

# Effacité de l'ozone gazeux pour le contrôle de phages aérosolisés

Rapport de projet

Rédigé par

Marie-Eve Dubuis

Marc Veillette

Caroline Duchaine

5 septembre 2017

Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec -  
Université Laval

EMO3



CENTRE DE RECHERCHE  
INSTITUT UNIVERSITAIRE  
DE CARDIOLOGIE  
ET DE PNEUMOLOGIE  
DE QUÉBEC



UNIVERSITÉ  
LAVAL



Table des matières

Introduction..... 3

Objectifs ..... 3

Méthodologie..... 3

Résultats..... 4

    PhiX174..... 5

    PR772..... 6

    MS2..... 7

    Phi 6..... 7

Conclusions et perspectives ..... 8

## Introduction

Les infections nosocomiales sont des infections acquises en milieu hospitalier qui peuvent être transmises aux usagers, aux membres du personnel et aux visiteurs. Le principal moyen de limiter ces infections est d'isoler les patients et ainsi de diminuer les contacts directs entre les personnes. En moyenne, ces infections peuvent prolonger la durée de séjour des patients d'environ 2 semaines et faire doubler les coûts d'hospitalisation (Chen *et al.* 2009). Pour plusieurs infections (grippe, rhume, varicelle), la transmission aérienne via des bioaérosols est reconnue et possible, ce qui les rend difficiles à contrôler. Encore aujourd'hui, le processus de transmission aérienne de plusieurs maladies reste mal défini. La plupart du temps, ce sont des modèles mathématiques épidémiologiques qui établissent de manière indirecte les preuves de transmission par aérosols (Marks *et al.* 2003; Yu *et al.* 2004).

Il a été démontré que certains virus, tel le Norovirus, résistent aux stress de l'aérosolisation et conservent plus de 80% de leur potentiel infectieux (Bonifait *et al.* 2015). Il a également été démontré que l'infectivité de bactériophages (virus de bactéries utilisés comme modèles de virus humains) (Verreault *et al.* 2008) pouvait être modulée en fonction de la température et de l'humidité relative (HR) ambiante (Verreault *et al.* 2015). Finalement, l'utilisation de plusieurs phages s'avère nécessaire lors de la démonstration de l'effectivité de traitements germicides (Turgeon *et al.* 2016).

Dans le cas des centres de soins, les chambres et le mobilier sont souvent désinfectés alors que l'air ambiant ne subit aucune procédure d'assainissement, ce qui n'empêche pas la transmission des infections. Notre équipe a d'ailleurs documenté la présence de grandes concentrations de Norovirus dans l'air des centres de soins lors d'éclotions de gastroentérites (Bonifait *et al.* 2015).

## Objectifs

Les objectifs de ce projet d'Engagement partenarial CRSNG-EMO3 sont

- Mettre au point le système d'aérosolisation en chambre rotative pour l'exposition à l'ozone gazeux avec des bactériophages
- Déterminer l'effet de l'ozone gazeux sur l'infectivité des bactériophages après divers temps de contact en aérosols, diverses humidités relatives et diverses températures

## Méthodologie

Quatre bactériophages (ou phages) modèles (Phi6, PhiX174, PR772 et MS2) ont été sélectionnés pour le projet étant donné qu'ils possèdent une structure et du matériel génétique (ADN et ARN) s'apparentant aux virus humains. De plus, ils ne présentent pas de risques infectieux pour les

expérimentateurs, ce qui permet de construire le modèle de façon sécuritaire avant de passer aux virus de la gastroentérite (Norovirus), de la grippe (Influenza) et du rhume (Rhinovirus).

Les phages ont été aérosolisés en même temps dans une chambre environnementale rotative. Les humidités relatives testées étaient de 20%, 55% et de 85%. Une période de 10 minutes a été allouée pour la stabilisation des aérosols avant de les exposer à une concentration de  $1,13 \pm 0,26$  ppm d'ozone. L'ozone a été produit par un générateur fourni par la compagnie EMO3. Les aérosols ont été récupérés à l'aide d'un échantillonneur après des temps d'exposition de 0, 30 ou 60 minutes. Le dénombrement des phages infectieux a été réalisé sur milieu de culture alors que le matériel génétique a été quantifié avec une approche de biologie moléculaire (qPCR).

## Résultats

Les résultats sont présentés sous forme de graphiques comparatifs pour chaque phage. Chaque paire de graphiques (Figures 1 à 4) montre les résultats obtenus pour chaque phage aux trois humidités testées, soit 20%, 55% et 85%.

Les graphiques de gauche présentent les **ratios infectieux** obtenus après exposition à l'oxygène, qui est le contrôle ou la condition de base. Ceci montre donc la viabilité des phages après leur aérosolisation, leur maturation et leur échantillonnage.

Les ratios infectieux sont une façon de présenter les résultats lorsqu'on utilise une méthode de culture et une méthode de détection du matériel génétique, la qPCR pour le présent projet. Un phage est infectieux si on dénombre des plages de lyse sur milieu de culture. La qPCR, quant à elle, sert à déterminer si le nombre de copies de matériel génétique est identique entre les échantillons et les répliques. Ce nombre ne devrait pas varier puisque la composition du liquide aérosolisé contenant les phages est identique pour toutes les expérimentations.

Un ratio de 1 ou  $10^0$  signifie que tous les phages détectés par qPCR étaient infectieux, donc dénombrés sur milieu de culture. Si le nombre de copies révélées par qPCR reste constant, mais que le nombre de plages de lyse diminue entre deux temps, cela signifie que la condition a un effet sur l'infectivité des phages.

Il faut prendre en considération que plusieurs variables, dont l'humidité relative, le temps d'exposition ou encore l'exposition à l'oxygène ou à l'ozone peuvent affecter l'infectivité des phages. Par exemple, certains phages résistent mieux à une HR de 85% plutôt que de 20%, comme c'est le cas pour Phi6. L'effet de ces variables sera utilisé pour l'interprétation des résultats.

Chaque point sur les graphiques représente un réplica effectué pour une condition testée. Il est à noter que pour plusieurs échantillons, les résultats se situaient sous la limite de détection des méthodes employées. Ceux-ci sont présentés sur les graphiques sous la ligne pointillée.

Dans les graphiques de droite, ce sont les **ratios infectieux relatifs** qui sont présentés. Les ratios infectieux relatifs permettent d'apprécier l'effet additionnel de l'ozone. Un ratio supérieur ou égal à 1 indique que l'ozone n'apporte pas de « plus-value ». À l'opposé, un ratio plus petit que 1 montre que l'ozone a un effet virucide. Plus le ratio est faible, plus l'effet de l'ozone est appréciable. Les lignes pointillées représentent le seuil de détection de la méthode. Une valeur sous cette ligne n'est donc pas quantifiable, mais se situe près de zéro.

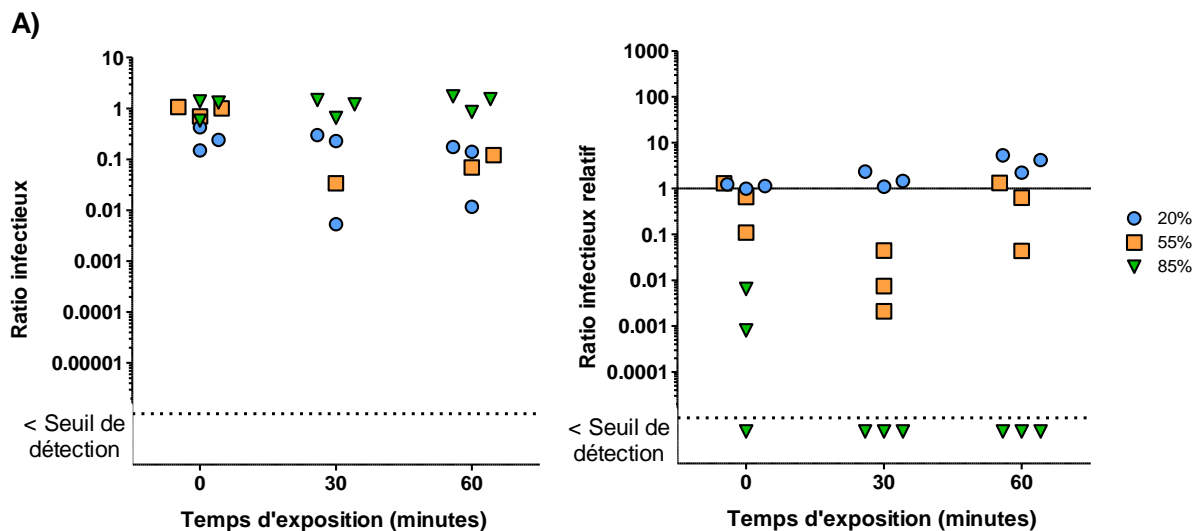
Il est à noter que les analyses statistiques n'ont pas encore été réalisées, ce ne sont donc que des résultats bruts et des tendances qui sont présentés dans ce rapport.

### PhiX174

Pour PhiX174 (figure 1A), les ratios de base à 20% et 55% HR diminuent d'environ un ordre de grandeur au fil du temps. Les ratios sont constants à 85% RH et se situent près de 1, ce qui signifie que presque tous les phages sont infectieux.

Lorsque PhiX174 est exposé à l'ozone (figure 1B), l'effet additionnel est faible à 20% RH. À 55%, il y a une petite diminution dès le temps 0, mais celle-ci ne change pas au fil du temps. L'effet virucide de l'ozone est toutefois très marqué lorsque PhiX174 est exposé à 85% RH et ce, à partir du temps 0. Après 30 minutes d'exposition, les valeurs tombent sous le seuil de détection de la méthode.

La meilleure condition testée pour la réduction de PhiX174 est l'exposition combinée de l'ozone et d'une humidité relative de 85%.



**Figure 1. A)** Effet de trois humidités relatives et de trois temps d'exposition sur l'infectivité du phage PhiX174 (sans ozone) **B)** Effet de l'ozone sur l'infectivité du phage PhiX174 à trois humidités

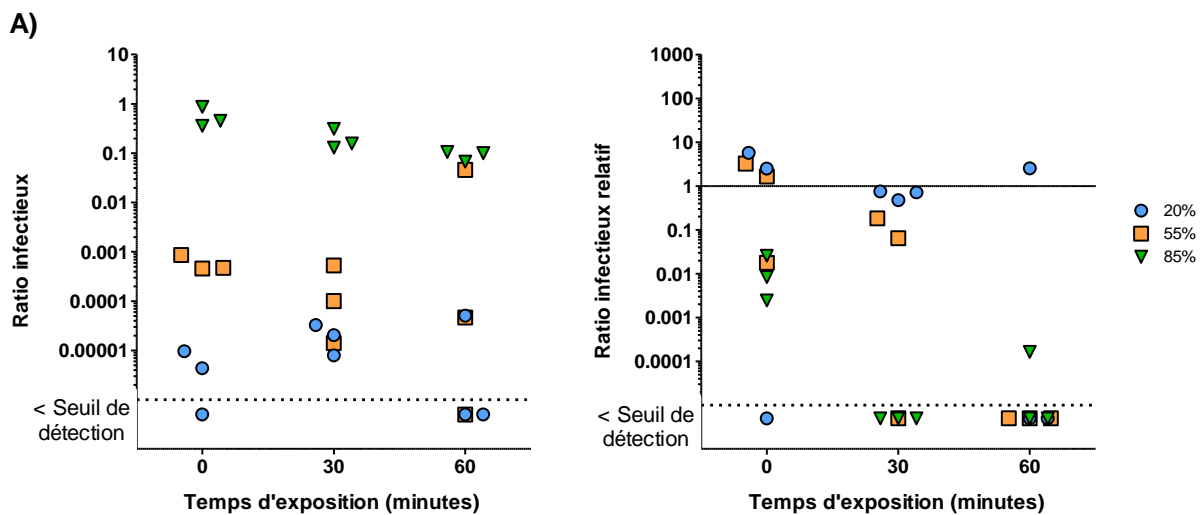
relatives et à trois temps d'exposition. La valeur 1 représente la valeur de référence sans ozone (graphique A).

### PR772

Pour PR772 (figure 2A), les ratios de base à 20% RH sont très faibles et se situent près de la limite de détection de la méthode. Ceux-ci sont un peu plus élevés à 55% RH. À 85% RH, les ratios au temps zéro sont près de 1 et diminuent d'un ordre de grandeur après une maturation de 60 minutes.

Lorsque l'ozone est ajouté (figure 2B), l'effet à 20% RH n'est pas quantifiable tant que les analyses statistiques ne sont pas effectuées. En effet, les points sont éparpillés sur le graphique et aucune tendance n'est observable. À 55%, l'effet est graduel dans le temps et les valeurs tombent sous le seuil de détection après 60 minutes d'exposition. Il y a une diminution de 2 à 3 ordres de grandeur pour le temps 0 à 85% RH. Les ratios tombent ensuite sous le seuil de détection pour 30 et 60 minutes d'exposition.

Une humidité relative de 85% est également plus efficace pour l'inactivation de PR772.



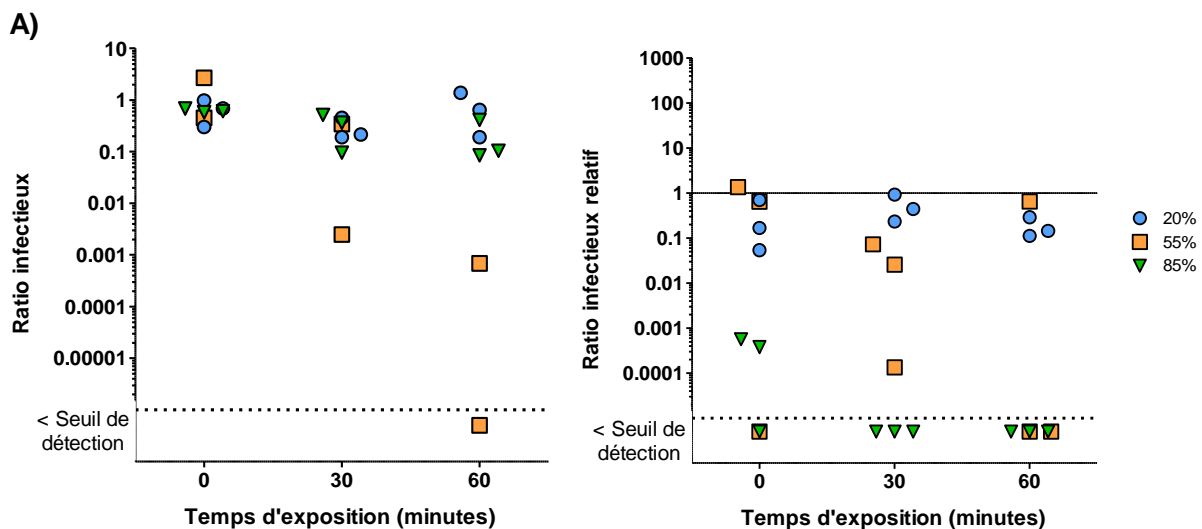
**Figure 2 : A)** Effet de trois humidités relatives et de trois temps d'exposition sur l'infectivité du phage PR772 (sans ozone) **B)** Effet de l'ozone sur l'infectivité du phage PR772 à trois humidités relatives et à trois temps d'exposition. La valeur 1 représente la valeur de référence sans ozone (graphique A).

## MS2

À la figure 3A, on constate que le niveau de base à 55% HR pour MS2 diminue en fonction du temps. Ce scénario n'est pas observé à 20% ni 85% HR.

Pour 20% RH, les ratios infectieux relatifs sont presque équivalents à ceux de base (figure 3B) et ceux-ci diminuent graduellement dans le temps à 55% RH. Les ratios diminuent drastiquement à une humidité de 85%, baissant de 4 ordres de grandeur au temps 0 et passant sous le seuil de détection à partir de 30 minutes.

Une humidité de 85% additionnée de  $1,13 \pm 0,26$  ppm d'ozone est donc la meilleure condition pour éliminer l'infectivité de MS2. Ce résultat est très prometteur puisque ce phage constitue un modèle du Norovirus, un virus connu comme étant très résistant.



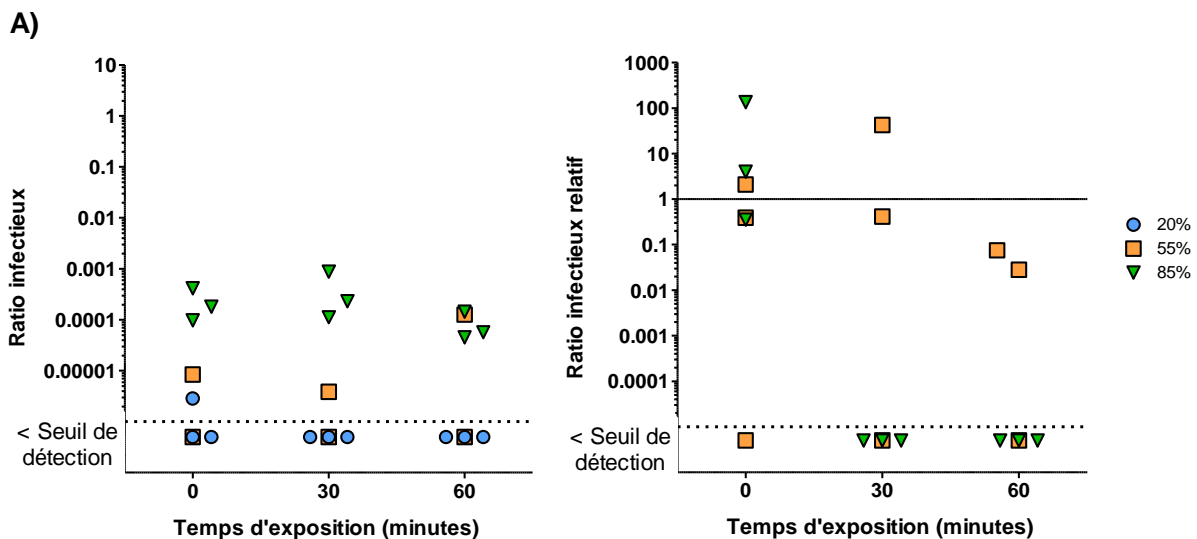
**Figure 3 : A)** Effet de trois humidités relatives et de trois temps d'exposition sur l'infectivité du phage MS2 (sans ozone) **B)** Effet de l'ozone sur l'infectivité du phage MS2 à trois humidités relatives et à trois temps d'exposition. La valeur 1 représente la valeur de référence sans ozone (graphique A).

## Phi 6

Les ratios infectieux de base (figure 4A) pour une humidité relative de 20% se situent presque tous sous la limite de détection. Compte tenu de ce résultat, les ratios infectieux relatifs ne sont pas présentés à la figure 4B. À 55% RH, les ratios infectieux sont près du seuil de détection (une valeur sous la limite pour chaque temps). Phi6 préfère une humidité relative de 85%, les ratios étant les plus élevés parmi les trois humidités testées.

Les ratios infectieux relatifs (figure 4B) se situent près de 1 à 55% RH, bien qu'un des trois réplicas soit sous le seuil de détection à chaque temps. À 85%, le ratio au temps 0 est près de 1 et celui-ci tombe drastiquement sous le seuil de détection à partir de 30 minutes d'exposition. Il faut toutefois prendre en considération que les ratios de base sont très faibles, entre  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$ . Par conséquent, peu de phages sont toujours infectieux (entre 1/1 000 000 et 1/1 000). L'effet additionnel de l'ozone est donc plutôt limité.

Une humidité de 85% semble plus efficace pour phi6, mais l'effet de l'ozone demeure discutable.



**Figure 4. A)** Effet de trois humidités relatives et de trois temps d'exposition sur l'infectivité du phage Phi6 (sans ozone) **B)** Effet de l'ozone sur l'infectivité du phage Phi6 à trois humidités relatives et à trois temps d'exposition. La valeur 1 représente la valeur de référence sans ozone (graphique A).

## Conclusions et perspectives

En conclusion, ce début d'étude a permis de vérifier l'effet de plusieurs conditions d'exposition sur la viabilité de trois phages aérosolisés. La meilleure condition testée, tous phages confondus, est l'exposition à  $1,13 \pm 0,26$  ppm d'ozone combinée à une humidité relative de 85%. Les résultats sont encourageants, surtout dans le cas de MS2 puisque ce phage est connu comme étant très résistant, tout comme le Norovirus.