



**Rapport de test d'efficacité
sur le système Beewair BW60L
et sa capacité à décontaminer des espaces confinés
contenant le Coronavirus MERS humain**



Hôpitaux de Lyon

1. Avant-propos

VirNext est la plateforme de recherche technologique du **laboratoire VirPath**, qui héberge le **centre national de référence Français pour les virus grippaux et respiratoires**, ainsi que le **Centre national de Référence des virus Influenzae (CNR) de l'OMS**. VirNext est spécialisé dans l'évaluation des technologies physiques, chimiques et biologiques qui visent à décontaminer l'air intérieur, les surfaces et l'eau.

La société Beewair a demandé au **laboratoire VirPath** et à sa plateforme **VirNext** d'évaluer l'efficacité d'un système d'épuration d'air développé par Beewair en vue de décontaminer les espaces contenant le coronavirus humain du Syndrome Respiratoire du Moyen Orient (**MERS-CoV**). Cette évaluation a été réalisée en coordination avec le Pr. Sylvie van der Werf, Chef du Laboratoire Génétique moléculaire des virus à ARN (GMVR) à l'Institut Pasteur de Paris.

Demandeur :

Beewair

3 Allée de la Teppe

71850 Charnay Les Mâcon, France

Contact : Dr. Pierre-Alexandre Deveau

Laboratoire de tests :

Laboratoire VirPath

Plateforme VirNext

Faculté de médecine RTH Laennec 2ème étage,

7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France

Contact : Dr. Vincent Moulès



2. Méthodologie

L'expérimentation a constitué en l'évaluation des capacités du système développé par la société Beewair à décontaminer un espace confiné contenant des microorganismes. Cet espace confiné a été matérialisé par une chambre de nébulisation de 1,7m³ dans laquelle une atmosphère artificielle contenant des microorganismes a pu être générée avec une bonne reproductibilité. Ces atmosphères contaminées sont obtenues par nébulisation de solutions de concentré viral.

Les échantillons de test ont été collectés par aspiration du volume total de la chambre en utilisant un mouvement cyclonique (Coriolis, Technologies Beltin). L'isolat clinique MERS-CoV (ref 201327C2-2 / 12/13) a été obtenu de l'Institut Pasteur (Prof. Sylvie van der Werf, GMVR) (1). Tous les protocoles utilisés pour cette expérimentation pour les cultures cellulaires, infections, amplifications virales et titrations ont été établis et référencés par l'Institut Pasteur (2).

Durant l'étape de collecte, les virus recueillis ont été remis en suspension dans un tampon collecteur contenant un milieu de culture cellulaire. Afin d'obtenir des doses UV en accord avec les caractéristiques techniques du système de décontamination de l'air à tester, des lampes à UV ont été allumées 10 minutes avant chaque étape de décontamination, en l'absence du fonctionnement des ventilateurs intégrés.

3. Evaluation de l'efficacité du système Beewair

3.1 Conditions expérimentales

Date : 7 Juillet 2014

Température : 20°C

Flux du système Beewair : 60 m³/h

Le système Beewair BW60L de décontamination et de traitement de l'air est composé d'un réacteur tangentiel intégrant des modules DBD-Lyse© incluant une puissance globale d'irradiation de 70 Watts (UVc 254 nm) et une capacité moyenne d'oxydation/minéralisation de 80 000 TeraRad.



Temps de fonctionnement :

Le temps de fonctionnement du système a été défini de manière à évaluer l'efficacité de décontamination d'un espace confiné après passage de 3 chambres de volumes (5.1 m³, 306 secondes), de 8 chambres de volumes (13,6 m³, 816 secondes) et de 12 chambres de volumes (20,4 m³, 1224 secondes).

Étape de nébulisation :

L'atmosphère artificielle contenant le MERS CoV a été générée par 5 nébuliseurs de collision (NSF 6 jet CN25, BGI USA) (Air pressure 1.7 bars, 24.6 psig) durant 15 minutes correspondant au nombre moyen de virus 2.6E7 TCID₅₀ par atmosphère. La valeur MMD (diamètre médian massique) théorique de l'aérosol est de 1,9 µm.

Nombre d'échantillons : 18**Concentration du stock de solution virale : MERS CoV : 10^{7.3} TCID₅₀/mL**

Le stock viral a été généré après 2 amplifications virales en cellules de reins artificiels (Vero E6, ATCC CRL-1586), en glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium à 4.5g/L (LONZA Ref BE 12-614F) avec ajout de sérum de fœtus de veau à 2%, de glutamine-L 2mM (Sigma-Aldrich), de pénicilline (225U/mL, Cambrex Biosciences) et de streptomycine (225ug/mL, Cambrex Biosciences), comme décrit précédemment (3). Les cellules Vero E6 ont été infectées en multiplicité d'infection (MOI) de 5 et les surnageants de cellules ont été récoltés 48 heures après l'infection.

Paramètres de collecte : les virus ont été collectés durant 7 minutes (200 L/minute) en 7 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium à 4.5g/L (LONZA Ref BE 12-614F) avec ajout de sérum de fœtus de veau à 2%, de glutamine-L 2mM (Sigma-Aldrich), de pénicilline (225U/mL, Cambrex Biosciences) et de streptomycine (225ug/mL, Cambrex Biosciences).



Hôpitaux de Lyon

Méthode d'évaluation :

Les titres viraux infectieux ont été déterminés par dosage de fin de point de titration, selon le protocole établi par l'Institut Pasteur (2). En résumé, 50uL de 10 dilutions en série de chaque échantillon ont été inoculés en quatre répliques de puits de cellules Vero E6 élevées en micro plaques à 96 puits, incubés à 37°C 5% CO₂.

La présence d'effet cytopathique a été surveillée 72 heures après l'infection. Les titres viraux infectieux (TCID₅₀/50uL) ont ensuite été déterminés avec la méthode statistique Reed & Munch (4).

Bibliographie :

- (1) Guery S, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, Vuotto F, Goffard A, Behilil S, Enouf V, Caro V, Mailles A, Che D, Manuguerra JC, Mathieu D, Fontanet A, van der Werf S; MERS-CoV study group. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet*. 2013 Jun 29; 381(9885): 2265-72.
- (2) SOPs GMVR unit Institut Pasteur : « Inoculation des coronavirus sur cellules Vero E6 » - version du 03/04/2014 ;
« Titrage TCID₅₀ » - version du 04/10/2014
- (3) de Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, Bestebroer TM, van Nieuwkoop S, Limpens RW, Posthuma CC, van der Meer Y, Barcena M, Haagmans BL, Snijder EJ, van den Hoogen BG. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J Gen Virol*. 2013 Aug ; 94(Pt 8): 1749-60.
- (4) Reed. L.J.: Muench. H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am. J. Epidemiol.* (1938) 27 (3): 493- 497



Hôpitaux de Lyon

3.2 Résultats:

Nombre de volumes chambre	Concentration virale (TCIDS0/50µl)					
	Titre	Mean (Moyenne)	SD (Ecart Type)	Log titre Mean ± SD	Facteur inactivation	Efficacité (%)
3	1,00E+05 1,00E+05 3,16E+04	7.72E+04	3.95E+04	4.83 ± 0.28	2.00 ± 0.00	99.99 %
3	1,00E+03 3,16E+02 1,00E+03	7.72E+02	3.95E+02	2.83 ± 0.28		
8	2,00E+04 5,01E+04 3,16E+04	3.39E+04	1.52E+04	4.50 ± 0.20	3.40 ± 0.03	99.99 %
8	1,00E+01 1,00E+01 2,00E+01	1.33E+01	5.77E+00	1.10 ± 0.17		
12	1,00E+04 5,01E+03 1,00E+04	8.34E .03	2.88E+03	3.90 ± 0.17	> 3.90 ± 0.17	> 99.99%
12	1,00E+00 1,00E+00 1,00E+00	< 1.00E+00	0.00E+00	< 0.00		



Comme indiqué dans le tableau ci-dessus, les titres infectieux de MERS-CoV ont été réduits de manière significative suite à leur passage au travers du système Beewair.

Réduction des titres viraux exprimés en tant que Log TCID₅₀/50µl comme suit :

- 2.00 ± 0.00 Log pour un temps de fonctionnement de 306 s (5,1m³)
- 3.40 ± 0.03 Log pour un temps de fonctionnement de 816 s (13,6 m³)
- 3.90 ± 0.17 Log pour un temps de fonctionnement de 1244 s (20.4 m³)

4. Conclusion

Le système BW60L développé par la société Beewair conduit à l'inactivation effective du virus humain MERS-CoV en espace confiné avec une efficacité de 99,99% du titre viral par un facteur 100 lors du passage de 3 chambres de volumes d'air, jusqu'à presque 10⁴ pour 12 volumes d'air.



Hôpitaux de Lyon

Lyon le 24 Juillet 2014,

Dr Vincent Moulès

Responsable de la plateforme technologique VirNext, Laboratoire VirPath



Dr Manuel Rosa-Calatrava

Directeur Adjoint du Laboratoire VirPath, Université Claude Bernard Lyon 1



Pr Sylvie van der Werf

Chef du Laboratoire Génétique moléculaire des virus à ARN (GMVR), Institut Pasteur, Paris

