

Direction de la Recherche Fondamentale
Département Médicaments et technologies pour la Santé
Service de Pharmacocinétique et d'Immunoanalyse
Laboratoire Innovations Technologiques pour la Détection et le Diagnostic

24/02/2021

RAPPORT D'ETUDE

EVALUATION DE L'INACTIVATION DU VIRUS SARS-CoV2 PAR LA LAMPE BIOVITAE®

A l'attention de :
NEXTSENSE S.r.l.

Via della Rotonda, 36
00186 Roma, Italie



1 – OBJET

L'objectif de la présente étude est l'évaluation de l'impact la lampe Biovitae® sur la survie du virus SARS-CoV2 infectieux séché sur une surface plastique.

2 – MISE EN PLACE

L'étude a été réalisée par le CEA/Li2D dans son laboratoire de haute sécurité biologique P3 en utilisant un lot de virus infectieux purifié, préalablement préparé et quantifié par la méthode des plages de lyse (voir protocole joint en annexe).



Fig 1 : Lampe Biovitae®

Le dispositif d'illumination Biovitae® fourni par Nextsense S.r.l. a été installé dans un poste de sécurité biologique de type II (PSM II, HERASAFE® KS12) sans en perturber le fonctionnement à une hauteur de 53 cm du plan de travail.



Fig 2 : Lampe Biovitae installée dans un PSM II du laboratoire P3 avec une hauteur de 53 cm du plan de travail où seront disposés les échantillons de virus.

Des essais préliminaires ont été conduits (08/01/2021) pour définir les paramètres optimaux de réalisation des essais notamment sur les points suivants :

- Mode de préparation du virus
- Milieu de dilution de la suspension virale
- Temps de séchage des gouttelettes de virus dans les plaques
- Gamme des temps de traitement à utiliser

3 – LOT DE VIRUS UTILISE

La souche virale SARS-CoV2 utilisée est la suivante : **2019-nCov/Italy-INMI1**.

Le virus infectieux est produit par infection de cellules VERO-E6 (ATCC CRL-1586) en culture dans des flasks T150 (NUNC™) en milieu DMEM + 5 % de sérum de veau fœtal (SVF), avec une multiplicité d'infection de 0.001. Après incubation 72 heures à 37°C sous 9 % de CO₂, le surnageant de culture est récolté et clarifié par centrifugation.

Le virus est ensuite purifié par ultracentrifugation sur un gradient de sucrose (saccharose) puis concentré par ultracentrifugation et remis en suspension dans un tampon salin TNE (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) additionné de 0.3 g/L de sérum albumine bovine (BSA) en accord avec la norme NF EN 14476+A2 2019.

Le lot de virus utilisé dans l'étude a été titré à **2.15 10⁷ PFU/mL** (*particules infectieuses par mL*).

4 – DEPOT ET SECHAGE DU VIRUS

La suspension virale est diluée à 1.10⁵ PFU/mL en tampon salin TNE + BSA 0,03 % et déposée dans des plaques 6 puits stériles en polystyrène (COSTAR™) sous un volume total de 100 µL par puits (donc 10⁴ PFU/puits avant séchage) en 20 gouttelettes de 5 µL. Deux puits (sur la colonne du milieu) de chaque plaque utilisée reçoivent la suspension virale et seront illuminés simultanément par la lampe Biovitae® constituant ainsi des duplicats. Après le dépôt, les gouttelettes sont séchées pendant 1 heure dans le flux d'air du PSM II. Les essais d'irradiation sont conduits immédiatement après cette phase de séchage après avoir remis le couvercle des boîtes afin de protéger le virus du flux d'air et de n'avoir que l'effet de la lampe.

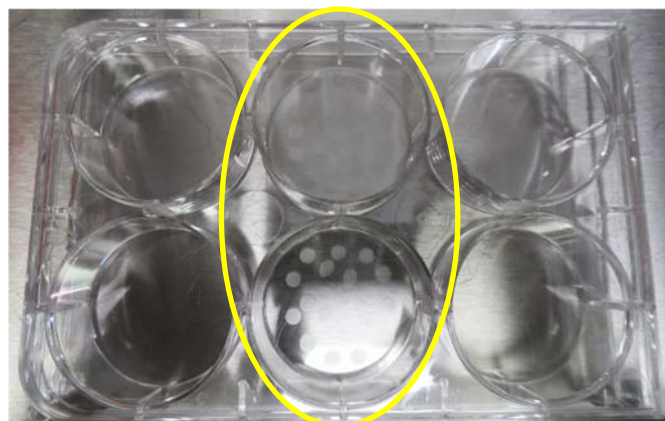


Fig 3 : Gouttelettes de 5 µL de suspension virale séchées en plaque 6 puits.

5 – EVALUATION DE LA LAMPE BIOVITAE®

5.1 - Conditions de l'essai n°1

Date : 01/02/2021
Température : 21°C
Hygrométrie : 26.1 %
Distance lampe/échantillon : 53 cm
Milieu utilisé pour le virus : Tampon TNE (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,4) + 0.3 g/L BSA

Des plaques « **contrôle** » contenant du virus séché, sont testées en parallèle sous un éclairage « contrôle » constitué par l'éclairage équipant en série le poste de sécurité biologique composé de 2 tubes fluorescents OSRAM L 30W/840 de 895 mm de long, délivrant une lumière de température 4000K.

La distribution lumineuse de cet éclairage contrôle est la suivante :

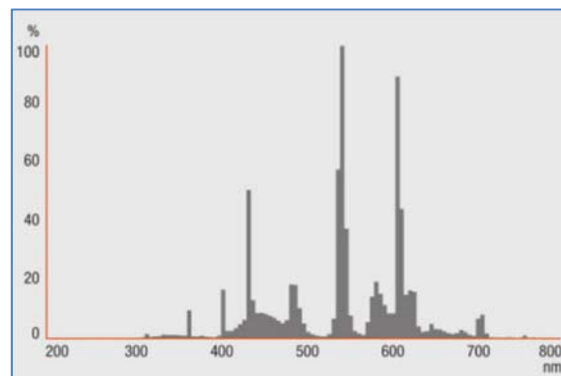


Fig 4 : Distribution lumineuse de l'éclairage contrôle utilisé (Source : OSRAM)

Toutes les plaques « **test** » sont illuminées uniquement avec la lampe Biovitae® placée à 53 cm au-dessus des échantillons de virus séché (l'éclairage fluorescent du PSM étant éteint).

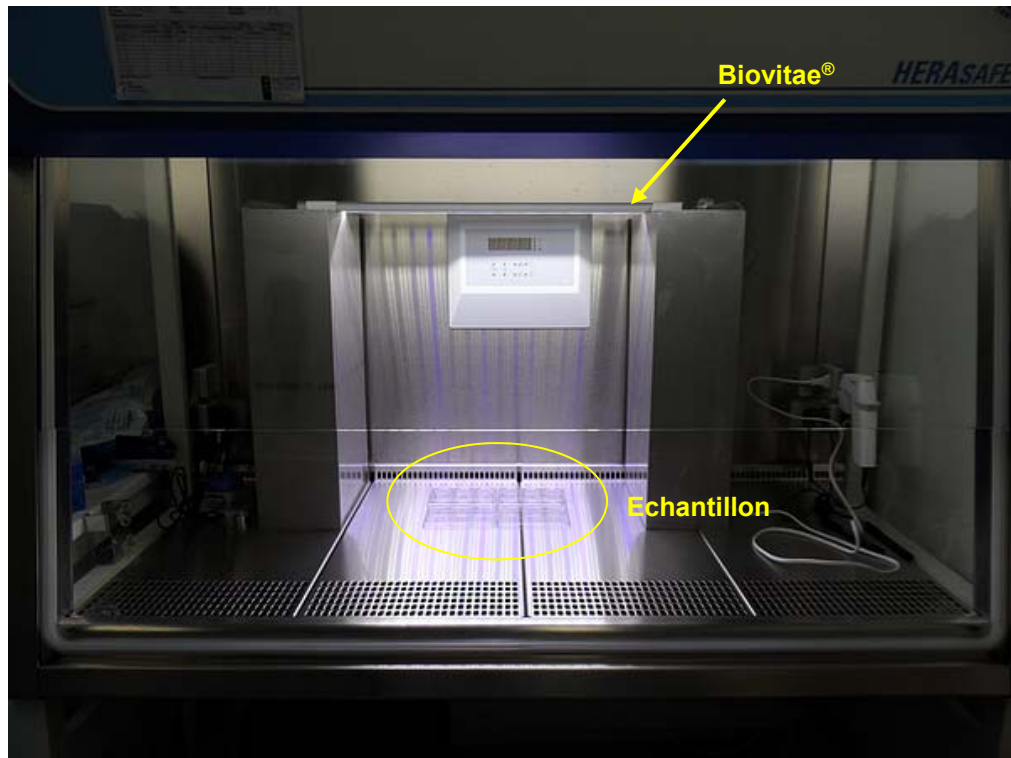


Fig 5 : Echantillons viraux séchés placés sous la lampe Biovitae® sous un poste de sécurité biologique.

Tableau récapitulatif des conditions utilisées :

Plaque	Lampe	Qté virus avant séchage	Milieu de dilution du virus	Temps d'illumination
Contrôle 0		10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	0
Contrôle 1	2 tubes fluorescents	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	30'
Contrôle 2	2 tubes fluorescents	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	60'
Contrôle 3	2 tubes fluorescents	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	90'
Test 1	Biovitae®	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	30'
Test 2	Biovitae®	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	60'
Test 3	Biovitae®	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	90'

Après traitement, 1,2 mL de milieu de culture DMEM + 2.5 % de sérum de veau fœtal (SVF) sont ajoutés dans chaque puits contenant du virus séché (plaque contrôle et plaques tests) afin de remettre en suspension les particules virales.

Chaque suspension virale est ensuite titrée selon le protocole suivant :

La suspension virale est titrée en plaque 12 puits sur cellules VERO-E6 en doublet et la révélation est réalisée en crystal violet après 3 jours d'incubation.

Vingt-quatre heures avant la titration, des plaques 12 puits sontensemencées avec 3.10⁶ cellules VERO-E6 par plaque en milieu de culture DMEM + 5 % SVF. Les plaques sont incubées une nuit à 37°C sous 9 % de CO₂.

- Des dilutions sérieées du virus sont réalisées de 10⁻¹ à 10⁻⁸ (ou autres dilutions adaptées) en milieu de culture DMEM + 2,5 % SVF.

- Deux puits « contrôles négatifs » contenant uniquement du milieu de culture sont également réalisés.
- Le milieu de culture est enlevé puis 500 µL de chaque dilution sont distribués dans chaque puits (en duplicat).
- Les plaques sont incubées, pour cette phase d'infection, pendant 45 minutes à 37°C sous 9 % de CO₂.
- Après 45 min d'incubation, 2 mL d'un mélange volume à volume de carboxyméthyl cellulose et de milieu de culture DMEM + 10 % SVF sont distribués dans chaque puits
- Les plaques sont incubées pendant 3 jours à 37°C sous 9 % de CO₂.
- Le milieu est éliminé de chaque puits.
- 500 µL de crystal violet sont distribués dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à température ambiante.
- Le crystal violet est éliminé et un lavage est réalisé avec un tampon phosphate salin (PBS) pH 7.4.
- Le PBS est éliminé et les plages de lyse sont comptées.

Le titre viral est calculé et exprimé en « *Plaque-forming units* ».

5.2 Résultats de l'essai n°1

Les résultats obtenus après traitement à différents temps d'illumination avec la lampe Biovitae® du virus SARS-CoV2 séché sur la surface des boîtes 6 puits stériles sont les suivants :

Time (min)	Control fluorescent lighting (pfu)	Biovitae (pfu)
0	2490	2490.0
30	771	119.0
60	172	6.3
90	100	1.5

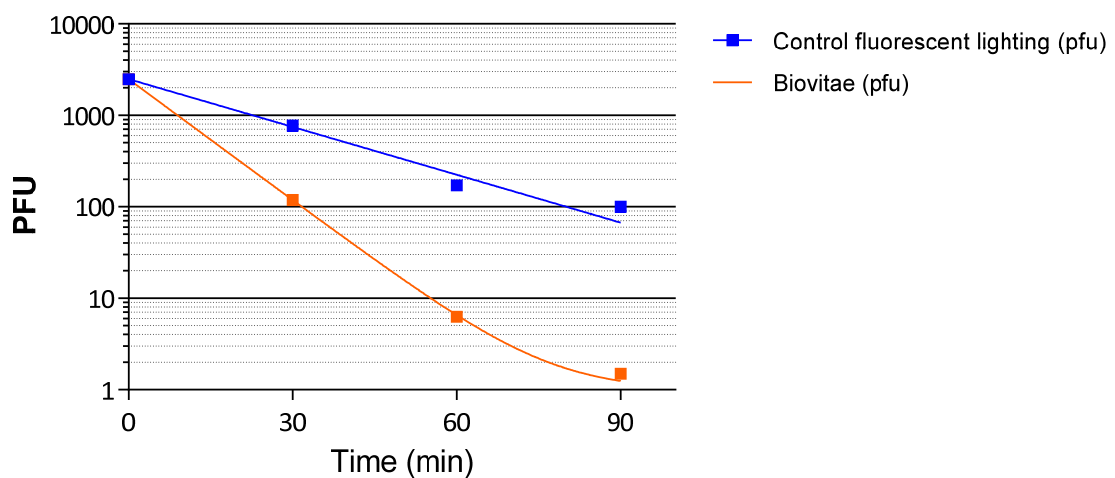


Fig 6 : Evolution du nombre de particules infectieuses (PFU) résiduelles après illumination à différents temps avec la lampe Biovitae® et avec l'éclairage contrôle.

Time (min)	Control fluorescent lighting (pfu)	Biovitae (pfu)
0	0.00	0.00
30	0.51	1.32
60	1.16	2.60
90	1.40	3.22

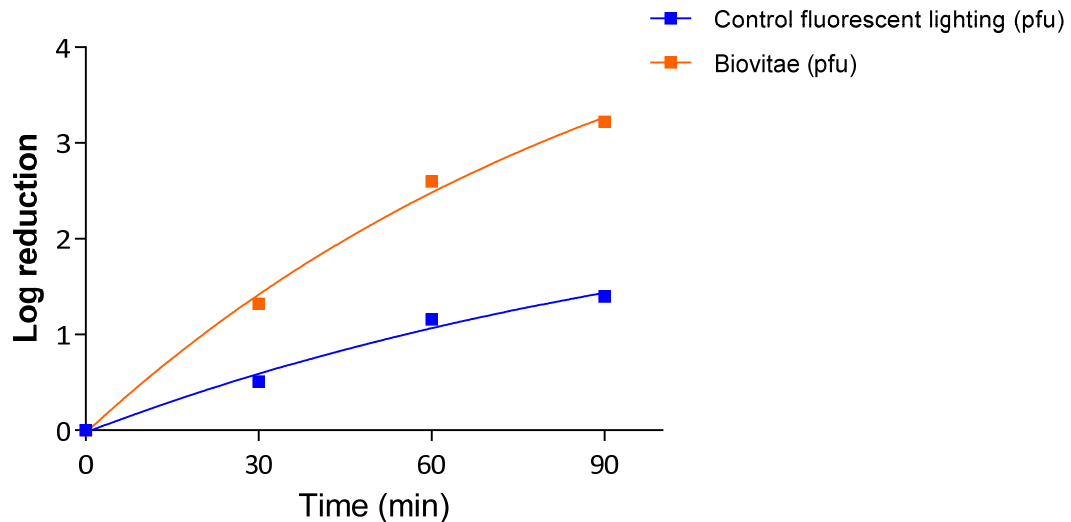


Fig 7 : Réduction logarithmique du nombre de particules infectieuses (PFU) résiduelles après illumination avec la lampe Biovitae® et l'éclairage contrôle à différents temps.

5.3 Conditions de l'essai n°2

Date : 09/02/2021
Température : 21°C
Hygrométrie : 51 %
Distance lampe/échantillon : 53 cm
Milieu utilisé pour le virus : Tampon TNE (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, pH 7,4) + 0.3 g/L BSA

Des plaques « **contrôle** » contenant du virus séché, sont testées en parallèle sous l'éclairage fluorescent du poste de sécurité biologique constitué de 2 tubes OSRAM L 30W/840 (voir détails § 5.1).

Toutes les plaques « **test** » sont illuminées uniquement avec la lampe Biovitae® placée à 53 cm au-dessus des échantillons de virus séché.

Les conditions d'illumination ont été **identiques** à celle de l'essai n°1.

Tableau récapitulatif des conditions utilisées :

Plaque	Lampe	Qté virus avant séchage	Milieu de dilution du virus	Temps d'illumination
Contrôle 0		10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	0
Contrôle 1	2 tubes fluorescents	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	30'
Contrôle 2	2 tubes fluorescents	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	60'
Contrôle 3	2 tubes fluorescents	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	90'
Test 1	Biovitae®	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	30'
Test 2	Biovitae®	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	60'
Test 3	Biovitae®	10 ⁴ PFU	TNE + 0.03% BSA	90'

Le traitement des échantillons et la titration virale ont été identiques à celles de l'essai n°1 (voir 5.1).

5.4 Résultats de l'essai n°2

Les résultats obtenus pour cet essai n°2 après traitement à différents temps d'illumination avec la lampe Biovitae® sont les suivants :

Time (min)	Control fluorescent lighting (pfu)	Biovitae (pfu)
0	1950.0	1950.0
30	266.0	111.0
60	71.1	1.2
90	22.5	0.3

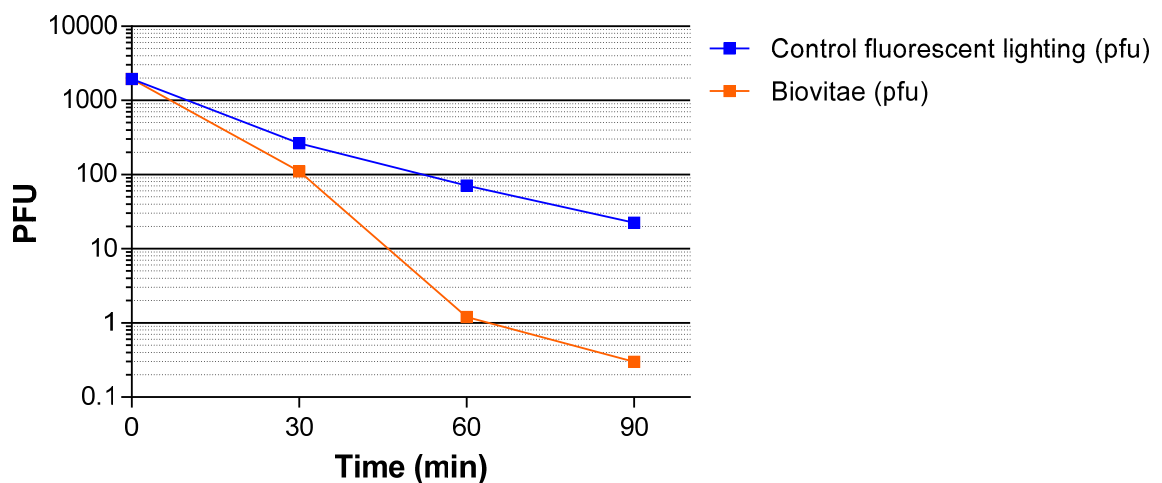


Fig 8 : Evolution du nombre de particules infectieuses (PFU) résiduelles après illumination à différents temps avec la lampe Biovitae® et l'éclairage contrôle.

Time (min)	Control fluorescent lighting (pfu)	Biovitae (pfu)
0	0.00	0.00
30	0.87	1.24
60	1.44	3.21
90	1.94	3.81

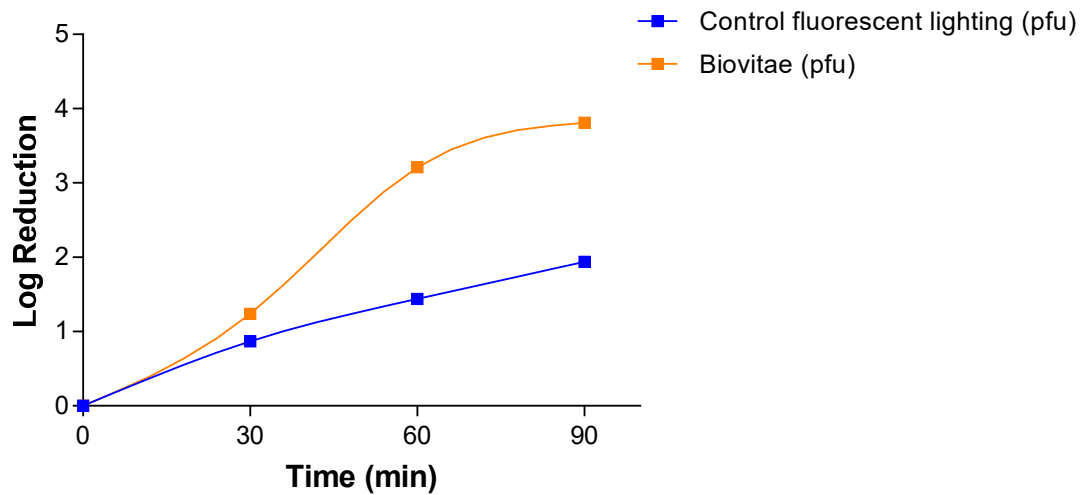


Fig 9 : Réduction logarithmique du nombre de particules infectieuses (PFU) résiduelles après illumination avec la lampe Biovitae® et l'éclairage contrôle à différents temps.

7 – CONCLUSION DE L'ETUDE

L'évaluation a été réalisée dans notre laboratoire P3 sous un poste de sécurité biologique. Elle a été conduite en comparant l'effet d'un éclairage « contrôle » (tubes fluorescents équipant en série le poste de sécurité biologique) avec l'effet de la lampe Biovitae® placée à 53 cm des échantillons viraux.

En moyenne et dans les conditions du test, il est noté une réduction logarithmique moyenne de 2.21 ± 0.40 fois plus importante avec une lampe Biovitae® que pour l'éclairage contrôle. Pour les différents temps testés, 30, 60 et 90 minutes, ce facteur est respectivement de 2.1 ± 0.82 , 2.24 ± 0.01 et 2.13 ± 0.24 .

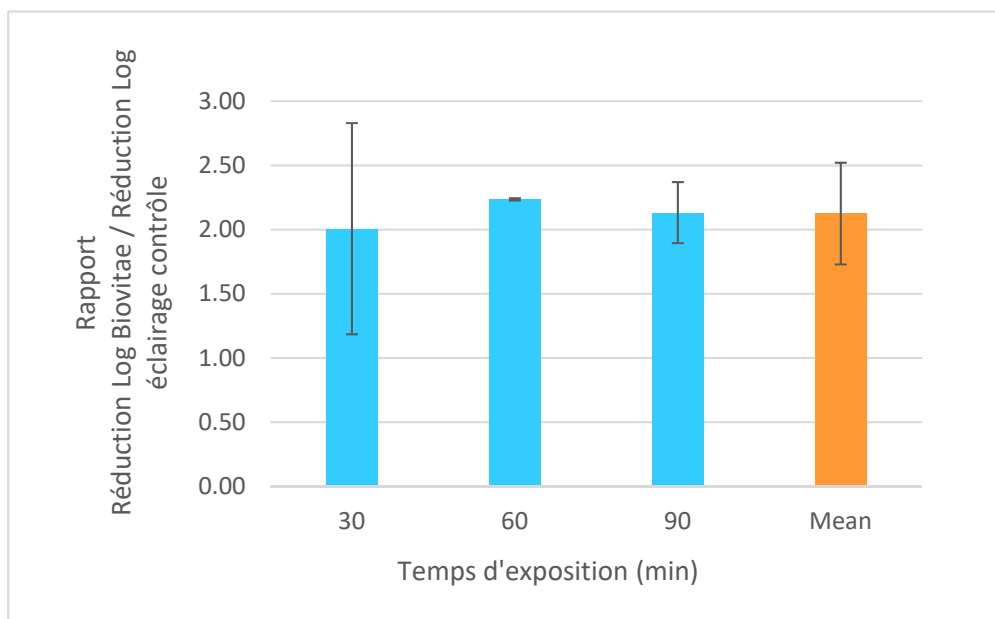


Fig 10 : Rapport de la réduction logarithmique mesurée avec Biovitae sur celle observée avec l'éclairage contrôle pour les différents temps testés (barres bleues) et en moyenne sur tous les temps (barre orange).

La diminution observée dans les conditions "contrôle" doit être considérée comme la diminution "naturelle" de l'infectivité du virus séché. Cette étude montre que l'irradiation lumineuse du SARS-CoV2 séché sur une surface plastique (polystyrène) avec la lampe Biovitae® accélère la perte d'infectivité par rapport à la même préparation virale placée dans les conditions témoins. La réduction logarithmique du nombre de particules virales infectieuses est en moyenne multipliée par un facteur d'environ deux avec la lampe Biovitae® dans les conditions de nos tests.

Rédacteur :
Laurent BELLANGER