



LABORATOIRE D’HYDROLOGIE DE NANCY

**ÉTAT DES LIEUX DES CAPACITÉS ANALYTIQUES DES LABORATOIRES
(MESURES DIRECTES ET INDIRECTES) CONCERNANT LE SARS-CoV-2
DANS LES MATRICES RESIDUAIRES**

Questionnaire adressé par le Laboratoire d’Hydrologie de Nancy en avril 2020, à 143 laboratoires disposant d’un agrément du ministère de la santé et/ou du ministère de l’environnement.

1. Contexte

Suite à une saisine adressée à l'Anses par le Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire (MTES) et concernant l'épandage des boues de station d'épuration, le laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) a réalisé un état des lieux des capacités des laboratoires à détecter, voire quantifier le virus du Covid-19 (SARS-CoV-2) dans des matrices résiduaire de types eaux urbaines résiduaire, boues urbaines hygiénisées ou non. Les laboratoires agréés par le MTES pour les matrices résiduaire et les laboratoires agréés en microbiologie des eaux par le Ministère des Solidarités et de la Santé ont été sollicités avec l'appui de l'Office Français de la Biodiversité (OFB). Un questionnaire leur a été adressé dans l'objectif de dresser un recensement des capacités analytiques et d'identifier les laboratoires en mesure de mettre en œuvre: (i) le dénombrement des formes cultivables de bactériophages (indicateurs viraux), (ii) la recherche et l'identification du génome du virus SARS-CoV-2, (iii) des méthodes de cultures cellulaires potentiellement adaptées à la mise en évidence des particules virales infectieuses de SARS-CoV-2.

L'avis¹ de l'ANSES relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de Covid-19, complète les informations méthodologiques abordées ci-après.

L'enquête a ciblé les laboratoires agréés pour répondre éventuellement à des demandes réglementaires, elle n'a pas pris en compte les laboratoires académiques éventuellement compétents sur ces échantillons environnementaux.

2. Aspects méthodologiques

2.1. Méthodes directes de recherche et de dénombrement du SARS-CoV-2

2.1.1. Préambule

Il faut rappeler que pour être infectieux, un virus doit disposer d'un matériel génétique intègre (complet) et également d'une capsid complète non altérée. Pour les virus type coronavirus ou influenza l'enveloppe constitue également un composant indispensable. Dans l'environnement, il est reconnu que le génome libre non encapsidé peut être dégradé plus rapidement que quand il est protégé dans la capsid.

2.1.2. RT-PCR

La recherche de particules virales dans l'environnement se fait essentiellement par biologie moléculaire. Les méthodes les plus souvent utilisées se basent sur le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Après extraction et purification du génome viral contenu dans un échantillon, la technique de PCR permet d'amplifier une séquence d'ADN spécifique du microorganisme recherché en plusieurs millions d'exemplaires. Cette méthodologie consiste à polymériser de façon répétée à l'aide d'une enzyme thermostable, le brin complémentaire d'un fragment d'ADN. L'adaptation de la PCR pour la détection des génomes viraux à ARN, nécessite avant l'étape de PCR de réaliser la transformation de leur ARN en ADNc (ADN complémentaire) par le biais d'une enzyme de rétrotranscription et d'une amorce anti-sens. Cette étape constitue la rétrotranscription, d'où la dénomination adoptée de RT-PCR. Cette méthode peut être quantitative grâce à un principe analytique (RT-PCR temps réel) qui permet une émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de génome initialement présente dans l'échantillon.

La RT-PCR en temps réel est une méthode sensible et spécifique qui permet d'obtenir des informations très rapidement (4h). Toutefois, la présence de molécules interférentes, co-extraites en même temps que le génome viral, peut dans certains cas inhiber l'activité enzymatique nécessaire aux analyses par RT-PCR et conduire à l'obtention de faux négatif. Pour l'éviter il est possible soit d'éliminer les inhibiteurs par le biais

¹ Saisine n° 2020-SA-0043 : Avis de l'ANSES relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de COVID-19. Mars 2017, 21 pages. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MFSC2020SA0043.pdf>

d'un traitement adapté (colonne de purification, chélateur chimique...) soit de mesurer la proportion de l'inhibition ce qui permet d'en tenir compte dans le résultat final.

La détection de génome viral par RT-PCR peut être due à (i) du génome encapsidé au sein de particules virales intègres et donc potentiellement infectieuses, (ii) du génome encapsidé au sein de particules virales dont l'intégrité a été altérée du fait de stress environnementaux et qui de ce fait ont perdu leur potentiel infectieux, (iii) de génome viral non encapsidé dit « libre » présent dans l'environnement suite à la lyse des particules virales par exemple. La RT-PCR ne peut discriminer ces différents états et autorise uniquement une mesure du niveau de contamination du génome viral qu'il soit libre ou encapsidé. Par conséquent la RT-PCR ne permet pas de statuer sur la présence de particules virales infectieuses. En cas de résultats positifs, des analyses par culture cellulaire sont nécessaires pour statuer sur la présence et éventuellement la quantité de virus potentiellement infectieux.

2.1.3. Culture cellulaire

La culture cellulaire est basée sur la multiplication virale. Elle est réalisée à partir d'un inoculum obtenu à partir d'un échantillon environnemental après concentration et si nécessaire décontamination visant à réduire ou éliminer les microorganismes non ciblés et potentiellement interférents. L'inoculum est mis en contact avec un tapis de cellules sensibles à l'infection et maintenues en culture dans un milieu nutritif approprié. La culture cellulaire constitue la méthode de référence pour établir le caractère infectieux des virus, cependant elle peut s'avérer complexe à mettre en œuvre en particulier lorsqu'il s'agit d'analyser des échantillons d'origine environnementale. Par ailleurs, les délais pour l'obtention des résultats peuvent être relativement longs et nécessiter jusqu'à plusieurs semaines. Concernant le SARS-CoV-2, il n'existe pas de méthode de culture cellulaire établie pour l'analyse d'échantillons environnementaux. Les laboratoires ont été sollicités dans ce questionnaire pour déterminer leur retour d'expérience sur la culture cellulaire.

2.2. Méthodes indirectes : utilisation des bactériophages comme indicateur.

La culture des bactériophages est décrite dans les normes NF EN ISO 10 705-1 et NF EN ISO 10705-2 qui traitent respectivement de la détection et du dénombrement des bactériophages ARN-F spécifiques et des coliphages somatiques. La norme ISO 10 705-3 fournit des éléments concernant les principes des méthodes de concentration qui peuvent être employées avant les étapes de détection et de dénombrement des bactériophages.

Le dénombrement des bactériophages permet une évaluation rapide (24 h) de l'effet hygiénisant des traitements. Le suivi du niveau d'abattement des formes cultivables (et pas seulement du génome) de ces indicateurs viraux d'efficacité de traitement, permet d'estimer la probabilité du maintien de formes infectieuses d'autres virus, y compris le SARS-CoV-2. Ainsi, les bactériophages ARN-F spécifiques et les coliphages somatiques sont considérés comme des indicateurs pertinents pour évaluer l'efficacité des traitements appliqués à des eaux résiduaires ou à des boues.

3. Données générales de réponse au questionnaire

Le questionnaire a été adressé à tous les laboratoires agréés sur les eaux résiduaires par l'OFB et à tous les laboratoires agréés pour les paramètres microbiologiques pour les « eaux propres » par le Ministère de la Santé, soit 143 laboratoires au total. Attention, l'ensemble des réponses ci-après dans le rapport n'a de valeur qu'à l'instant du questionnaire (consultation ouverte sur la période du 10 avril au 27 avril). La mobilisation des laboratoires pour répondre à des demandes nouvelles a certainement modifié ces données à la hausse. Sur 143 sollicitations par mel, 88 réponses ont été reçues (62%).

- 61 des laboratoires ayant répondu (70%) n'ont aucune activité directe ou indirecte en lien avec le virus.
- 27 laboratoires exercent une activité en lien avec le virus parmi celles sollicitées dans le questionnaire (prélèvements, extraction/purification du génome, identification, évaluation du potentiel infectieux).

Le questionnaire portait plusieurs sections :

- les compétences (agrément), les mesures de confinement de laboratoire, les accréditations en lien avec la réalisation d’analyses sur des matrices complexes (boues, fertilisants, support de culture) ou relatives à la détection de génome viral,
- les activités de prélèvements d’échantillons d’eaux résiduaires ou de boues,
- les capacités d’extraction et de détection directe du génome du virus dans les matrices résiduaires,
- les capacités d’évaluation indirecte de l’effet hygiénisant par le dénombrement des bactériophages dans les matrices résiduaires,
- les capacités d’évaluation du potentiel infectieux des particules virales de SARS-CoV-2 contenues dans des matrices résiduaires.

4. Informations générales relatives aux compétences des laboratoires

4.1. Quels sont les agréments des laboratoires qui ont répondu ?

22 réponses/88 retours (25%)		
Agrément Santé	0	0%
Agrément Environnement	2	9%
Agréments Santé <u>et</u> Environnement	20	91%

4.2. Quel est le plus haut niveau de sécurité biologique du laboratoire (NSB²) sur le site ?

20 réponses/88 retours (23%)		
NSB2	7	35%
NSB2+	6	30%
NSB3	7	35%

Actuellement, deux coronavirus sont classés en groupe 3 :

- Coronavirus responsable du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV)
- Coronavirus responsable du Syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV, ou severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), en anglais)

Les autres coronavirus sont actuellement classés en groupe 2 (Arrêté du 18 juillet 1994 modifié³).

Comme mentionné dans une note ANSES préalablement diffusée⁴, le SRAS-CoV-2, à l’origine de la pandémie actuelle, n’est actuellement pas classé. Toutefois, au regard des connaissances actuelles et par analogie au SRAS-CoV, ce coronavirus pourrait être considéré comme un agent pathogène de groupe 3 ou supérieur.

4.3. Avez-vous une activité concernant les analyses microbiologiques sur boues, fertilisants ou supports de culture ?

32 réponses / 88 retours	Accréditée (14 réponses)	
	NON	OUI
OUI	7	3
NON	22	

² NSB : Niveau de sécurité biologique.

³ Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes modifié par l’arrêté du 27 décembre 2017 relatif à la liste des agents biologiques pathogènes et aux mesures techniques de prévention à mettre en œuvre dans les laboratoires où les travailleurs sont susceptibles d’être exposés à des agents biologiques pathogènes.

⁴ NOTE d’appui scientifique et technique de l’Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail relative à la proposition d’orientations utiles pour la prévention de l’exposition au virus SRASCoV-2 en milieu professionnel, dans des contextes autres que ceux des soins et de la santé (demande 2020-SA-0046).

32 laboratoires ont répondu à la question posée dans l’enquête. 10 laboratoires indiquent déjà réaliser des analyses microbiologiques sur boues, fertilisants ou supports de culture. Seulement 3 laboratoires sont accrédités dans ce domaine particulier.

4.4. Accréditation selon la NF EN ISO 17 025 concernant la détection/quantification de génome viral par (RT)-PCR (quels que soient le virus et la matrice)

	Non accrédité	Oui accrédité	...et en portée flexible
23 réponses	10	13	13

4.5. Synthèse : laboratoires disposant du plus de compétences dans le domaine analytique visé.

	Accréditation en portée flexible pour la détection et/ou quantification de génome viral par RT-PCR	Accréditation boues, fertilisants ou support de culture	Accréditation combinée	Niveau maximal de sécurité biologique
Nombre de laboratoires	13	3	3	1 NSB2
				1 NSB2+
				1 NSB3

- 13 laboratoires disposent d’une accréditation flexible pour la recherche et/ou la quantification de génome viral par RT-PCR.
- 7 de ces laboratoires possèdent déjà une activité analytique sur des boues, fertilisants ou support de culture mais seulement 3 laboratoires disposent d’une accréditation sur cette activité.
- Au final seulement 3 laboratoires combinent donc les deux accréditations (dont 1 laboratoire NSB3, 1 NSB2+ et 1 NSB2).

5. Avez-vous une activité de prélèvements concernant des échantillons résiduaire (susceptibles de contenir du SARS-CoV-2).

(79 réponses)		Eaux résiduaire uniquement	Eaux résiduaire, boues, ...	Mises en place de dispositions particulières vis-à-vis du virus	
OUI	15	4	11	OUI	12
				NON	3
NON	64				

Exemples de dispositions prises pour le flaconnage :

- Désinfection extérieure des flacons après prélèvement.
- Transport et réception au laboratoire réalisés en double emballages.

Exemples de dispositions prises pour les EPI :

- Port de gants, combinaisons, masques FFP2, sur-chaussures, sur-manches, lunettes, visières.

6. Capacités d'évaluation directe pour le génome de SARS-CoV-2 dans les matrices résiduares.

6.1. Capacités d'extraction et de purification

(16 réponses)	Protocole applicable au génome de SARS-CoV-2	Données de validation disponibles	Mis en œuvre effective sur matrices résiduares	Capacité d'extraction/purification et d'analyses d'autres génomes viraux à partir de matrices résiduares
OUI	8	6	3	2
NON	8			

En résumé seulement 3 laboratoires déclarent actuellement être en mesure de réaliser une extraction/purification du génome de SARS-CoV-2 à partir de matrices résiduares et d'un mode opératoire au moins partiellement validé. Deux de ces laboratoires disposent déjà d'une expérience concernant d'autres virus, tandis que le troisième non et propose cette étape analytique uniquement pour le SARS-CoV-2. Concernant les données de validation disponibles, un seul laboratoire déclare disposer d'éléments de validation intégrant des données de rendement, de répétabilité et de reproductibilité. Il déclare être en mesure de réaliser des analyses sur eaux résiduares et boues. Un second laboratoire dispose uniquement d'un contrôle interne et déclare réaliser des extractions uniquement sur des boues. Le troisième laboratoire a uniquement réalisé des essais de détection à partir de boues non hygiénisées artificiellement contaminées. Du point de vue du niveau de confinement associé à cette étape analytique, un laboratoire dispose de locaux de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3) tandis que les deux autres ont recours à des locaux de niveaux 2 (NSB2).

En plus des 3 laboratoires déclarant déjà être en mesure de réaliser l'extraction et la purification de génome de SARS-CoV-2 à partir d'eaux résiduares ou de boues issues de STEP, il doit être noté que 3 autres laboratoires ayant une expérience dans l'extraction et la purification du génome d'autres virus dans ce type de matrices, déclarent avoir à disposition un mode opératoire applicable au SARS-CoV-2 mais ne l'utilisent pas actuellement. Parmi ces 3 laboratoires, deux sont en mesure de réaliser les extractions dans des locaux NSB3 et le dernier dans des locaux NSB2+. Enfin 2 autres laboratoires sont en cours d'acquisition de compétences pour l'extraction/purification de génome viral à partir de matrices résiduares.

6.2. Capacités de détection/quantification de génome viral à partir d'échantillons résiduares (issus de STEP).

(15 réponses)	Protocole applicable au génome de SARS-CoV-2	Capacité déjà en place au laboratoire (échantillons biologiques inclus)	Données de validation disponibles	Capacité déjà en place sur matrices résiduares
OUI	12	8	6	2
NON	3			

Il doit être noté qu'au-delà de la détection spécifique du génome de SARS-CoV-2, c'est-à-dire en intégrant les capacités actuellement en place pour détecter d'autres génomes de virus dans les matrices résiduares, l'effectif de laboratoires en mesure d'afficher des compétences de détection de génome viral dans ces matrices complexes, est porté au nombre de 7.

6.3. Synthèse des phases d'extraction et de détection du SARS-CoV-2 dans les échantillons résiduares.

Parmi les 12 laboratoires qui disposent d'un mode opératoire de détection/quantification applicable au génome de SARS-CoV-2, seulement 8 ont une activité détection/quantification effective (si on intègre les

analyses réalisées sur échantillons biologiques). Parmi ces laboratoires 6 disposent de données de validation et deux sont en mesure de mettre en œuvre ces analyses de détection/quantification de génome de SARS-CoV-2 sur des matrices résiduelles. Les deux laboratoires proposent une analyse qualitative sur boues, et un seul des deux laboratoires propose la réalisation d’analyses quantitatives sur eaux résiduelles. De manière cohérente, ces deux laboratoires disposent également d’un mode opératoire d’extraction/purification du génome de SARS-CoV-2 pour ces mêmes matrices résiduelles.

Par ailleurs, deux laboratoires disposent d’un mode opératoire ciblant le génome de SARS-CoV-2 du fait d’une activité sur échantillons biologiques mais n’ont pas d’expérience dans l’analyse d’échantillons environnementaux. Quatre laboratoires disposant d’un mode opératoire ciblant le génome de SARS-CoV-2 ne réalisent pas d’analyses sur matrices résiduelles mais possèdent une expérience de l’analyse du génome d’autres virus dans ce type de matrices.

Enfin 6 laboratoires affichent leur souhait de réaliser la quantification de génome de SARS-CoV-2 dans des matrices résiduelles.

7. Capacité d'évaluation indirecte pour le SARS-CoV-2 dans les matrices résiduelles : suivi des bactériophages selon la norme NF EN ISO 10 705.

(22 réponses)		Matrices	Bactériophages		Accréditation
OUI	7	Eaux propres et eaux résiduelles	ARN-f	7	3
			Somatiques	5	0
		Boues ou matrices similaires	ARN-f	4	0
			Somatiques	3	
NON	15				

Concernant la quantification de bactériophages à partir d’échantillons résiduelles, les bactériophages ARN-F spécifiques disposent de la plus grande capacité analytique avec 7 laboratoires qui déclarent être en capacité de réaliser cette analyse sur les eaux résiduelles, contre 5 laboratoires pour la quantification de coliphages somatiques. Pour la matrice eaux résiduelles, 3 laboratoires sont accrédités et uniquement pour le paramètre bactériophages ARN-F spécifiques. Dans les boues et matrices similaires la capacité analytique est réduite à environ la moitié de la capacité sur eaux résiduelles avec respectivement 4 et 3 laboratoires pouvant pratiquer l’analyse pour les bactériophages ARN-F spécifiques et pour les coliphages somatiques. Aucun laboratoire n’est accrédité pour la détection des bactériophages dans les boues.

8. Capacités d'évaluation de l'infectiosité du SARS-CoV-2 par culture cellulaire

(23 réponses)		Boues et matrices similaires
OUI	5	Entérovirus
NON	18	

Cinq laboratoires proposent le dénombrement des Entérovirus dans les boues par culture cellulaire. Deux dispose de locaux NSB3, un de locaux NSB2+ et deux autres de locaux NSB2. Aucun laboratoire ne dispose d’expérience sur la détection ou la quantification de SARS-CoV-2 par culture cellulaire.

9. Conclusions

Prélèvement matrices résiduaire susceptibles de contenir du SARS-CoV-2	Evaluation indirecte par le suivi de bactériophages			Evaluation directe par détection/quantification du génome de SARS-CoV-2	
	Type de bactériophages	Eaux résiduaire	Boues et matrices similaires	Boues et matrices similaires	Eaux résiduaire
15	ARN-F spécifiques	7 dont 3 accrédités	4 aucun accrédité	2	1
	Coliphages somatiques	5 aucun accrédité	3 aucun accrédité	Sur boue, les deux laboratoires réalisent uniquement des analyses qualitatives (présence/absence). Sur eaux résiduaire, les analyses sont quantitatives	

Aucun laboratoire ne déclare être en mesure de réaliser des analyses par culture cellulaire de SARS-CoV-2 à partir d’échantillons résiduaire.

A noter que 3 laboratoires possèdent une accréditation dans le domaine du contrôle des matrices résiduaire, des fertilisants, support de culture ainsi qu’une accréditation en portée flexible pour la détection/quantification de génome viral par RT-PCR. L’un d’eux propose déjà des analyses qualitatives de génome de SARS-CoV-2 dans les boues, les deux autres souhaitent développer ces prestations sur matrices résiduaire.

Ces capacités analytiques doivent être mis en parallèle des analyses de risques réalisées par les laboratoires pour assurer la sécurité de leur personnel potentiellement exposé. Aussi il convient d’être attentif au niveau de sécurité biologique disponibles dans les laboratoires et à la stratégie de prévention mise en place par ces structures lors des prélèvements et des analyses.

Le bilan dressé dans ce document est représentatif des compétences et des modalités analytiques disponibles au moment de cette enquête (avril 2020) et uniquement pour les laboratoires disposant d’un agrément du ministère de l’Environnement et/ou du ministère de la Santé. Ce bilan ne présage pas des capacités des laboratoires académiques qui de par les travaux de recherche engagés sont susceptibles de développer des méthodes directement applicables dans leur structure ou transférables vers des laboratoires d’analyses. Concernant les laboratoires académiques il doit être souligné qu’un appel à projets financés par l’ANR a été récemment diffusé, des réseaux se forment actuellement sur le sujet.