

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

J. Baude*¹, S. Cherrad¹, N. Belle¹, V. Maire¹, C. Bouvier¹, S. Vacher¹

¹CONIDIA, 69650 Quincieux, France

*Courriel de l'orateur : j.baude@conidair.fr

TITLE

DETECTION OF SARS-CoV-2 RNA IN INDOOR AIR OF A BUILDING

RESUME

Un des enjeux de la crise du Covid-19 est de comprendre un possible risque de transmission du virus par l'air dans les environnements intérieurs. Afin de rechercher le virus dans ce type de matrice, notre société a développé une méthode de prélèvement et d'analyse la plus robuste possible en s'appuyant sur son expertise et sur les travaux scientifiques internationaux. Les phases de prélèvement, de concentration, d'extraction et de quantification de l'ARN du virus ont été testées en laboratoire ou sur le terrain pour proposer une solution la plus sensible possible.

ABSTRACT

One of the issues of Covid-19's outbreak is to find out a possible air-based dissemination in indoors environments. To search the virus in this particular setting, our company developed the sturdiest sampling and analyzing method based on its own expertise and international scientific works. The sampling, concentration, extraction and quantification stages of the virus RNA were tested in laboratory or on the field in order to find the most accurate solution as possible.

MOTS-CLÉS : bioaérosol, SARS-CoV-2, RT-PCR, prélèvement / **KEYWORDS**: bioaerosol, SARS-CoV-2, RT-PCR, sampling

1. CONTEXTE ET BESOINS

La pandémie liée à la Covid-19 a un impact sur nos modes de vies. Dans nos pays développés, nous passons plus de 80% de notre temps dans des environnements clos avec utilisation de système de traitement d'air. La contamination par l'air pourrait être un vecteur (présence de microgouttelettes, flux d'air) de transmission du virus. Pour répondre à des inquiétudes de nos clients, notre équipe R&D a développé une méthode de détection de l'ARN du SARS-CoV-2 dans l'air des bâtiments. Notre approche mesurée a été, après une recherche bibliographique internationale, la mise en place d'un protocole le plus universel possible (choix des amorces, du matériel de prélèvement) pour la détection du virus. La validation du protocole a inclus des phases d'analyses de laboratoire, de développement de chambre d'essai et de prélèvement sur le terrain.

2. METHODES D'ANALYSES

Avant tous travaux en chambre d'essai ou sur le terrain, une validation des différentes étapes de traitement de l'échantillon a été réalisée afin de contrôler la pertinence du choix des sondes et du protocole envisagés, afin d'améliorer la sensibilité du résultat final. En effet, les quantités d'ARN du virus attendus dans les prélèvements d'air (échantillon liquide) peut être faible voir très faible et il est indispensable d'obtenir la limite la plus basse possible pour proposer une donnée d'information acceptable. La méthode d'analyse reposant sur une amplification génique d'une zone spécifique de l'ARN du SARS-CoV-2 est réalisée après une phase de concentration du produit de collecte et une phase d'extraction des acides nucléiques.

2.1. Concentration de l'échantillon

Les prélèvements des particules virales sont réalisés à l'aide d'un équipement spécifique. Après une recherche bibliographique (Zhou *et al*, 2020) et un état des lieux des méthodes déjà utilisées par notre société, le choix de l'équipement a porté sur le Coriolis μ de la société Bertin Technologies. Le volume de collecte après prélèvement est compris entre 8 et 11 ml, dépendamment des facteurs environnementaux (humidité relative...). Pour réaliser les analyses le volume nécessaire est de 200 à 500 μ l : afin de limiter la dilution du virus et ainsi augmenter la sensibilité de la méthode.

Afin de concentrer les particules virales contenues dans le liquide de collecte, une étape de concentration est réalisée à l'aide d'un kit commercial : unité de centrifugation Amicon ultra-15 de la société Merck-Millipore.

2.2. Extraction de l'ARN viral

Après concentration du liquide de collecte, une extraction de l'ARN viral (SARS-CoV-2 et phage bactérien) est réalisée à l'aide d'un kit commercial de la société Macherey-Nagel : NucleoSpin RNA. Ce kit, recommandé dans la méthode RT-PCR utilisée, a été sélectionné suite à une comparaison de l'efficacité de différents kits commerciaux.

2.3. Analyse par RT-PCR

La littérature scientifique a été prolifique sur le début de l'année 2020 pour la mise en place de protocole de détection et de quantification de l'ARN du virus SARS-CoV-2. Au sein de notre laboratoire, le choix a porté sur la méthode RT-PCR ciblant les gènes E et RdRp (cf. figure 1) développée par Corman *et al* (2020). Cette méthode est validée par le CNR et utilisée pour le diagnostic du virus SARS-CoV-2 à partir de prélèvement nasopharyngé.

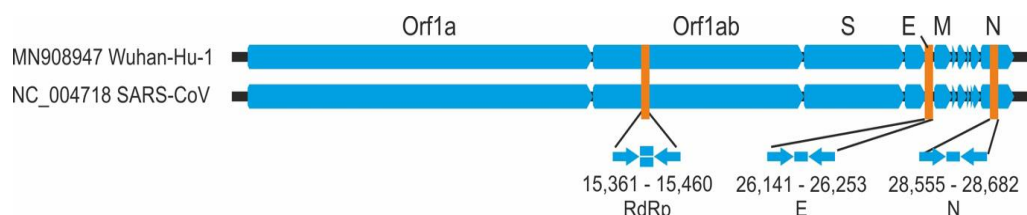


Figure 1. Position des zones amplifiées sur les gènes cibles du génome du virus SARS-Cov-2 (Corman et al., 2020)

Tableau 1. Amorces et sondes utilisées pour l'amplification de zones cibles sur les deux gènes E et RdRp du génome du SARS-CoV-2.

Primer E_Sarbeco_F1	ACA-GGT-ACG-TTA-ATA-GTT-AAT-AGC-GT
Primer E_Sarbeco_R2	ATA-TTG-CAG-CAG-TAC-GCA-CAC-A
Probe E_Sarbeco_P1	FAM/ ACA-CTA-GCC-ATC-CTT-ACT-GCG-CTT-CG /BHQ1
Primer RdRP_SARsR-F2	GTG-ARA-TGG-TCA-TGT-GTG-GCG-G
Primer RdRP_SARsR-R1	CAR-ATG-TTA-AAS-ACA-CTA-TTA-GCA-TA
Probe RdRP_SARsR-P1	FAM/ CCA-GGT-GGW-ACR-TCA-TCM-GGT-GAT-GC /BHQ1
Probe RdRP_SARsR-P2	FAM/ CAG-GTG-GAA-CCT-CAT-CAG-GAG-ATG-C /BHQ1

Pour compléter notre approche, des travaux ont été menés avec de l'ARN viral d'un phage simulant la particule virale. La détection et la quantification de ce phage bactérien est (sont) effectuées par RT-PCR avec des amorces et sondes spécifiques au virus bactérien choisi (en cours de validation).

Il est envisagé de comparer différentes méthodes de RT-PCR pour évaluer la sensibilité de la méthode à la détection du virus SARS-CoV-2 dans les prélèvements d'air.

3. METHODES D'ESSAI

3.1. Diffusion d'un agent viral simulant le virus dans une enceinte

Notre laboratoire de type P2 est équipé d'une enceinte de diffusion d'un volume d'un mètre cube utilisée dans les tests de validation des épurateurs d'air. Cet équipement est utilisé habituellement avec des souches bactériennes et fongiques non pathogènes. Dans le cadre de l'analyse du SARS-CoV-2, notre laboratoire n'est pas en mesure de réaliser des essais dynamiques avec l'agent viral. Afin de réaliser des essais de diffusion pour valider la capacité de la méthode de prélèvement de collecter le virus et le protocole d'analyse de le quantifier, il a été sélectionné un phage non pathogène pouvant simuler la taille et les caractéristiques structurales du virus d'intérêt.

Ces tests de diffusion sont programmés pour le mois d'octobre et novembre et des résultats disponibles fin 2020.

La diffusion du phage est réalisée à l'aide d'un nébuliseur type Colison 6 jets, en milieu liquide. Le volume diffusé et la concentration de la solution est (sont) adaptée afin d'obtenir une concentration dans l'enceinte permettant une détection du phage. Le volume de diffusion est de 1 à 2 ml afin de ne pas augmenter significativement le taux d'hygrométrie dans la chambre d'essai. Le temps de diffusion est compris entre 5 et 10 minutes. La chambre d'essai étant hermétique, le matériel de prélèvement est installé dans l'enceinte

avant la diffusion, avec un délai de 10 à 15 minutes. Les conditions de prélèvements seront adaptées pour être optimale dans la collecte du phage.

Les échantillons de prélèvement obtenus sont analysés selon le protocole envisagé.

3.2. Prélèvement in-situ

En parallèle des essais au laboratoire, des prélèvements sont réalisés sur le terrain. Le choix du lieu de prélèvement a été défini sur la base de la probabilité de détecter le virus dans l'air. Les prélèvements sont réalisés dans une chambre d'hôpital occupé par une personne ayant contracté la maladie Covid-19 et ayant les symptômes, dont toux. Les prélèvements sont réalisés à l'aide du Coriolis μ de la société Bertin Technologies aux conditions optimales de collecte des virus (faut-il mettre des références des articles chinois/Bertin ?). Les échantillons obtenus sont analysés selon le protocole envisagé.

4. RESULTATS

4.1. Validation de la méthode en laboratoire

Un des premiers tests au sein du laboratoire a été de valider l'étape de prétraitement de l'échantillon pour concentrer les particules virales et améliorer le seuil de détection dans les prélèvements. Pour valider cette étape, une solution du plasmide contenant la séquence d'intérêt du virus SARS-CoV-2 a été filtrée via le kit Amicon Ultra-15 de Merck-Millipore. Une analyse par RT-PCR a ensuite été réalisée (cf. figure 2) : la courbe verte correspond à la solution du plasmide de départ, la courbe orange correspond à la solution de plasmide filtrée, la courbe rose correspond au liquide ayant traversé la colonne de filtration. Les résultats mettent en évidence un gain d'environ 2 cycles entre la solution filtrée et la solution non filtrée. Ils montrent également l'absence de réponse dans le reliquat de la filtration : les particules virales sont arrêtées sur le filtre et le gain de la filtration permet de gagner en sensibilité.

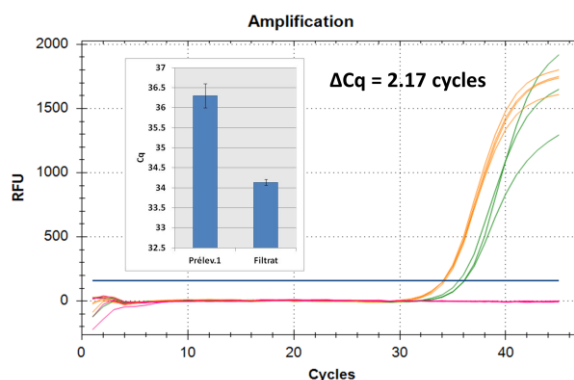


Figure 2. Comparaison des cycles de RT-PCR entre la solution de départ et la solution concentrée

Les travaux ont également été réalisés pour définir une gamme étalon avec le plasmide contenant la séquence d'ARN d'intérêt (cf. figure 3). Avec cette méthode, il est possible de descendre à environ 6 copies/ μ l = 30 copies par réaction.

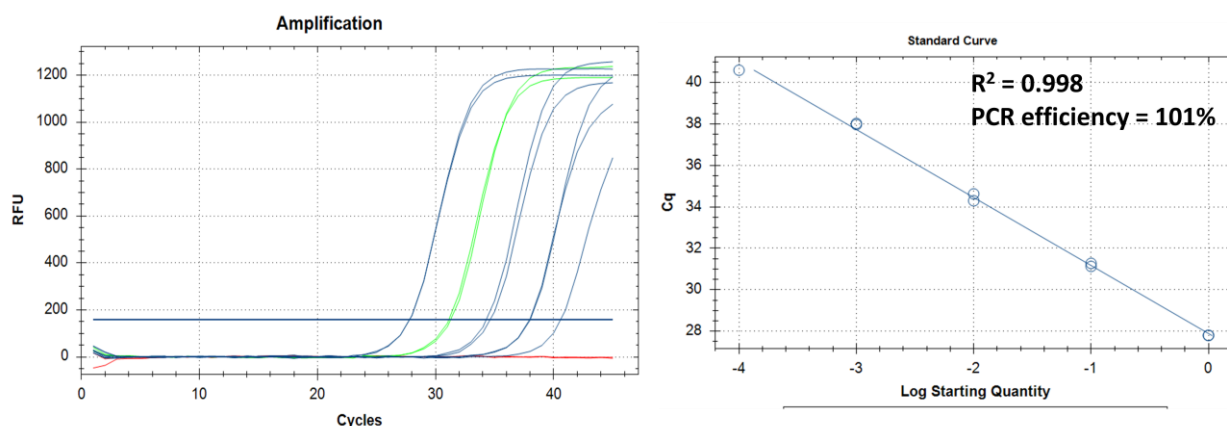


Figure 3. Gamme étalon du plasmide contenant la séquence d'ARN d'intérêt

4.2. Validation des tests en chambre d'essai et in-situ

Les essais sont en cours, et nous pourrions apporter des éléments d'information en fin d'année 2020.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Pour répondre à des demandes de client soucieux de connaître l'état sanitaire de leur environnement de travail, notre société a souhaité développer une méthode de détection du virus SARS-CoV-2 le plus robuste possible. La première étape a consisté à valider au laboratoire la possibilité de quantifier l'ARN du virus dans un échantillon liquide. Au vu du volume de prélèvement utilisé dans les méthodes actuelles, dont le Coriolis μ , une étape de concentration a été nécessaire, et permet de gagner en sensibilité sans perte de matériel génétique. Le choix de la méthode d'analyse par RT-PCR semble la plus pertinente aujourd'hui au regard du retour d'expérience et données scientifiques : la sélection des amorces et des protocoles d'essai a été réalisée sur la base d'un consensus international afin d'obtenir des données comparables si besoin.

Le projet en plusieurs étapes a permis de montrer la capacité de détecter le virus dans un échantillon liquide, même en faible quantité. Les travaux en cours en enceinte de laboratoire ou in-situ permettront de valider pleinement la méthode et de proposer une solution robuste et scientifiquement viable.

Des méthodes alternatives sont en cours d'évaluation pour compléter cette offre dont des méthodes de détection plus rapide et si possible sur le terrain pour effectuer des pré-évaluation de la qualité de l'air.

Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

Jie Zhou, Jonathan A. Otter, James R. Price, Cristina Cimpeanu, Danel Meno Garcia, James Kinross, Piers R Boshier, Sam Mason, Frances Bolt, Alison H. Holmes, Wendy S. Barclay. Investigating SARS-CoV-2 surface and air contamination in an acutehealthcare settingduring the peak of the COVID-19 pandemicin London Clinical Infectious Diseases <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa905>