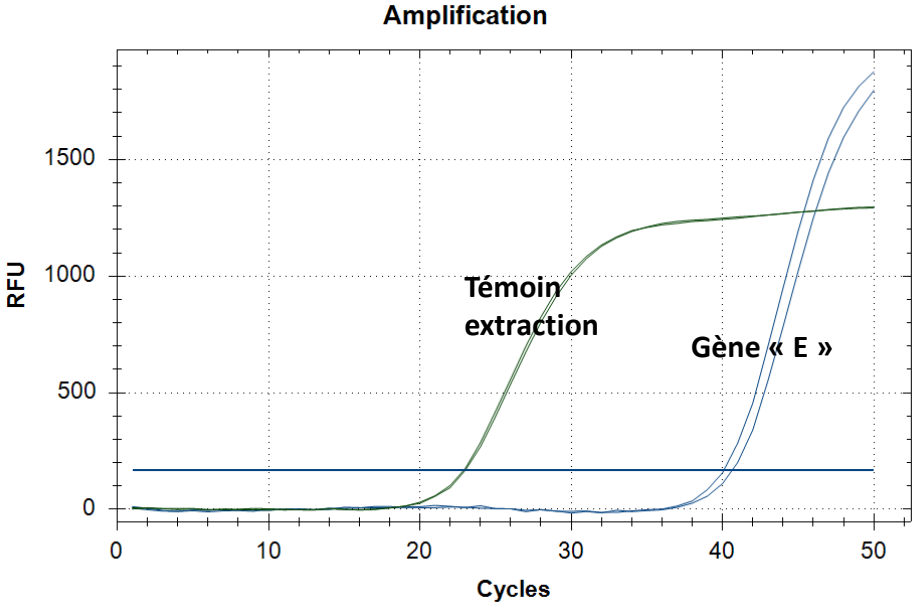
Chambre
Poignée de porte

ARN virus non détecté



Séjour
Table

ARN virus non détecté



Chambre
Ecran téléphone portable

ARN virus détecté mais non quantifiable

Développement de la méthode

1 - Recherche de l'ARN du SARS-CoV-2 par RT-PCR

La méthode est basée sur les travaux de l'équipe de Corman et al (2020 - Berlin) et la recherche de plusieurs gènes cibles dont le gène E.

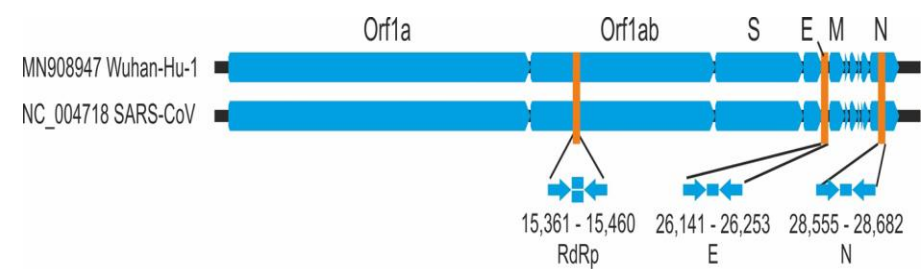


Figure 1 : Position des zones amplifiées sur les gènes cibles du génome du virus SARS-CoV-2 (Corman et al., 2020)

- ⇒ Amplification du gène E puis
- ⇒ Pour les résultats positifs, contrôle avec les sondes IP2 et IP4 (Institut Pasteur) ou sonde pour le gène RdRp
- ⇒ Confirmation de la méthode par comparaison avec kit du commerce BioMérieux

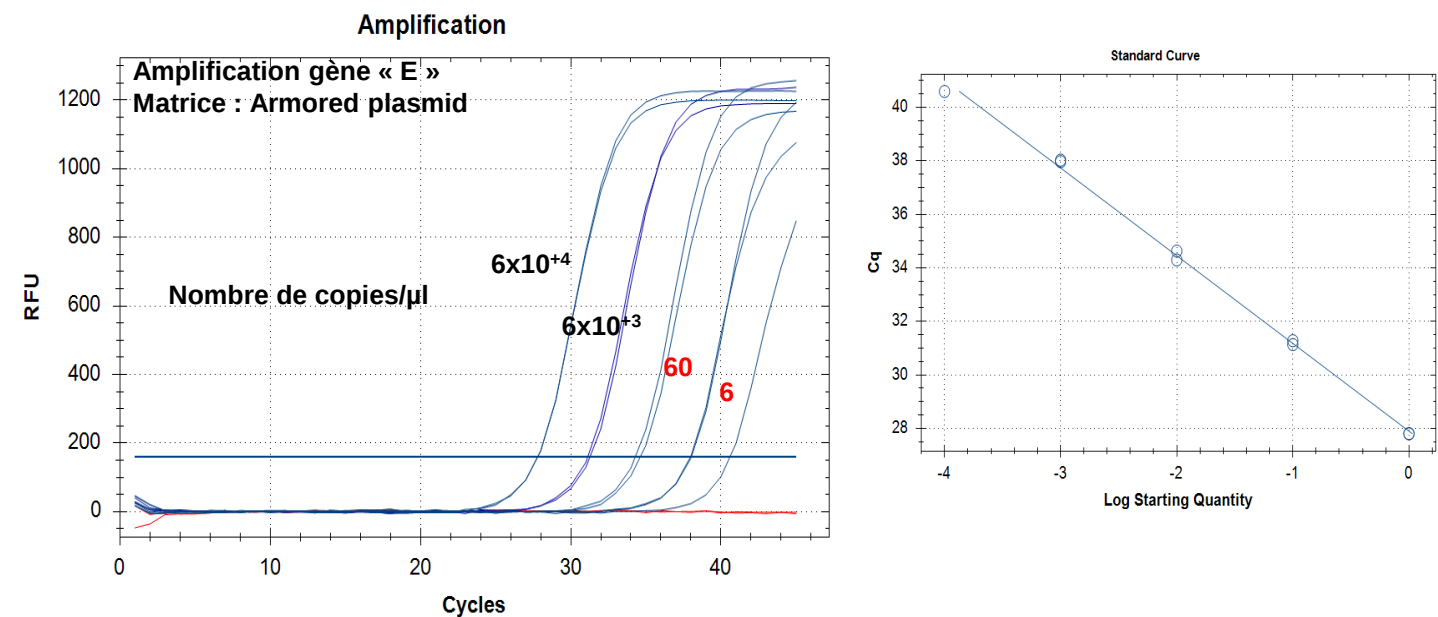


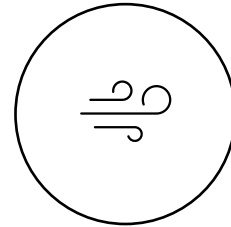
Figure 2 : Analyse RT-PCR du gène « E » du SARS-CoV-2 effectuée sur un plasmide. (A) courbes RT-PCR des points de dilutions du plasmide. (B) droite de régression obtenues à partir de la gamme du plasmide (Log copies génome versus cq)

=> La limite de détection est de 6 copies de génome/μl

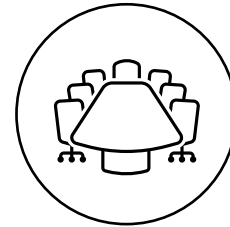
2 – Optimisation de la méthode

Prélèvement

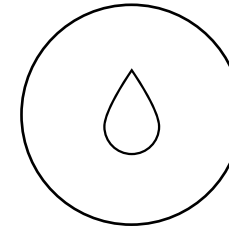
Différentes matrices d'analyses :



Air



Surface



Eaux usées

Différents supports de prélèvement :



Coriolis
(air)



Cassette
membrane 0,8 μ
(air)



Ecouvillon
(surface)



Bouteille
(eaux usées)

⇒ Tous les échantillons sont repris dans un volume de liquide compris entre 2,5 et 10 ml environ

2 – Optimisation de la méthode

Concentration de l'échantillon

Le nombre de virus attendu dans les matrices choisies pourrait être faible

Concentration du liquide dans une colonne Amicon
= analyse de l'ensemble de l'échantillon

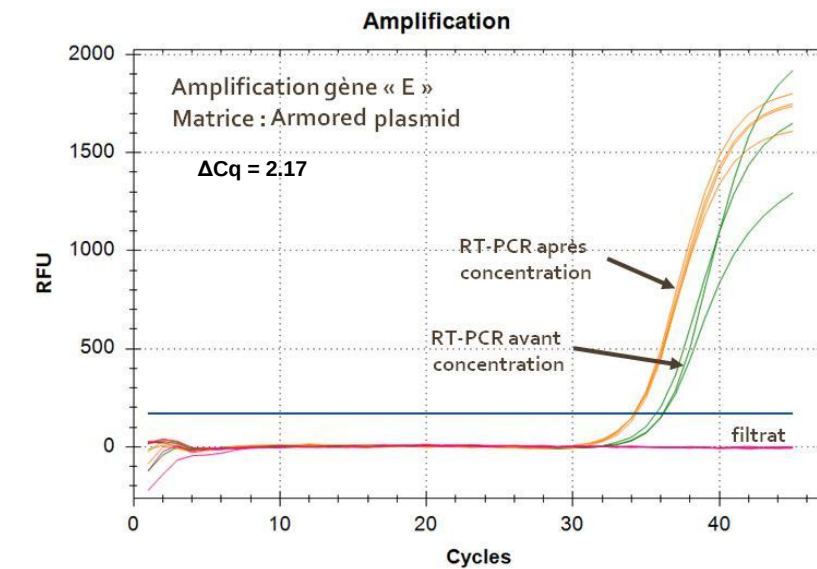
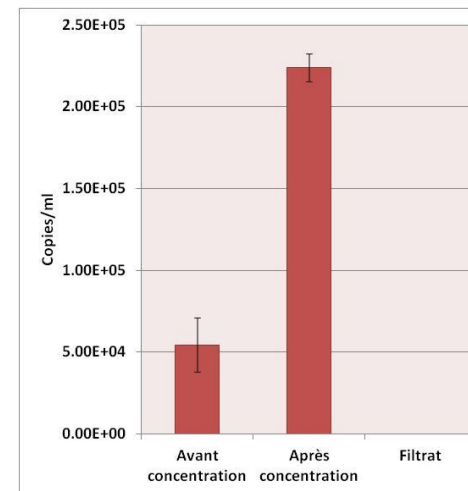


Figure 4 : Concentration de l'échantillon. A gauche, nombre de copies de gènes avant et après concentration, à droite, nombre de cycle d'amplification

⇒ Amélioration de la sensibilité de la méthode avec gain de 2,17 Cq et concentration du produit d'au moins 10 fois

2 – Optimisation de la méthode

Validation de l'extraction

Extraction = étape sensible car risque de perte du matériel d'analyse

L'ajout d'un contrôle interne permet de valider

- Extrait d'ARN exploitable
- Absence d'inhibiteur de PCR
- Eviter les faux négatifs

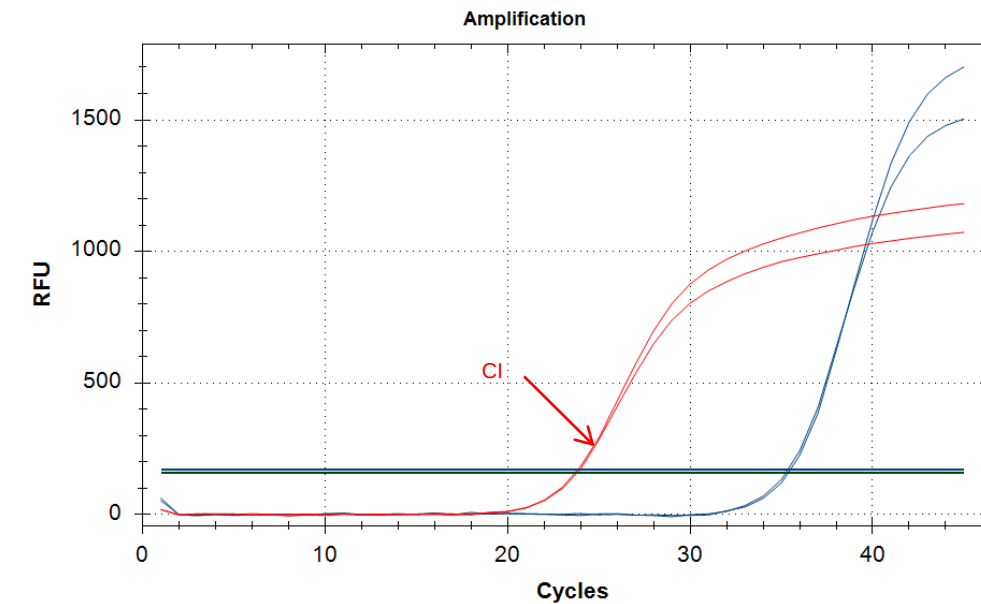


Figure 5 : Analyse du CI par RT-PCR après extraction

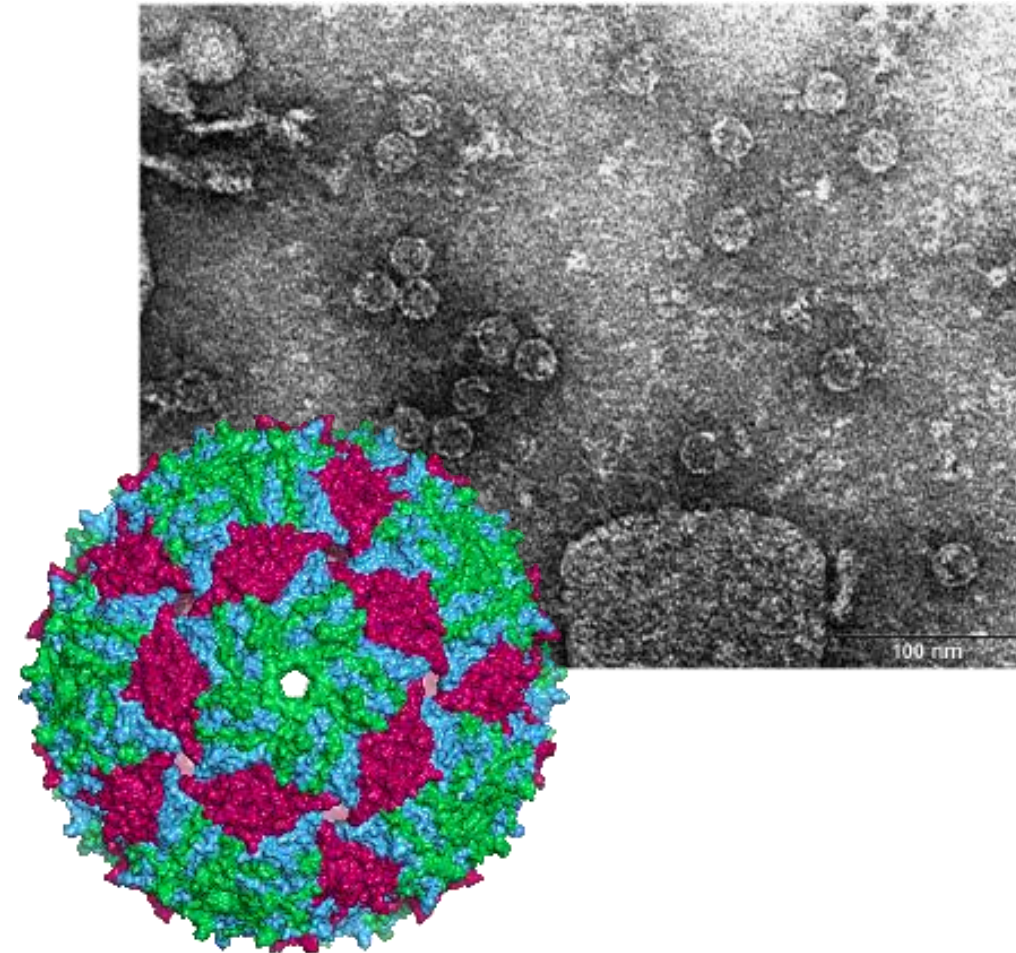
3 – Essai de validation en laboratoire

Utilisation d'un bactériophage

Besoin d'un outil de mesure non pathogène pour effectuer des diffusions

Utilisation du bactériophage MS2 dont la taille de 25 nm est plus petit que le virus SARS-CoV-2.

- ⇒ Simuler le virus dans l'air d'une chambre d'essai
- ⇒ Valider le choix de la méthode de prélèvement (Coriolis μ , Cassette...)
- ⇒ Définir une limite de détection



3 – Essai de validation en laboratoire

Diffusion en chambre d'essai

- Diffusion avec un nébuliseur Colison 6 jets : permet de générer un brouillard homogène dans la chambre
- Diffusion d'une gamme de concentration variant de 10^3 à 10^8 PFU/ml
- Collecte avec Coriolis μ pendant 10 minutes à 200 litres/minute (soit 2 fois le volume de l'enceinte)
- Analyse du liquide : concentration, extraction, RT-PCR



3 – Essai de validation en laboratoire

Résultats

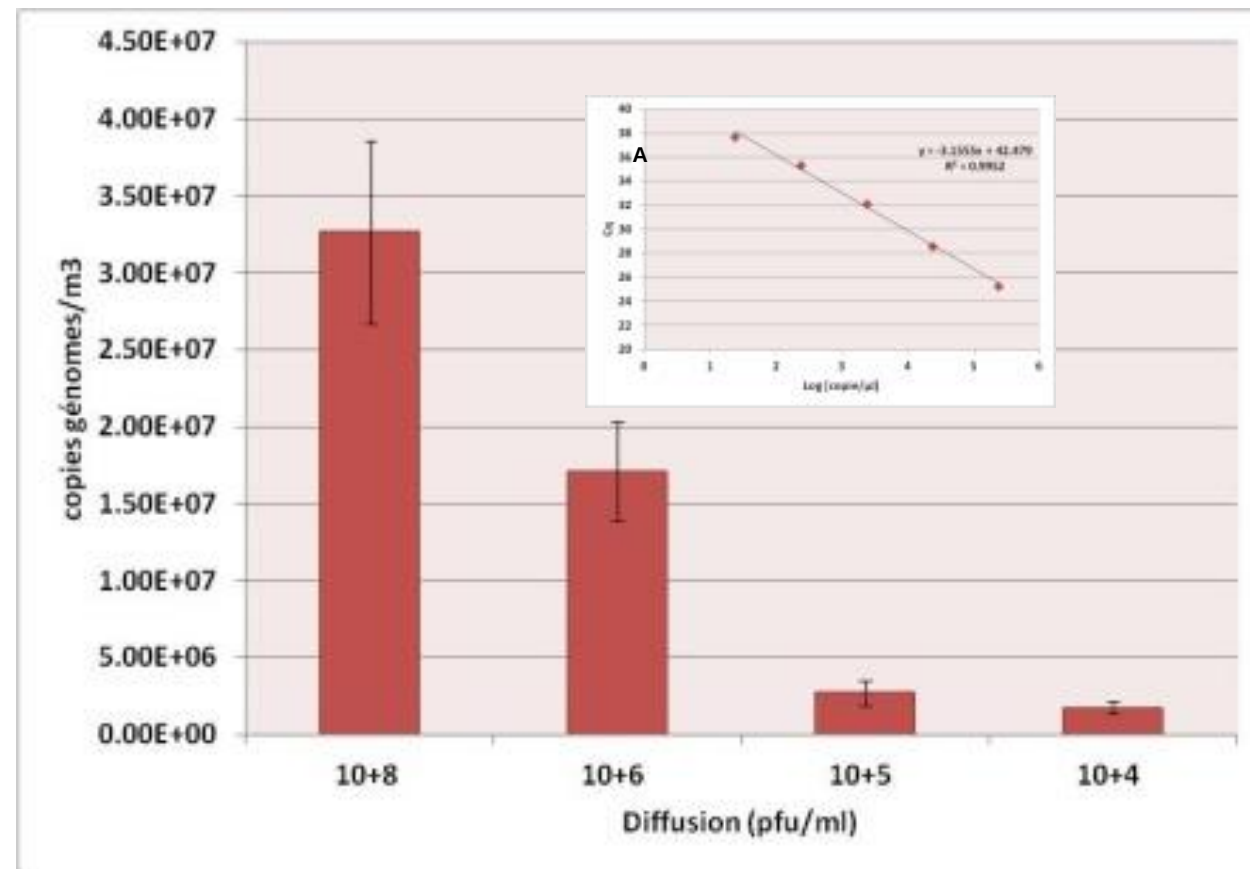
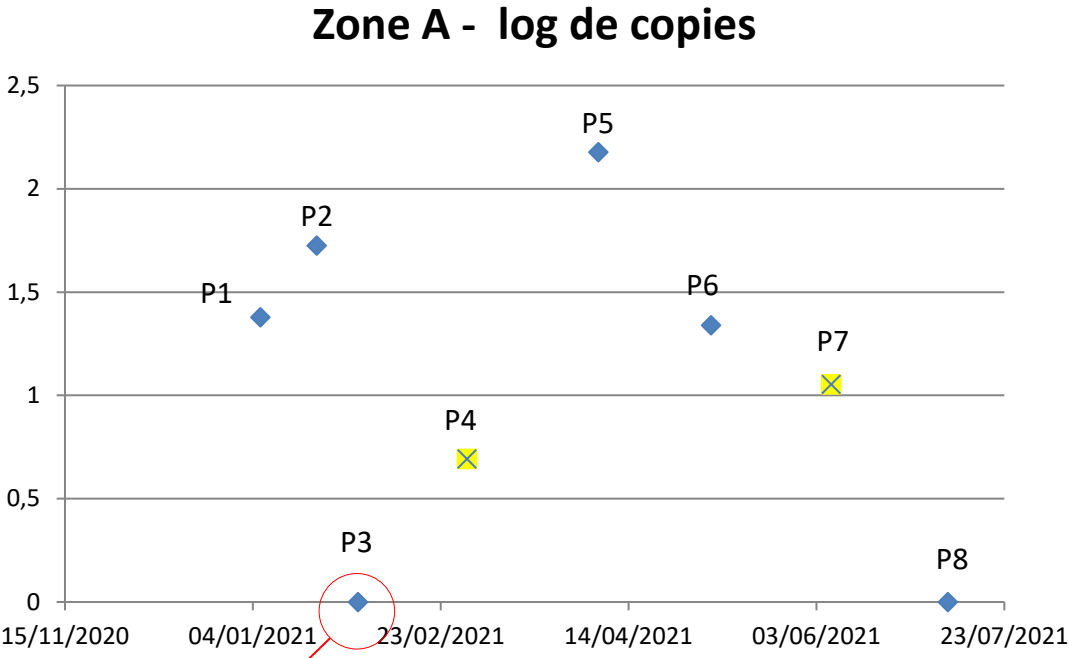


Figure 6 : Quantification de l'ARN du phage MS2 par RT-PCR dans des prélèvements Coriolis après diffusion de solutions à différentes concentrations pfu/ml. (A) droite de régression obtenue à partir de la gamme du plasmide-phage MS2 (Log copies génome versus Cq)

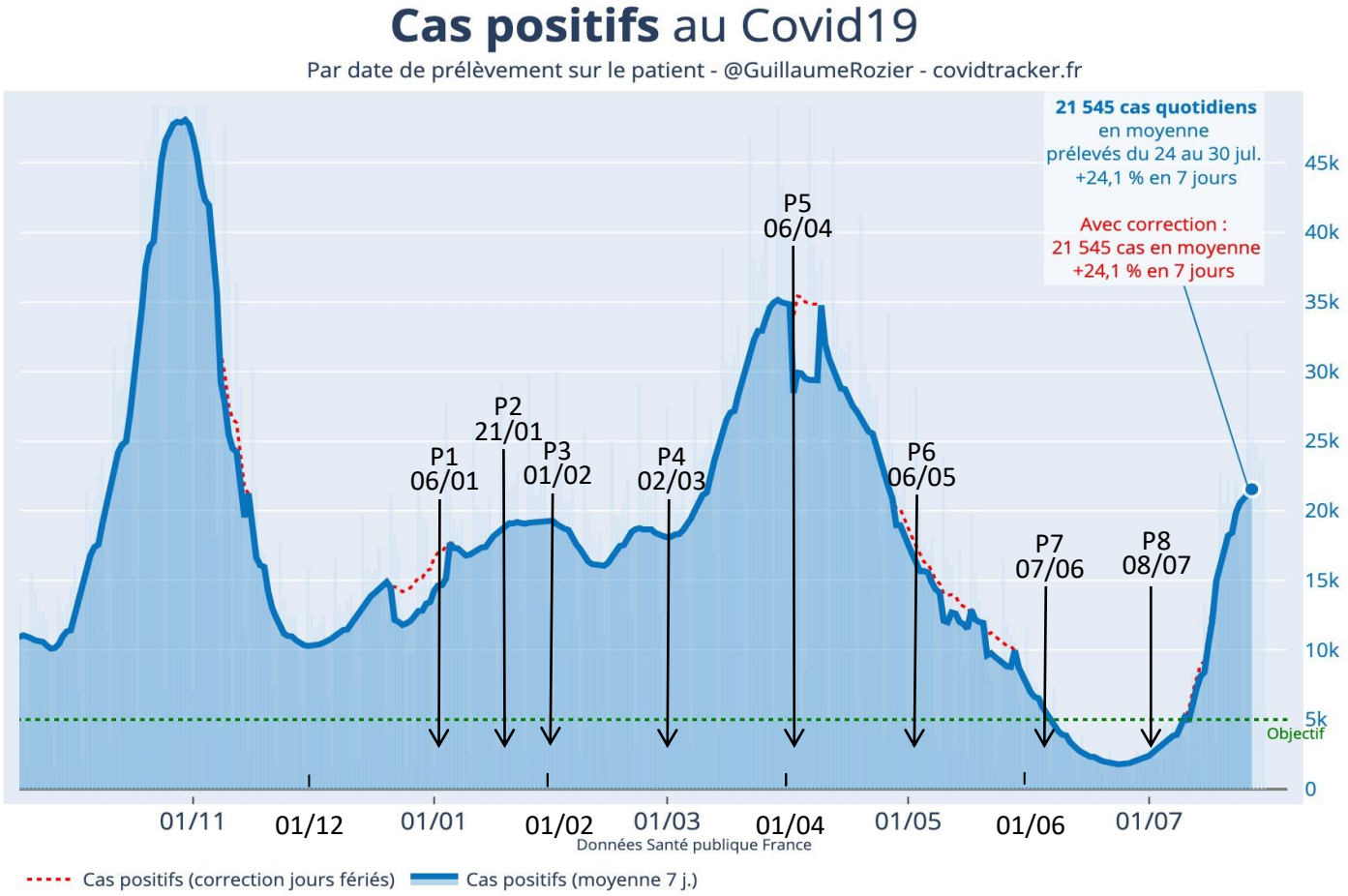
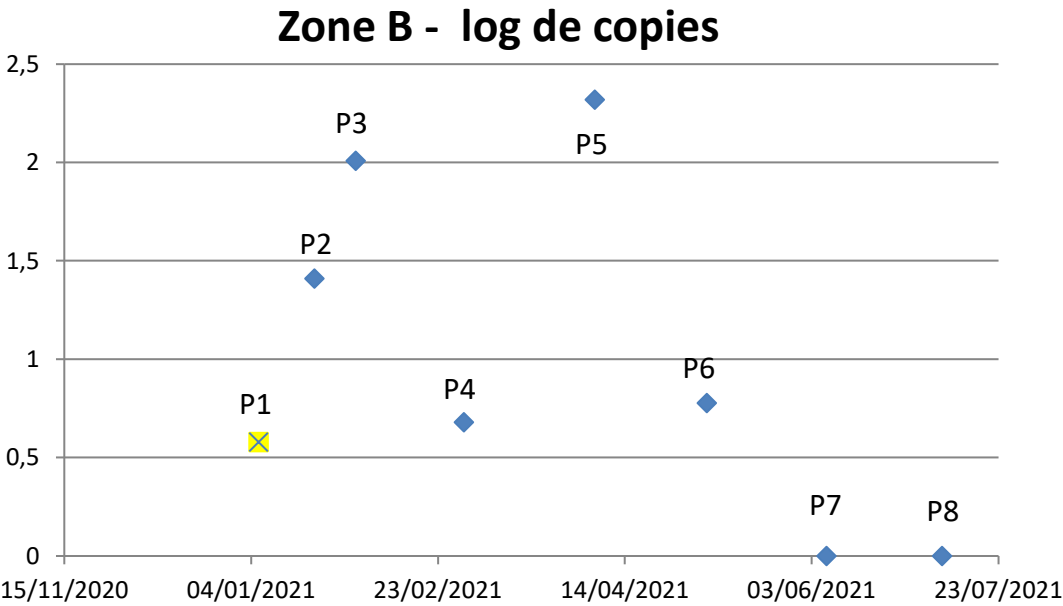
- Capacité de détecter la présence du phage à des concentrations d'au moins 10^3 PFU/ml de diffusion (1 ml diffusé)
- Possibilité de quantifier le phage à une concentration d'au moins 10^4 PFU/ml diffusé

Les dernières innovations

Evolution de l'ARN de SARS-CoV-2 dans les eaux usées



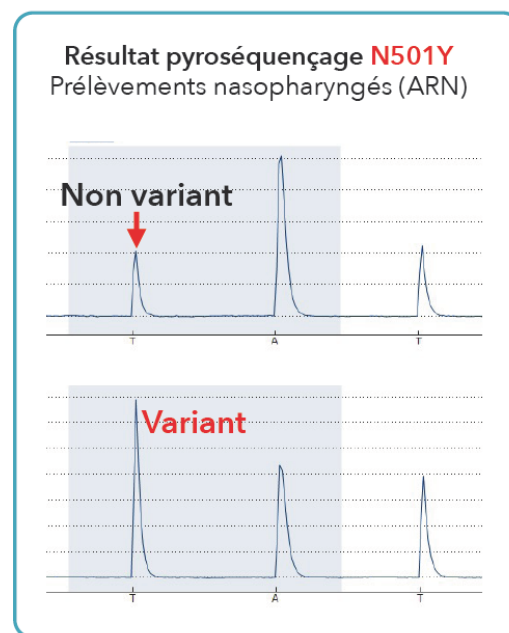
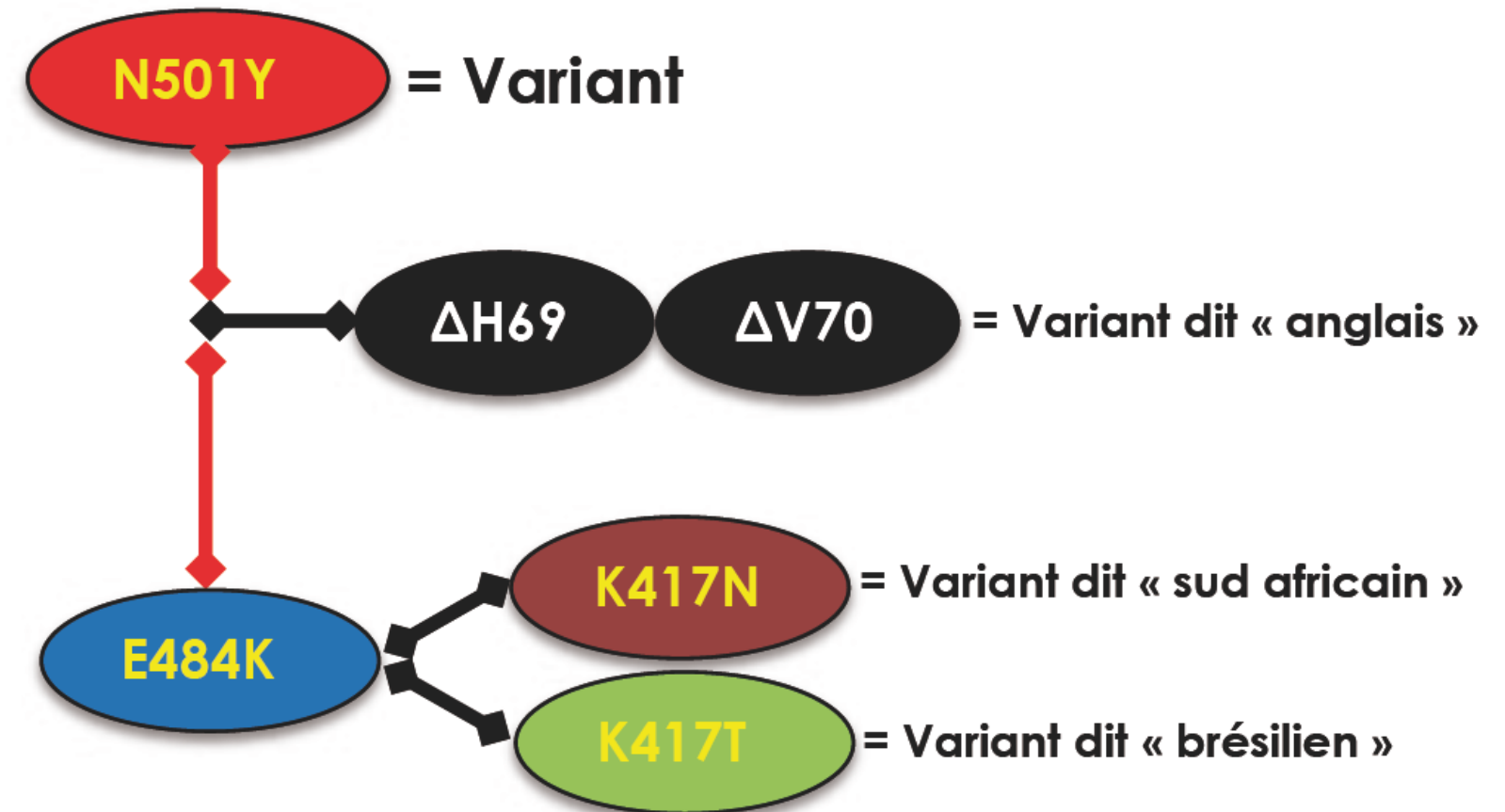
Inhibition RT-qPCR?



⇒ Bonne corrélation entre les résultats des essais et l'évolution des cas positifs

Recherche des variants de Covid-19 par pyroséquençage

- Méthode de séquençage rapide et flexible basée sur une succession de réactions enzymatiques
- Elle permet de visualiser les modifications génétiques : mutation, délétion/insertion... et de les quantifier dans un échantillon
- Travaux réalisés sur prélèvements nasopharyngés et eaux usées



N501Y

Commune aux 3 variants, elle permet de faire un premier criblage pour estimer le taux des variants comparé à la souche qui circulait en 2020.

ΔH69 ΔV70

Délétions caractéristiques du variant VUI202012/01 GR/501Y.V1 (B.1.1.7) détectées pour la première fois en Angleterre.

E484K

Commune aux 2 variants GH/501Y.v2 (B.1.351) et GR/484K.V2 (B.1.1.28).

K417N/T

Elle permet de distinguer les deux variants GH/501Y.v2 (B.1.351) et GR/484K.V2 (B.1.1.28).

Je vous remercie de votre attention

Jean BAUDE

04 69 64 72 89

j.baude@conidair.fr

www.conidair.fr

CONIDAIR - Route de Chasselay - PA En Chuel - 69650 Quincieux - France

