

RAPPORT D'ESSAI

AVEC IONISEUR TEQOYA

CHAMP D'APPLICATION DES TRAVAUX

**Effet de l'ionisation sur les gouttelettes nébulisées contenant le virus Influenza
A/H1N1/ PR8**

DATE D'ÉMISSION

10/07/2020

Rapport d'essai

Effet de l'ionisation sur les gouttelettes nébulisées contenant le virus Influenza A/H1N1/ PR8

CONTEXTE ET MISE EN PLACE DE L'EXPÉRIENCE

La société Emersum et l'Université de Sapienza ont défini un protocole dans le but d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de l'eau.

sur le virus de la grippe A/H1N1/PR8 dans l'air.

Ce protocole a été basé sur plusieurs articles scientifiques de référence et défini indépendamment de TEQOYA.

Le modèle analysé pour tester l'ionisation est le Teqoya TIP4 en raison des contraintes de l'armoire de biosécurité utilisée en microbiologie pour tester le virus.

Organismes privés impliqués : Partenaire et promoteur de la recherche :

- Dr. Daniele Biscontini. Directeur de la technologie d'Emersum s.r.l., SIAVS, spécialiste de la qualité de l'air et innovateur www.emersum.eu ;

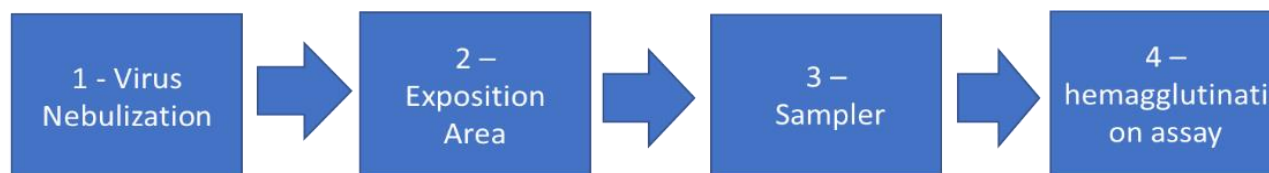
Institutions publiques de recherche et de médecine d'excellence :

- Coordinateur de la recherche : Marcello Vitale, Laboratoire de modélisation environnementale, Département de biologie environnementale de l'Université "Sapienza" de Rome ;
- Collaboration de recherche : Anna Teresa Palamara, professeur de microbiologie, département de santé publique et des maladies infectieuses de l'université "Sapienza" de Rome.

Entreprise et modèle de purificateur d'air évalués :

- Société : TEQOYA SAS, 7, route de Préchac - 33730 Villandraut - France ;
- Modèle : Teqoya TIP4 ;

SCHÉMA GÉNÉRAL DU PROTOCOLE



LISTE DES MATÉRIAUX

Le système expérimental, présenté ci-dessus et décrit ci-dessous, était inclus dans une enceinte de biosécurité certifiée de classe II (S@femate EZ 1.2 Euroclone) :

1. Nébuliseur de gouttelettes :

- a. nébuliseur avec un débit d'entrée de marque de 4 L/min et certains composants sont présentés dans la Figure
 1. La taille moyenne des gouttelettes était de 2,5 μm . Le diamètre aérodynamique médian des masses était de 2.95 μm . Profil de particules fines : Fraction respiratoire <5 μm : 74.7%. Débit du nébuliseur : 0.18 mL/min.
 - b. Liquide de brume : 1 ml de milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 contenant 10^{11} unités formatrices de plaques par ml (PFU/mL) de virus H1N1, 8 ml d'eau désionisée et 0,05 ml de solution PBS (Phosphate Buffered Saline).
 - c. Séchoir à air : Wilkerson X06-02-02 utilisé pour contrôler les valeurs d'humidité relative (RH) ;
2. Cube d'exposition à l'ionisation : l'ioniseur **modèle Teqoya TIP4** a été placé à l'intérieur d'un cube en polycarbonate de 40 25 25 cm^3 , dont l'alimentation peut être gérée à distance grâce à un système de télégestion Bluetooth pour la mise en marche et l'arrêt de tous les appareils ;
 - a. Capteur de taille de particule : Particule de 2,5 μm pour 0,1L d'air analysé, afin de vérifier la présence de gouttelettes de taille appropriée ;
 - b. Capteur d'humidité relative et de température ;
3. Échantillonneur : biosampler SKC à un débit de 12,5 L/min ;
4. Essai d'hémagglutination (HA) :
 - a. Test d'hémagglutination utilisant des globules rouges de poulet dilués dans du PBS.

Effet de l'ionisation sur les gouttelettes nébulisées contenant le virus Influenza

- b. Evaluation mathématique de l'effet d'ionisation :

Facteur de dilution = HA Pre/HA Post,

Réduction de la densité = $1 - (\text{HA Post} / \text{HA Pre})$.

Emersum a construit un système d'analyse de la performance des instruments de qualité de l'air. Contrairement aux systèmes normaux d'analyse des performances de la qualité de l'air, cet instrument n'a pas été préalablement fumigé avec un aérosol et, ensuite, l'étendue de la réduction des particules a été analysée.

Les conditions expérimentales prévoyaient un flux continu de nébulisation de gouttelettes contenant le virus de la grippe H1N1. Simultanément à la nébulisation, un flux contrôlé d'air sec était introduit à l'intérieur, afin de contrôler et de vérifier l'humidité relative interne. En outre, un mélangeur d'air continu, constitué d'un ventilateur en plastique, a été placé à l'intérieur du cube expérimental. Enfin, une pompe aspirait en continu l'air contenant le virus de la grippe dans un biosampler, où il se condensait au contact d'une solution de volume connu placée à l'intérieur.

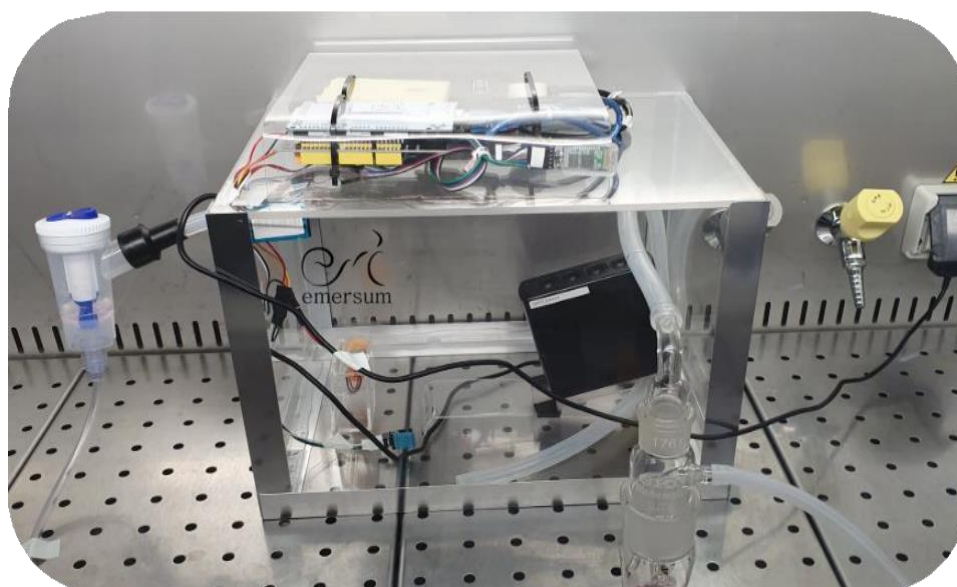


Figure 1 - Système expérimental : Nébulisation (à gauche), exposition (au centre), collecteur du biosampler (en bas)

MÉTHODES

La section suivante décrit les méthodologies utilisées pour l'évaluation de l'effet d'ionisation sur les particules virales nébulisées.

Paramètres expérimentaux : afin de recueillir une quantité suffisante de virus de la grippe, le système expérimental a fonctionné en deux cycles de 25 minutes chacun, où 8mL de solution contenant le virus ont été nébulisés dans le cube par cycle. Un cycle de contrôle avec l'ioniseur éteint a été effectué.

Le capteur du compteur de particules (PM), placé à l'intérieur du cube expérimental, a montré une concentration constante de particules de $2500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ pendant les cycles expérimentaux. Il est important de noter que cette concentration de PM doit être considérée comme très élevée, correspondant à des conditions expérimentales extrêmes par rapport aux valeurs de PM environnementales.

Effet de l'ionisation sur les gouttelettes nébulisées contenant le virus Influenza

L'exposition minimale de l'air mélangé aux ions générés par l'ioniseur a été fixée à 3 secondes, tandis qu'un maximum de 20 secondes a été considéré pour le flux d'entrée.

Effet de l'ionisation sur les gouttelettes nébulisées contenant le virus Influenza

Trois conditions ont été testées dans le schéma du protocole général :

- Avant et après la nébulisation, sans contrôle de l'HR, puis avec une HR stable à 90%, titre du virus dilué au 1:100 ;
- Avant et après nébulisation, sans contrôle de l'HR, puis avec une HR stable à 90%, virus non dilué ;
- Avant et après nébulisation, avec contrôle de l'HR, HR stable à 56%, virus non dilué

; Test de recouplement :

- Après la nébulisation, toutes les surfaces internes de la chambre du cube ont été échantillonnées à l'aide d'un coton-tige et dissoutes dans du milieu RPMI afin de recueillir éventuellement les particules virales sur les surfaces du cube (Figure 4) ;
- Deux boîtes de culture cellulaire de 35mm contenant 1mL de RPMI ont été placées dans le cube expérimental afin d'évaluer un éventuel dépôt viral sur le sol du cube (Figure 5) ;

Test d'hémagglutination

Le test d'hémagglutination a été réalisé pour évaluer l'effet de l'ionisation sur les particules virales. En effet, ce test est basé sur la capacité de la protéine hémagglutinante (HA), exposée sur l'enveloppe virale, à agglutiner les globules rouges de poulet (Figure 3a-b). Ce test est généralement utilisé pour estimer la quantité de particules virales (unité d'hémagglutinine, HAU) dans une solution et, dans ce cas, il permet d'évaluer l'inactivation potentielle de l'enveloppe virale après ionisation. Le test a été réalisé sur les solutions pré-nébulisées et post-nébulisées (biosampler) en présence et en l'absence d'ionisation contrôlée.

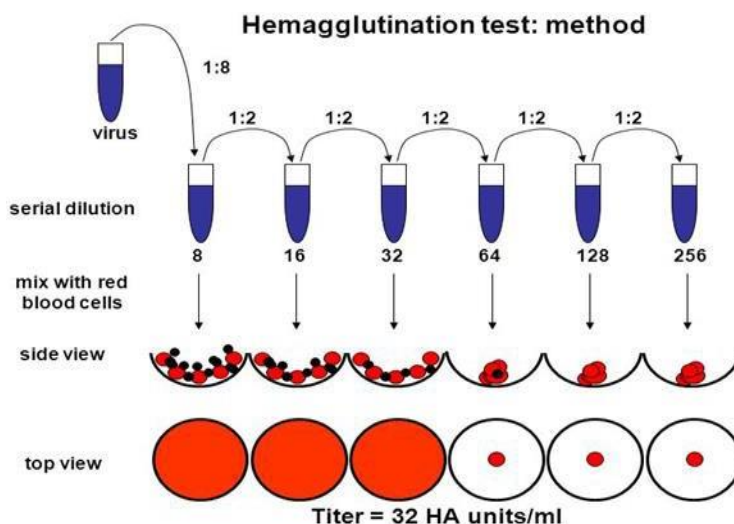


Figure 2a - Représentation schématique du test d'hémagglutination

RÉSULTATS

Après trois cycles de tests effectués à différentes concentrations initiales de virus et différentes valeurs d'humidité relative, l'ionisation contrôlée a réduit le titre viral, mesuré par HAU, d'environ 75 % (de 128 à 32 HAU, et de 256 à 64 HAU) par rapport au contrôle non ionisé.

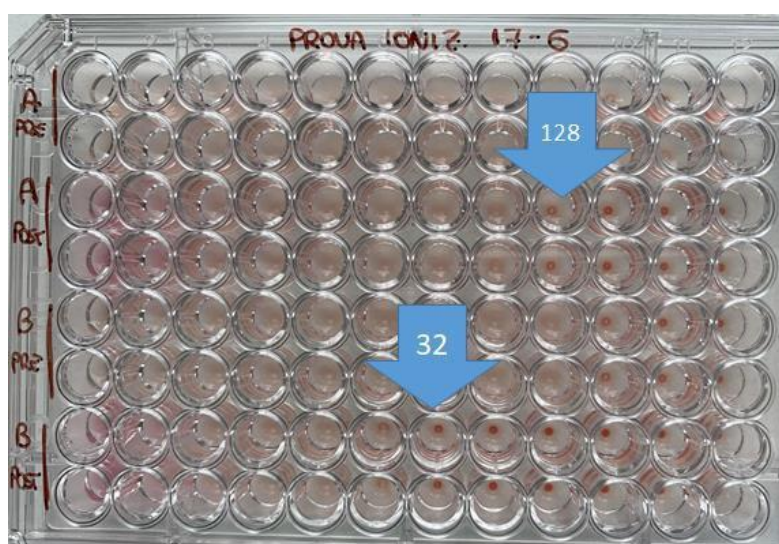


Figure 3b - Image représentative des résultats d'hémagglutination

Tableau 1 - paramètres environnementaux, concentrations initiales de virus et valeurs HAU mesurées dans les solutions prénébulisées et postnébulisées en présence et en l'absence d'ionisation.

Titre viral	Température moyenne	Avg. RH	Pré Nébul. Contrôle : Ioniseur OFF	POST Nebul. Contrôle : Ioniseur OFF	Pré Nébul. Test : Ioniseur ON	POST Nebul. Test : Ioniseur ON	Facteur de dilution	Réduction de la densité
1.310 ¹¹ PFU (dilué à 1:100)	27°C	90%	32	4	16	0	4	75-100%
1.310 ¹¹ PFU (non dilué)	27°C	90%	256	128	256	32	4	75%
1.310 ¹¹ PFU (non dilué)	28°C	56%	512	256	512	64	4	75%

Test de recouplement

Pour vérifier la possibilité d'un dépôt viral sur les surfaces du cube, un échantillonnage des surfaces internes à l'aide d'un coton-tige après chaque cycle et le placement de deux boîtes de culture cellulaire de 35 mm contenant 1 ml de RPMI pendant chaque cycle, ont été effectués. Les deux échantillonnages n'ont pas permis de détecter de HAU.

Effet de l'ionisation sur les gouttelettes nébulisées contenant le virus Influenza

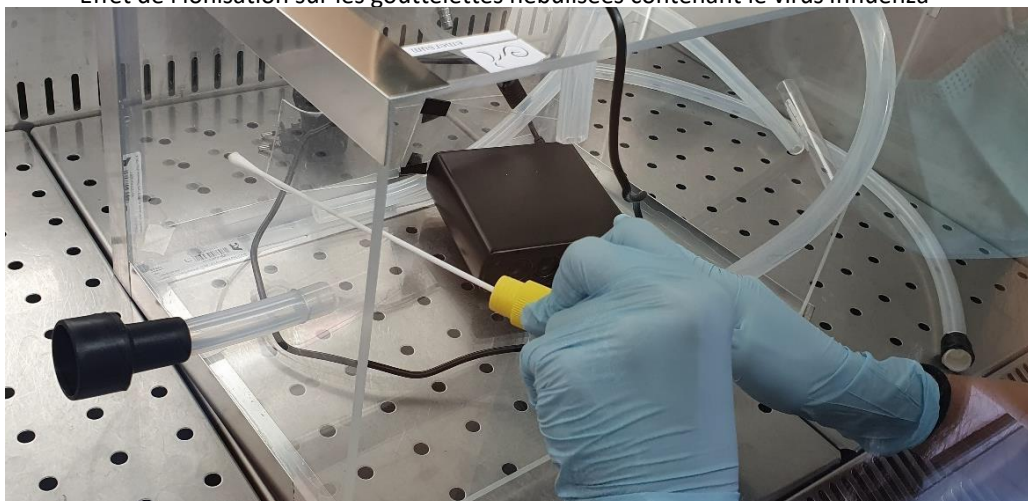


Figure 4 - Echantillonnage des surfaces internes du cube par écouvillonnage



Figure 5 - Positionnement de deux boîtes de culture cellulaire de 35 mm contenant 1 ml de RMPI pour évaluer l'éventuelle décantation virale pendant la nébulisation et l'ionisation.

Tableau 2 - paramètres environnementaux, concentrations initiales de virus et valeurs HAU mesurées dans les solutions prénébulisées et postnébulisées en présence et en l'absence d'ionisation.

Test	Température moyenne	Avg. RH	POST Nebul. Contrôle : Ioniseur OFF	POST Nebul. Test : Ioniseur ON	Facteur de dilution	Réduction de la densité
Coton-tige	28°C	56%	0	0	0	0
Plateaux 35mm	28°C	56%	0	0	0	0

CONCLUSIONS

Les résultats des expériences ont démontré une réduction des HAU d'environ 75%, dans les séries d'échantillonnage soumises à l'ionisation contrôlée, suggérant ainsi une diminution des gouttelettes contenant des virus.

La réduction observée des HAU pourrait être expliquée par les hypothèses suivantes :

- A. le virus a été endommagé au niveau de la structure de l'enveloppe ;
- B. le virus a été complètement détruit ;
- C. les particules virales adhéraient à la surface des cubes et ne pouvaient pas être collectées dans le passeur d'échantillons biologiques.

Pour évaluer l'hypothèse C, un test de vérification croisée a été effectué en échantillonnant les surfaces internes du cube. Comme aucun HAU n'a été obtenu par le test de recoupement, les hypothèses suivantes sont suggérées :

- une quantité insuffisante de particules virales récupérées pour la détection des HAU ;
- une absence de particules virales adhérentes sur les surfaces internes du cube ;
- Les particules virales adhérentes ont été structurellement modifiées ou détruites.

En conclusion, un rôle actif de l'ionisation contrôlée sur la réduction des particules virales du virus de la grippe H1N1 a été démontré.

D'autres analyses et essais expérimentaux devraient être réalisés afin de caractériser également la réduction de la capacité infectieuse du virus et/ou sa destruction structurelle et fonctionnelle dans les gouttelettes aéropartées et sur les surfaces.

Le responsable scientifique et le coordinateur des essais expérimentaux

Prof. Marcello Vitale

