

DISS. ETH NO. 29305

***Detection of nucleic acids as the biomarkers of hazardous agents in
bioaerosols***

A thesis submitted to attain the degree of DOCTOR OF

SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Yile Tao

MSc. in Environmental Science, Peking University

born on 14.09.1990

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jing Wang, examiner
Dr. Zacharias Kontarakis, co-examiner
Prof. Dr. Maosheng Yao, co-examiner

2023

Abstract

The transmission of hazardous agents via bioaerosols has been long-acknowledged as an important risk, yet it has been poorly studied and understood, due to paltry data, methodological heterogeneity and limitation. Therefore, this thesis mainly chose 2 different kind of hazardous agents: antibiotic resistance genes (ARGs) and human respiratory viruses as examples to attempt to narrow several gaps in bioaerosol research. Antibiotic resistance genes (ARG) have been considered as a global emerging threat to public health systems. As special locations where both antibiotics and ARGs are directly used, biology laboratories are poorly studied but potential important emission sources where not only the environmental stress is strong but also obtaining resistance is much easier comparing to other well studied hot spots including farms, hospitals, wastewater treatment plants and landfills where antibiotics but not ARGs are used or discharged. Therefore, Chapter 2 focused on emission source identification .11 Swiss biology laboratories working on different fields and located in the city center, suburb and rural area were studied to reveal the abundance and diversity of airborne ARGs in them and their surrounding areas with Colony-forming units (CFU) cultivation and quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Most biology laboratories did not discharge significant amounts or varieties of ARGs and cultivable bacteria via air. No correlation was found between the number of CFUs and the abundance of 16S rRNA, but two clusters of correlated airborne ARGs, the animal husbandry related cluster, and city and hospital related cluster were identified in this study. Although most biology laboratories may not be the emission sources of a wide variety of airborne ARGs, the ARGs in the animal husbandry related cluster which are abundant in the animal laboratories and *aadA1* which is abundant in the laboratories working on other

eukaryocytes need to be furtherly studied to make sure if they are potential health risks for the researchers.

Another gap in bioaerosol research is methodology standardization. While the pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) continues to threaten public health, various primers of reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) have been swiftly developed. Comparing their performances is very necessary for the optimization and standardization the detection and quantification method to assist the disease control. Furthermore, for developing countries, cheaper alternative molecular methods for SARS-CoV-2 identification can be crucial to prevent the next wave of infections. Therefore, in Chapter 2, we evaluated the 12 primer sets recommended by the World Health Organization (WHO) on testing both clinical patient and environmental samples with the gold standard diagnosis method: TaqMan-based RT-qPCR and a cheaper alternative method: SYBR Green-based RT-qPCR. We found that using suitable primer sets, such as ORF1ab, 2019_nCoV_N1 and 2019_nCoV_N3, the performance of the SYBR Green approach was comparable or even outperformed the TaqMan approach, even when considering the newly dominating or emerging variants, including Delta, Eta, Kappa, Lambda and Mu. ORF1ab and 2019_nCoV_N3 were found to be the best combination for sensitive and reliable SARS-CoV-2 molecular diagnostics due to their high sensitivity, specificity and broad accessibility.

Based on the results of Chapter 2, we furtherly collected outdoor airborne particulate matter (PM) samples from November 2019 to April 2020 in Bern, Lugano, and Zurich to study the correlations between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and other respiratory viruses, between viruses and environmental factors, and between viruses and human behavior changes due to the public health measures against COVID-19. Because similar studies are scarce on air surveillance of

the virus in outdoor non-healthcare environments which is also a current gap of the understanding of viral bioaerosols, although virus-laden particles have been commonly detected and studied in the aerosol samples from indoor healthcare settings. Among 14 detected viruses, influenza A, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, and HCoV-229E were abundant in air. SARS-CoV-2 and enterovirus were moderately common, while the remaining viruses occurred only in low concentrations. SARS-CoV-2 was detected in PM₁₀ (PM below 10 μm) samples of Bern and Zurich, and PM_{2.5} (PM below 2.5 μm) samples of Bern which exhibited a concentration positively correlated with the local COVID-19 case number. The concentration was also correlated with the concentration of enterovirus which raised the concern of coinfection. The estimated COVID-19 infection risks of an hour exposure at these two sites were generally low but still cannot be neglected. This study demonstrated the potential functionality of outdoor air surveillance of airborne respiratory viruses, especially at transportation hubs and traffic arteries.

However, there is no available detection and quantification method capable of fast, sensitive, specific and convenient onsite measuring for air surveillance and risk alarming. CRISPR diagnostics systems are potential candidates because they are fast and specific. Yet, current CRISPR diagnostics are either moderate sensitive enough or supersensitive, and rely heavily on pre-amplification which hinders their potential for quantification. To overcome this limitation, in Chapter 4, a new ultrasensitive CRISPR-Cas based nucleic acid detection system, named Paired-CRISPR-Cas-Only Identification Relay Origination Technique (POIROT) was developed to enable CRISPR-Cas12 cascade the signal to CRISPR-Cas13 for nucleic acid detection. The system was tested with two different DNA targets: the viral DNA of human monkey pox virus and *floR*, an antibiotic resistance gene against florfenicol. This system has an

impressive low limit of detection (LoD) of 1 copy/ μ l and a short responding time of 15 minutes. The system has potential for use in both diagnosis and environmental surveillance, and may provide new insights into the forms of DNAs in the environment. While the system has some limitations that need to be addressed, it offers promising potential for the development of high-performance artificial nucleic acid detection methods with CRISPR-Cas, particularly in environmental surveillance.

The findings in this thesis have improved the understanding of bioaerosols from several angles, and offered potential choices to narrow the gaps in bioaerosol research, paving the ways for future. These advancements can help scientists, public health planners, policymakers, and regulators to improve the air quality, and protecting the environment, and also provide suggestions and warnings to the public on self-protection, ultimately contributing to creating healthier conditions on our habitable planet together from both sides.

Zusammenfassung

Die Übertragung gefährlicher Stoffe und Organismen über Bioaerosole ist seit langem als wichtiges Risiko bekannt, wurde jedoch aufgrund der geringen Datenmenge, der methodischen Heterogenität und anderer Beschränkungen bisher nur unzureichend untersucht und verstanden. Daher wurden in dieser Arbeit hauptsächlich zwei verschiedene Arten gefährlicher Agenzien als Beispiele ausgewählt: Antibiotikaresistenzgene (ARG) und Viren der menschlichen Atemwege. Das Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Lücken in der Bioaerosolforschung zu schließen.

ARGs werden als eine weltweit aufkommende Bedrohung für das öffentliche Gesundheitswesen angesehen. Als besondere Orte, an denen sowohl Antibiotika als auch ARG direkt verwendet werden, sind biologische Labore kaum erforscht, aber potenziell wichtige Emissionsquellen, bei denen nicht nur die Umweltbelastung hoch ist, sondern auch die Erlangung von Resistenzen viel einfacher ist als bei anderen gut untersuchten Hotspots wie Bauernhöfen, Krankenhäusern, Kläranlagen und Deponien, in denen Antibiotika, aber keine ARG verwendet oder freigesetzt werden. Daher konzentrierte sich Kapitel 2 auf die Identifizierung von Emissionsquellen. 11 Schweizer Biologielabors, die in verschiedenen Bereichen tätig sind und sich im Stadtzentrum, in Vororten und in ländlichen Gebieten befinden, wurden untersucht, um die Häufigkeit und Vielfalt der in der Luft befindlichen ARGs in ihrer Umgebung mit Hilfe der Kultivierung koloniebildender Einheiten (KBE) und der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zu ermitteln. In den meisten Biologielabors wurden keine signifikanten Mengen von ARGs und kultivierbaren Bakterien über die Luft freigesetzt. Es wurde keine Korrelation zwischen der Anzahl der KBE und der Häufigkeit von 16S rRNA festgestellt, aber es wurden in dieser Studie zwei Cluster von korrelierten luftgetragenen ARGs identifiziert, der Cluster für die Tierhaltung und der Cluster für Städte und Krankenhäuser. Die meisten biologischen Labore sind keine Emissionsquellen von luftgetragenen ARGs. Jedoch kommen ARGs vom tierhaltungsbezogenen Cluster, häufig in Tierlabors vor und das *aadA1*-Gen ist vermehrt in Labors, die mit anderen Eukaryozyten arbeiten zu finden. Diese Risiken sollten weiter untersucht werden, um sicherzustellen, dass sie kein potenzielles Gesundheitsrisiko für die Forscher darstellen.

Eine weitere Lücke in der Bioaerosolforschung ist die geringe Standardisierung von

Methoden. Während die Coronavirus-Pandemie die öffentliche Gesundheit bedrohte, wurden rasch verschiedene Primer für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-qPCR) entwickelt. Der Vergleich ihrer Leistungen ist für die Optimierung und Standardisierung der Nachweis- und Quantifizierungsmethode zur Unterstützung der Krankheitsbekämpfung sehr wichtig. Darüber hinaus können kostengünstige, alternative molekulare Methoden zur Identifizierung von SARS-CoV-2 für Entwicklungsländer entscheidend sein, um die nächste Infektionswelle zu verhindern. Daher haben wir in Kapitel 2 die 12 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlenen Primer-Sets für die Untersuchung von klinischen Patienten- und Umweltproben mit der Goldstandard-Diagnosemethode bewertet: TaqMan-basierte RT-qPCR und eine kostengünstigere Alternativmethode: SYBR Green-basierte RT-qPCR. Wir fanden heraus, dass bei Verwendung geeigneter Primer-Sets wie ORF1ab, 2019_nCoV_N1 und 2019_nCoV_N3 die Leistung des SYBR-Green-Ansatzes mit der des TaqMan-Ansatzes vergleichbar war, oder diesen sogar übertraf, selbst wenn man die neu dominierenden oder neu aufkommenden Varianten, einschließlich Delta, Eta, Kappa, Lambda und Mu, berücksichtigt. ORF1ab und 2019_nCoV_N3 erwiesen sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und breiten Zugänglichkeit als beste Kombination für eine genaue und zuverlässige molekulare Diagnostik von SARS-CoV-2.

Basierend auf den Ergebnissen von Kapitel 2 haben wir von November 2019 bis April 2020 in Bern, Lugano und Zürich Feinstaubproben gesammelt, um die Zusammenhänge zwischen SARS-CoV-2 und anderen Atemwegsviren, zwischen Viren und Umweltfaktoren sowie zwischen Viren und menschlichen Verhaltensänderungen aufgrund der öffentlichen Gesundheitsmaßnahmen gegen COVID-19 zu untersuchen. Ähnliche Studien zur Luftüberwachung des Virus in Außenbereichen außerhalb des Gesundheitswesens sind rar, was ebenfalls eine aktuelle Lücke im Verständnis viraler Bioaerosole darstellt, obwohl virusbeladene Partikel häufig in Aerosolproben aus Innenräumen des Gesundheitswesens nachgewiesen und untersucht wurden. Unter den 14 nachgewiesenen Viren waren Influenza A, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 und HCoV-229E in der Luft besonders häufig vertreten. SARS-CoV-2 und Enterovirus waren mäßig häufig, während die übrigen Viren nur in geringen Konzentrationen vorkamen. SARS-CoV-2 wurde in PM10-Proben (Feinstaub unter 10 µm) von Bern und Zürich sowie in PM2,5-Proben (Feinstaub unter 2,5 µm) von Bern nachgewiesen, deren Konzentration positiv mit der lokalen COVID-19-

Fallzahl korrelierte. Die Konzentration war auch mit der Konzentration von Enteroviren korreliert, was die Gefahr einer Co-Infektion nahelegte. Das geschätzte COVID-19-Infektionsrisiko bei einer stündlichen Exposition an diesen beiden Standorten war im Allgemeinen gering, kann aber dennoch nicht vernachlässigt werden. Diese Studie zeigt den potenziellen Nutzen der Überwachung von Atemwegsviren in der Aussenluft, insbesondere an Verkehrsknotenpunkten und Verkehrsadern.

Es gibt jedoch keine verfügbaren Nachweis- und Quantifizierungsmethoden, die eine schnelle, empfindliche, spezifische und bequeme Vor-Ort-Messung zur Luftüberwachung und Risikowarnung ermöglichen. CRISPR-Diagnostiksysteme (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats) sind potenzielle Kandidaten, da sie schnell und spezifisch sind. Die derzeitigen CRISPR-Dx-Systeme sind jedoch entweder nur mäßig empfindlich oder überempfindlich und hängen stark von den vorhergehenden Amplifikationen der Sequenzen ab, was ihre Möglichkeiten zur Quantifizierung einschränkt. Um diese Einschränkung zu überwinden, wurde in Kapitel 4 ein neues, ultrasensitives, mit CRISPR-Cas-Proteinen assoziiertes Nukleinsäure-Nachweissystem entwickelt: Paired-CRISPR-Cas-Only Identification Relay Origination Technique (POIROT). Dieses System ermöglicht CRISPR-Cas12 das Signal an CRISPR-Cas13 für den Nukleinsäure-Nachweis weiterzuleiten. Das System wurde mit zwei verschiedenen DNA-Zielen getestet: der viralen DNA des menschlichen Affenpockenvirus und floR, einem ARG gegen Florfenicol. Dieses System beeindruckt durch seine niedrige Nachweisgrenze von 1 Kopie/ μ l und eine kurze Reaktionszeit von 15 Minuten. Das System hat das Potenzial, sowohl für die Diagnose als auch für die Umweltüberwachung eingesetzt zu werden, und kann neue Erkenntnisse über die Formen von DNA in der Umwelt liefern. Auch wenn das System noch Einschränkungen aufweist, welche behoben werden müssen, bietet es ein vielversprechendes Potenzial für die Entwicklung leistungsstarker künstlicher Nukleinsäure-Nachweisverfahren mit CRISPR-Cas, insbesondere für die Umweltüberwachung.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse haben das Verständnis von Bioaerosolen aus verschiedenen Blickwinkeln verbessert und öffnen Möglichkeiten die Lücken in der Bioaerosolforschung zu schliessen. Diese Fortschritte können Wissenschaftlern, Planern des öffentlichen Gesundheitswesens, politischen Entscheidungsträgern und Aufsichtsbehörden dabei helfen, die Luftqualität besser zu überwachen und die Umwelt

zu schützen. Ebenfalls können sie auch der Öffentlichkeit Vorschläge und Warnungen zum Selbstschutz liefern.