



« Détection d'*Aspergillus* : des résultats en 6h grâce à la méthode PCR »

Dr Philippe PREAU, PhD., Directeur scientifique du groupe EOLIA
 Dr Gabriel MARTIN, PhD., Coordinateur de la Business Unit C4Environment chez C4Diagnostics

La lutte contre les infections nosocomiales

- La prévention et la lutte contre les infections nosocomiales sont un enjeu majeur de santé publique. Au sein des établissements de santé, l'air est l'un des vecteurs de contamination impliqué dans la transmission des infections nosocomiales ainsi que dans l'évaluation de niveau de risque d'*Aspergillus*.
- La **maitrise de l'environnement hospitalier** s'appuie sur des mesures environnementales et notamment sur les contrôles microbiologiques de l'air.
- La recherche de *flores aérobies* et fongiques est une obligation dans les établissements de santé depuis plusieurs années (NFS 90 351 : 2003).
- Ces contrôles réalisés au sein de zones à environnement maîtrisé (ZEM) constituent l'un des outils à la préservation d'un environnement microbien, une zone définie où l'on maîtrise la contamination microbiologique à l'aide de moyens spécifiés.¹

Une méthode innovante de prélèvement pour des résultats en 6h

- Dans le cadre de ces contrôles microbiologiques de l'air et des surfaces utilisant la méthode de mise en culture sur boîte de Pétri, **un délai incompressible de près d'une semaine est nécessaire dans la recherche de flore fongique et flore totale** (incubation à 7 jours à une température de 30 à 35 degrés Celsius).
- Dans le contexte de la crise sanitaire liée à l'épidémie de la COVID-19, les équipes du groupe EOLIA spécialisées dans la gestion de la qualité de l'air depuis plus de 12 ans ont développé **des techniques de prélèvement** avec pour objectif le dépistage virologique :
 - dans l'air à l'aide d'un bio-collecteur d'air Coriolis Micro²,
 - sur les surfaces à l'aide des écouvillons contenant une solution de conservation.

Les prélèvements sont effectués pour être ensuite analysés par réaction de polymérisation en chaîne, également appelée PCR.³ Cette technique permet de mettre en évidence et de quantifier l'ensemble des microorganismes : moisissures, levures de vinification, levures de contamination, bactéries lactiques ou bactéries acétiques et **présente l'avantage d'obtenir en 6 heures le résultat**, à compter de la réception du prélèvement au laboratoire C4Diagnostics.

¹ Définition extraite de la norme NF EN 17141 Août 2020. « Salles propres et environnements maîtrisés apparentés — Maîtrise de la biocontamination »

² Un plan d'échantillonnage est réalisé en accord avec le client.

³ Cette technique permet l'amplification d'une séquence ADN pour le rendre détectable.

EOLIA s'est rapproché de **C4Diagnostics** biotech spécialisée dans le développement de tests de diagnostic in vitro pour **les maladies infectieuses humaines** afin d'adapter cette technique à la détection d'*Aspergillus* ou de tout autres pathogènes.

→ L'offre EOLIA : un mode opératoire inédit au service de l'urgence dans la recherche de l'*Aspergillus*

- A partir de ce mode opératoire innovant, le groupe EOLIA a mis en place une méthode de recherche similaire dans le cadre de la recherche de moisissures et d'*Aspergillus*.
- Cette **méthode s'adapte parfaitement à des contextes d'urgence** : dans le cas d'une contamination détectée dans un service hospitalier nécessitant de trouver rapidement des solutions afin de procéder à des décontaminations en urgence, notamment dans des salles de réanimation.
- **EOLIA** propose aux établissements de santé des kits de prélèvement d'*Aspergillus* afin d'appliquer la technique PCR et permettant une **détection en 6 heures**.

Détail du protocole mis en œuvre

- La démarche de prélèvement proposée par EOLIA s'appuie sur **la norme EN 17141⁴** indiquant la possibilité d'utiliser en complément des « méthodes alternatives qui peuvent améliorer la compréhension des conditions de maîtrise de l'environnement propre, maîtriser ou fournir d'autres avantages pour certaines applications ».
- L'acheminement des prélèvements au laboratoire partenaire **C4Diagnostics** s'effectue le jour même, au plus tard 24h après en prenant les précautions d'isothermie nécessaires.

Déroulé des opérations, du prélèvement à l'analyse, pour n=10 échantillons

- Au sein du laboratoire **C4Diagnostics**, les échantillons suivent le principe de « marche en avant », de la pièce de réception jusqu'à la pièce d'analyse, un processus habituel des activités de biologie médicale en zones confinées.
- Dès leur prélèvement, les échantillons d'air ou de surfaces sont traités dans un milieu conservateur, protégés par un triple emballage et une boîte de transport biologique, puis acheminés en respectant des températures et condition de conservation optimales.
- L'ensemble du processus, de la réception des échantillons au rendu des résultats, se fait en 6 heures maximum (**Figure 1**).

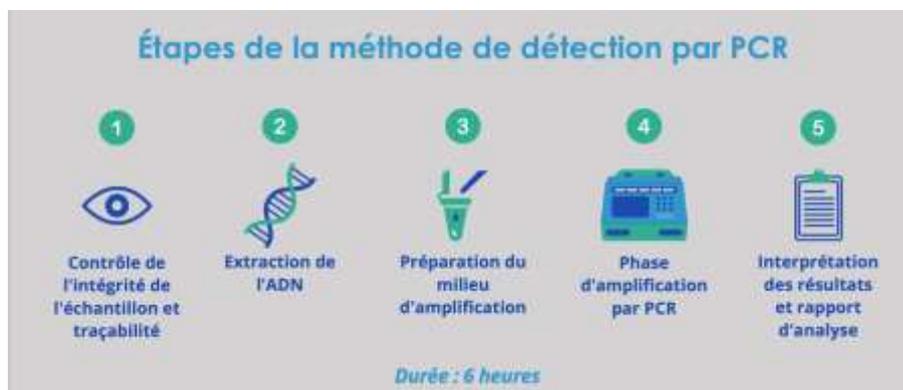


Figure 1. Étapes de la méthode de détection par PCR dans les laboratoires de C4Diagnostics

⁴ Norme NF EN 17141 Août 2020. « Salles propres et environnements maîtrisés apparentés — Maîtrise de la biocontamination »

1. A réception des échantillons chez C4Diagnostics, la première étape est le **contrôle de leur intégrité** et de leur conformité. Ces données sont saisies informatiquement pour assurer une traçabilité. Durée : 60 minutes.
2. Les échantillons sont ensuite transférés dans la pièce d'extraction pour y être déconditionnés, prétraités, puis extraits. **L'extraction d'ADN d'*Aspergillus*** se fait grâce à un kit d'extraction spécifique pour bactéries, levures et champignons. Durée : 30 minutes (déconditionnement et prétraitement) + 40 minutes (extraction).
3. Pendant la phase d'extraction qui requiert 36 minutes d'incubation, la plaque multi-puits qui permettra l'amplification simultanément du lot de n=10 échantillons est préparée.
4. Cette étape de **préparation de la plaque d'amplification** est réalisée dans une pièce de biologie moléculaire dédiée, où aucun échantillon n'entre, afin d'éviter les contaminations croisées. Le kit d'amplification comprend trois gènes cibles pour une haute spécificité du résultat PCR : un gène spécifique d'*Aspergillus terreus*, un gène commun aux 12 autres espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus spp.*), et un gène de contrôle interne. Durée : 30 minutes.
5. Les extraits d'ADN et la plaque d'amplification sont transférés dans la pièce d'amplification. Sous la hotte PCR, les extraits sont distribués dans la plaque d'amplification, puis **l'ADN est amplifié** dans un thermocycleur. Durée : 20 minutes (préparation) + 100 minutes (amplification)
6. La dernière étape est **l'analyse et l'interprétation des résultats**. Les courbes de RT-PCR sont analysées qualitativement et quantitativement grâce à un logiciel pour conclure sur la présence d'*Aspergillus* pour chaque échantillon testé. Un rapport est finalement rédigé et validé par le laboratoire C4Diagnostics. Durée : 60 minutes.

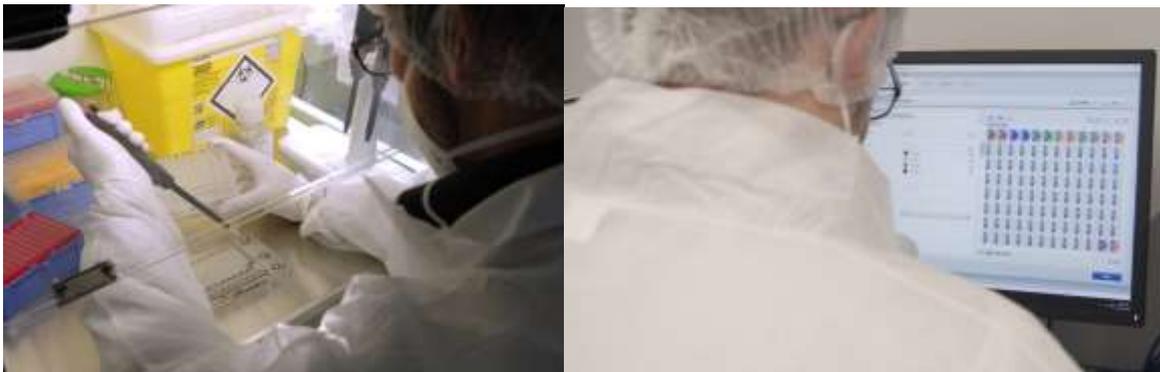


Figure 2 : préparation des plaques d'amplification (gauche) et analyse des résultats (droite) par le Dr Gabriel Martin (crédits photo : C4Diagnostics)

Contacts

- **Eolia**

contact@aireolia.com

04 42 70 87 44

www.eolia365.com

Suivez-nous sur LinkedIn

www.linkedin.com/company/eolia365

- **C4Diagnostics**

contact@c4diagnostics.com

04 91 08 60 60

www.c4diagnostics.com

Suivez-nous sur LinkedIn

www.linkedin.com/company/c4diagnostics