



PROVE SPERIMENTALI PER LA RICERCA DI AGENTI VIRALI

m. zampini¹, g. formenton¹, f. rigoli¹, b. zanolin¹, a. salomoni¹,
t. baldovin², a. pivato²

1 ARPA Veneto 2 Università di Padova

LA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO

21-22 NOVEMBRE 2022

Terni / Sala Convegni Maurizio Santoloci
Via Carlo Alberto dalla Chiesa, 32



SCUOLA ALTA
FORMAZIONE
AMBIENTALE

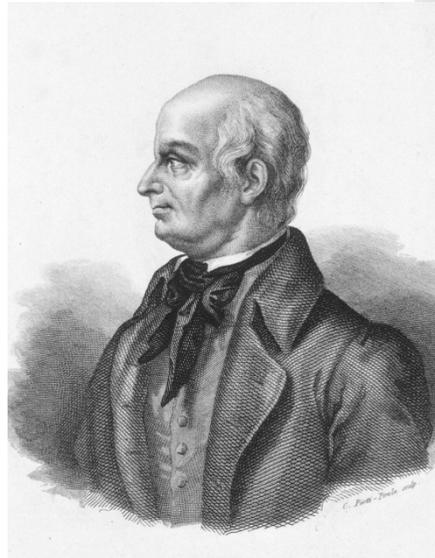


MIASMI ED UMORI

Nella prima metà del XVI secolo, Giorgio Agricola nel De peste riteneva «causa comune della malattia» l'aria corrotta da esalazioni originate dalla putrefazione dei cadaveri, da paludi o da specchi d'acqua stagnante, da caverne: «in quest'aria l'agente "infettivo" è un veleno di qualità calda che, inalato dai polmoni, raggiunge il cuore e tutte le altre parti corporee che vengono in tal modo accese da una febbre pestilenziale tisica»

(Cipolla 1989, 15-16. 22; Benvenuto 1996, 69-70)

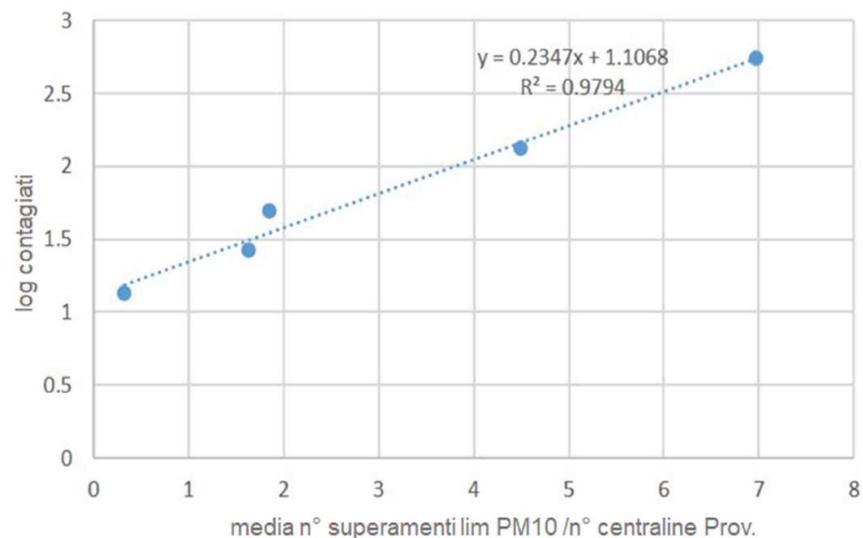
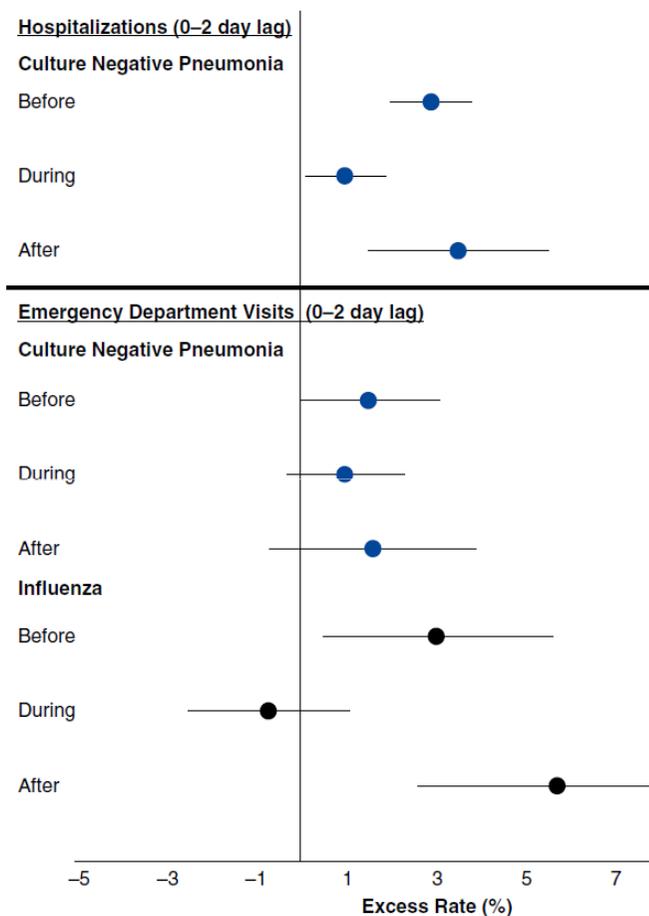
Lazzaro
Spallanzani
(1729-1799)



S A G G I O
DI OSSERVAZIONI
MICROSCOPICHE
CONCERNENTI IL SISTEMA
DELLA GENERAZIONE
DE' SIGNORI
DI NEEDHAM,
E BUFFON.



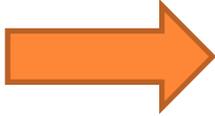
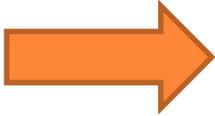
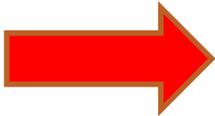
INQUINANTI ATMOSFERICI E MALATTIE POLMONARI



Società Italiana di Medicina Ambientale. 2020. Relazione circa l'effetto dell'inquinamento da particolato atmosferico e la diffusione di virus nella popolazione.

Tasso di eccesso con intervallo di confidenza al 95% di ricoveri e visite di reparto per polmonite e influenza associate a ciascun interquartile di aumento della portata della concentrazione di inquinamento atmosferico da particolato fine di 2,5 mm di diametro con periodo di ritardo da 0 a 2 giorni per periodo.

GLI INQUINANTI DELL'ARIA

- Ozono  Irritazione alle alte vie aeree, reazioni di ossidazione radicalica
- Ossidi di azoto  Irritazione delle alte vie aeree, reazioni di ossidazione radicalica
- Anidride solforosa  Complicazioni polmonari
- Ossido di carbonio  Si lega indissolubilmente all'emoglobina
- COV  Leucemie, epato e neurotossicità

DIMENSIONI

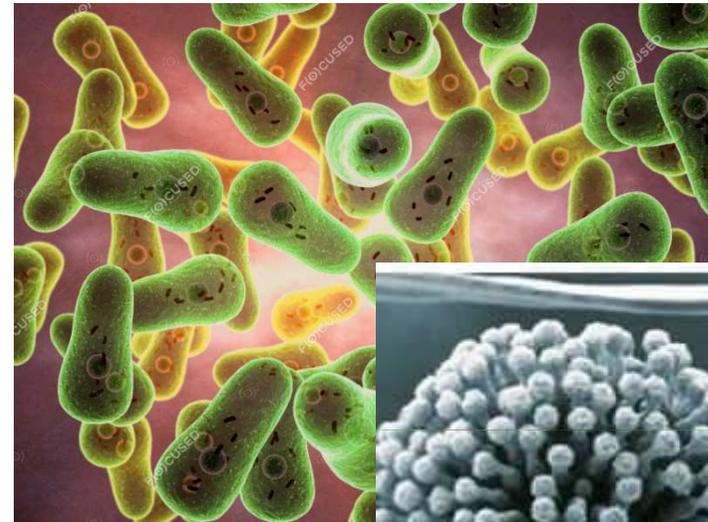
Tipi di particelle	Dimensioni in micron
fumi	0.001 – 0.1
nuclei di condensazione	0.1 - 20
polveri	0.1 – alcuni mm
virus	0.015 – 0.45
batteri	0.3 - 10
spore fungine	1.0 - 100
alghe	0.5 – alcuni mm
frammenti di licheni	1.0 – alcuni mm
protozoi	2.0 – alcuni mm
spore di Briofite	6.0 – 30
spore di Pteridofite	20 – 60
pollini	10 – 100
frammenti vegetali e animali, semi, insetti	> 100

TRASMISSIONE PER VIA AEREA

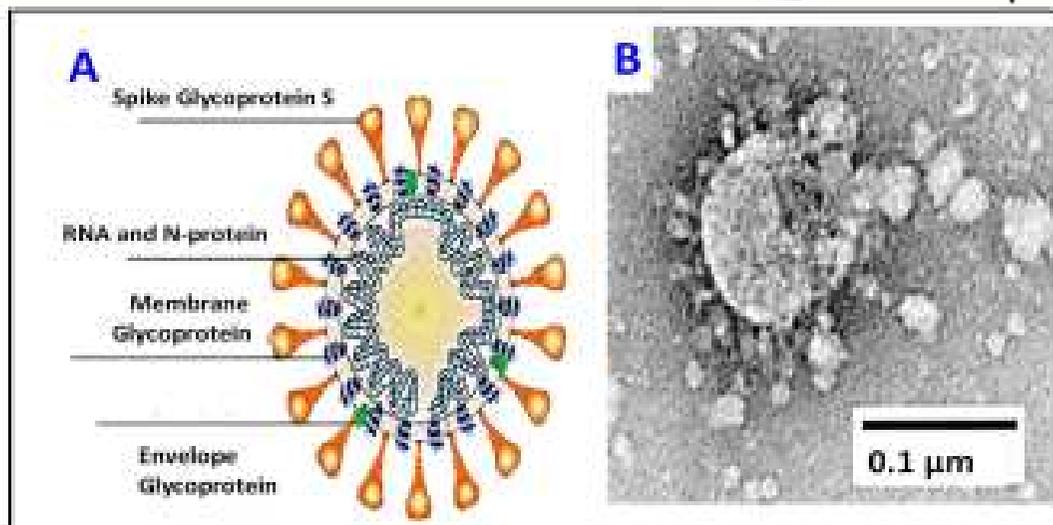
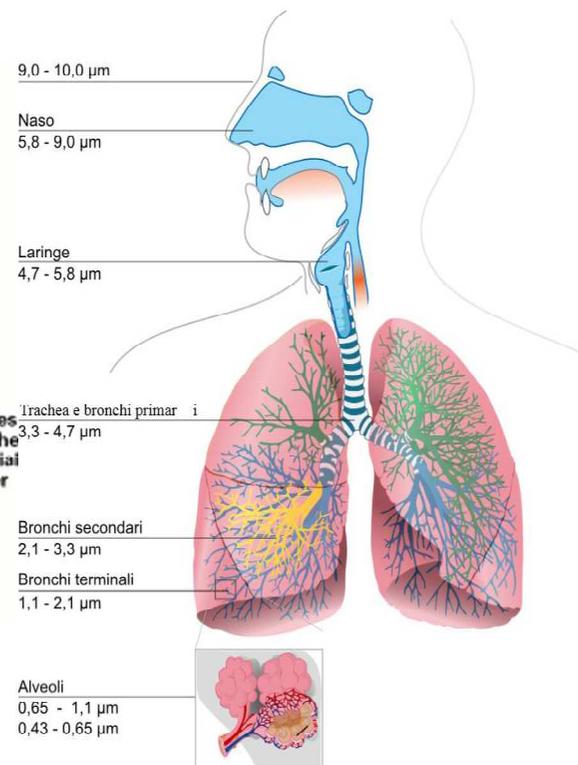
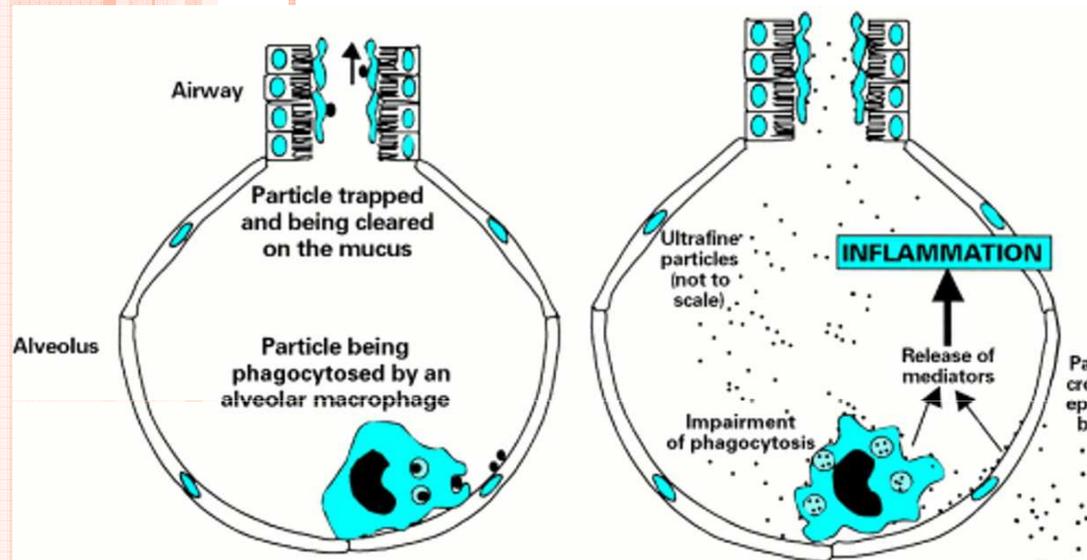
- Batterio della Legionella
(*Legionella pneumophila*)
- Batterio della Febbre Q
(*Coxiella burnetii*)
- Brucellosi
(genere *Brucella*)
- Aspergillosi
(*Aspergillus fumigatus* ed *Aspergillus niger*)

Etc.etc. etc.

6



IL PARTICOLATO



MODELLO SPERIMENTALE INIZIALE



Sampling: 55.2 m³ of air were collected on 47 mm Ø quartz fiber filters for 24h



Filter conservation: filters were frozen at -20°C after removal from sampler



PM recovery: two cycles in water bath sonicator at 50 KHz for 2', with 5 mL of 9:1 methanol-water solvent



Sample processing: the solvent (10 mL) was centrifuged at 5500 g for 15' to separate the pellet from supernatant



RNA extraction was performed directly from the resuspended pellet, whereas the supernatant was concentrated to a volume of 200 µL prior to purification



Supernatant + IPC:
Qiagen Viral RNA mini kit
(extraction vol. 140 µL;
elution vol. 60 µL)

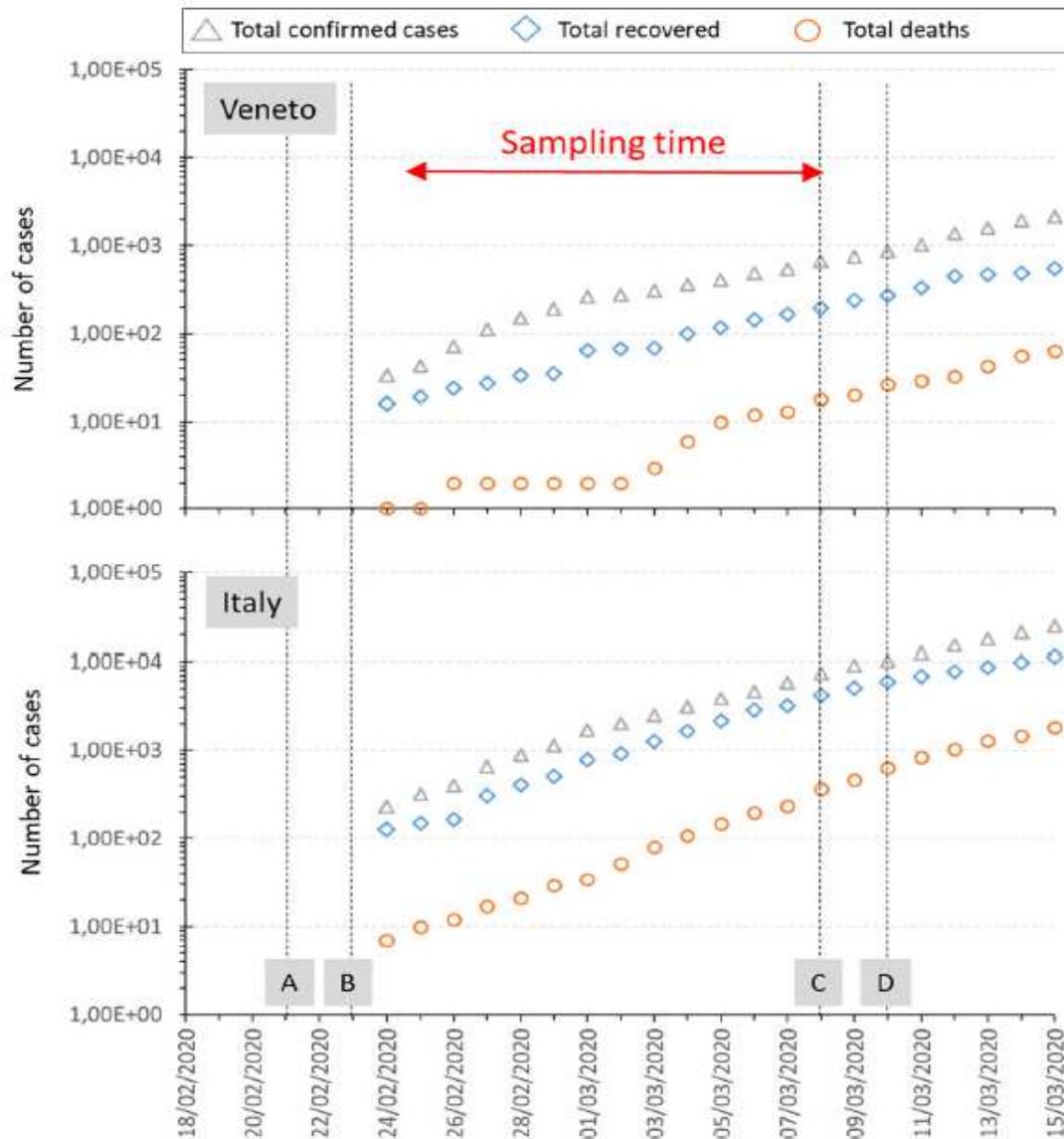


Pellet + IPC:
QuickRNA fecal/soil kit
(extraction vol. 400 µL;
elution vol. 15 µL)

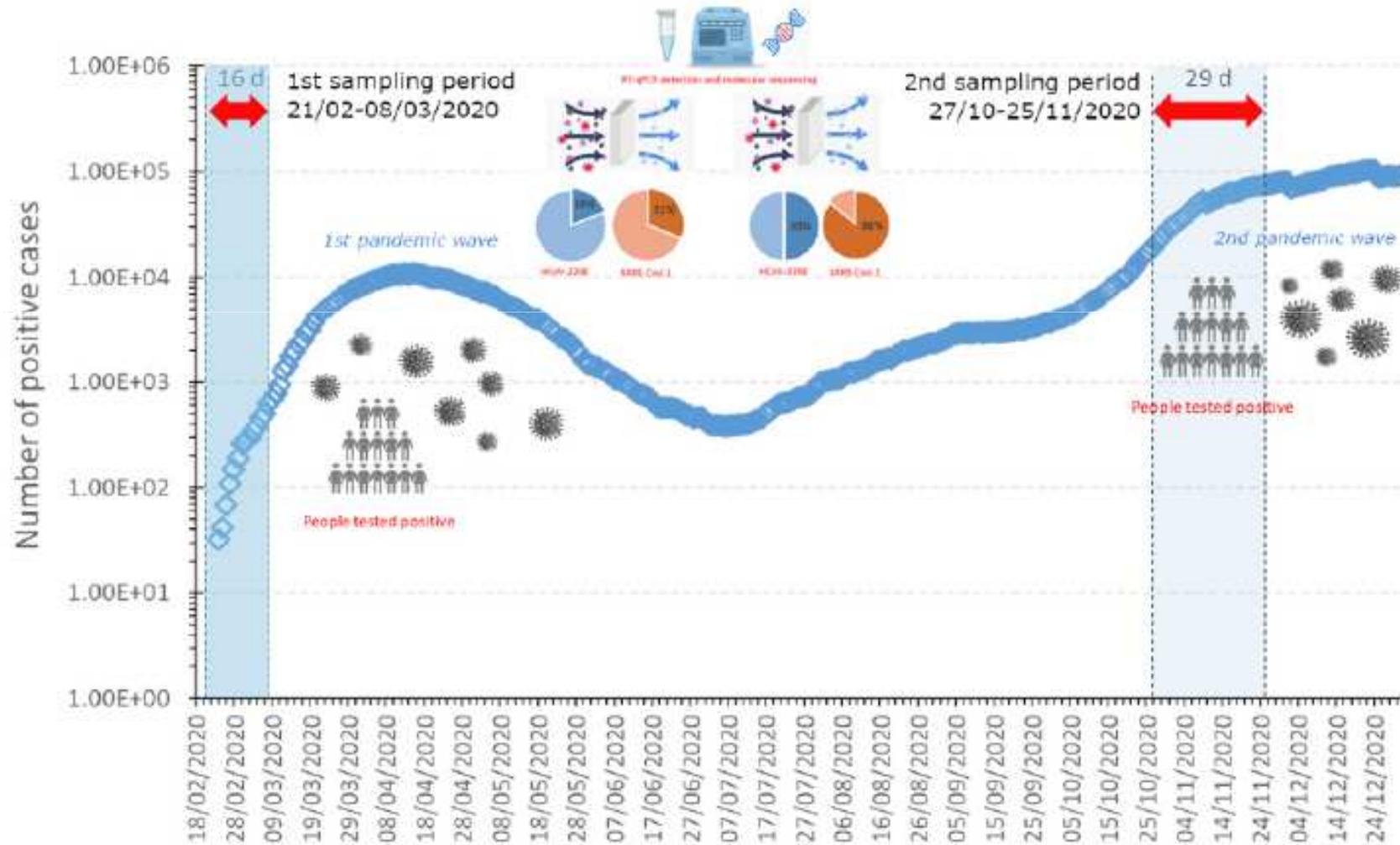


One-step RT-qPCR:
SARS-CoV-2 targets: genes N, ORF1b-nsp14
IPC (SARS-CoV-2 aRNA) target: gene E

PARTE SPERIMENTALE I FASE



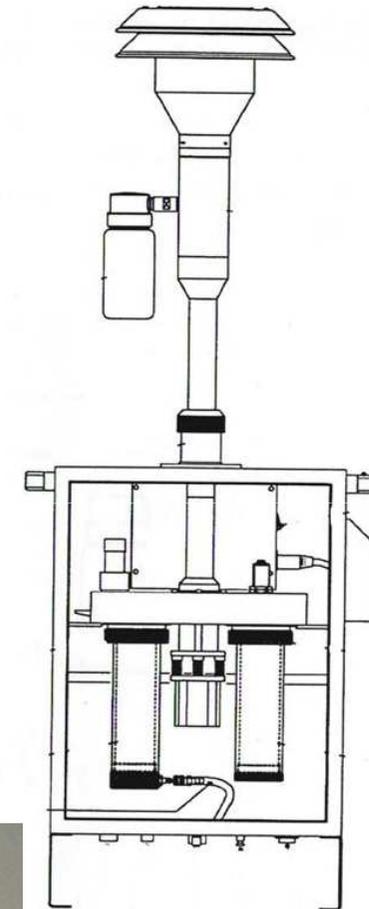
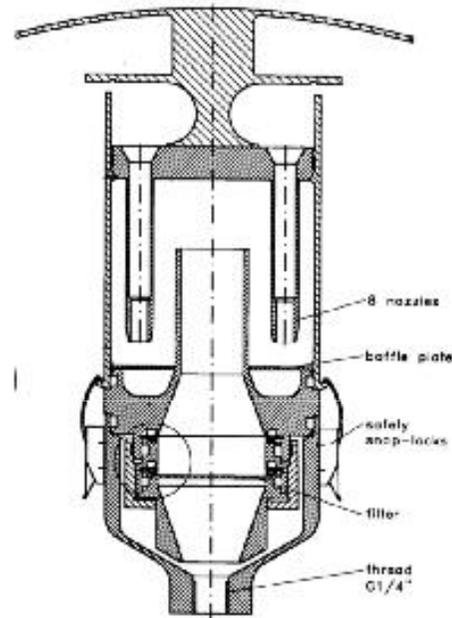
PERIODO SPERIMENTALE II FASE



PUNTI CRITICI

- Tipologia del filtro da utilizzare
- Stress di campionamento per eccesso di perdita di carico
- Tempo di conservazione
- Temperatura di conservazione
- Modalità di estrazione del RNA
- Possibili interferenti in fase di estrazione

SISTEMI DI CAMPIONAMENTO



UNI EN 12341:2014



METODO DI ANALISI

ESTRAZIONE

Aggiunti 8 mL di soluzione estraente (guanidina Biomerieux) ad ogni quarto di filtro in tubi falcon da 50 mL.

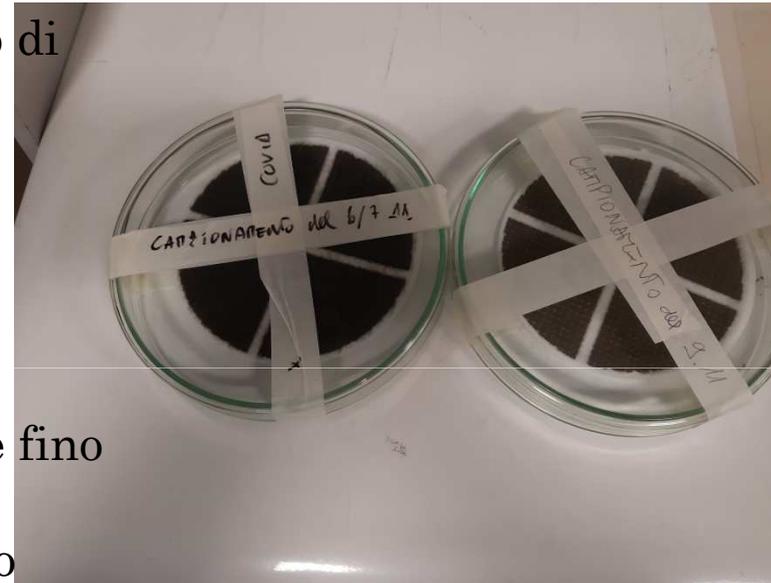
Agitazione per 30 minuti.

Decantazione del filtro

Aggiunti 50 μ L di resina magnetica (Biomerieux), attesi 10 minuti

centrifugazione a 1500 g per 2 minuti, eliminazione dell'eccesso di surnatante fino ad arrivare ad un volume di 2 mL

eseguita l'estrazione come da protocollo Biomerieux con piattaforma Egene_UP.



PURIFICAZIONE

campioni estratti sottoposti a fase di eliminazione degli inibenti mediante kit one step inhibitor removal kit ed amplificati tal quale.

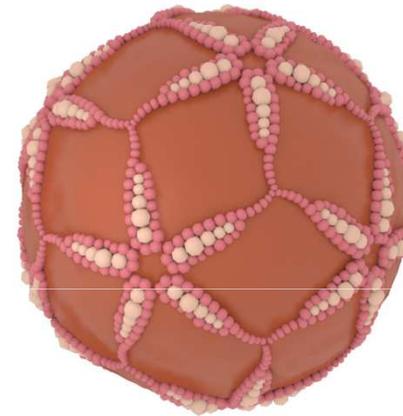
PROVE SU FILTRO I

Filtri in quarzo, campionamento di 48 ore.
Filtro suddiviso in 4 parti. Inoculati 10 μ L di Mengovirus prima del campionamento su due parti
Inoculati 10 μ L sulle altre due parti appena prima della fase di estrazione.

RISULTATI

percentuale di recupero molto basse. Nessuna apprezzabile differenza tra Mengovirus inoculato fresco e 48 ore prima.

I filtri in quarzo assorbono la soluzione di guanidina e formano con essa una sostanza gelatinosa che poi interferisce con la resina magnetica rendendola meno performante



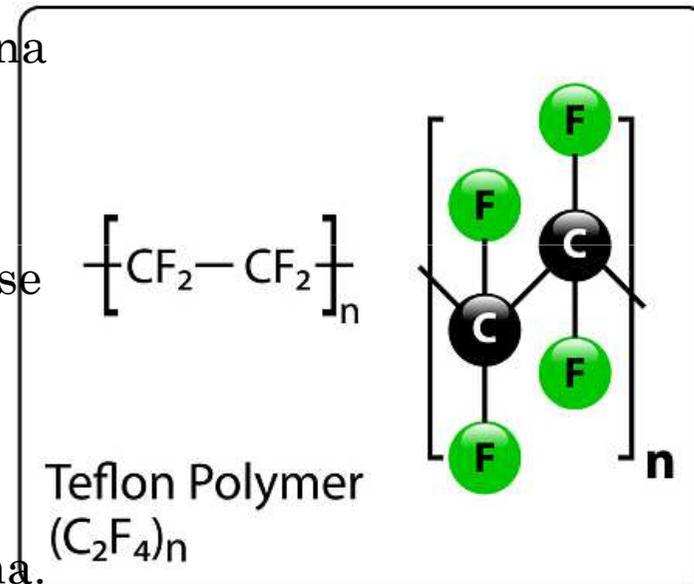
Mengovirus modificato
Diametro 30 nm

PROVE SU FILTRO II

Filtri di teflon, campionamento di 18 ore.
Filtro suddiviso in 4 parti.
Inoculati 10 μL di Mengovirus prima del campionamento su due parti
Inoculati 10 μL sulle altre due parti appena prima della fase di estrazione.

RISULTATI

Percentuale di recupero ancora molto basse per i campioni amplificati tal quale.
Recuperi 10 volte superiori con campioni diluiti 1:10.
Nessuna apprezzabile differenza tra Mengovirus inoculato fresco e 18 ore prima.
I filtri in teflon non assorbono la soluzione e non formano aggregati interferenti.
La diluizione 1:10 migliora il risultato finale (probabile eliminazione di sostanze che mascherano o inibiscono la fase di amplificazione)



PROVE SU FILTRO III

Filtri di teflon, campionamento di 12 ore. Filtro suddiviso in 4 parti. Inoculati 10 μ L di Mengovirus prima del campionamento su due parti. Innoculati 10 μ L sulle altre due parti appena prima della fase di estrazione.

RISULTATI

percentuale di recupero ancora molto basse per i campioni amplificati tal quale. Recuperi 10 volte superiori con campioni diluiti 1:10. Non risulta chiara l'efficacia della centrifugazione in fase di estrazione. Nessuna grossa differenza tra Mengovirus inoculato fresco e 12 ore prima. I risultati ottenuti con un volume di soluzione estraente di 2 mL sono paragonabili a quelli ottenuti con volumi superiori.

Durante il tempo di campionamento non si nota apprezzabile diminuzione (degradazione) del materiale genetico virale di riferimento (Mengovirus).

AMPLIFICAZIONE

Il processo di amplificazione dell'RNA virale è stato eseguito mediante PCR real-time ed ha permesso la determinazione del recupero:



Apparecchiatura utilizzata: termociclatore C1000 Touch™ provvisto di unità ottica CFX96 Deep Well™ per PCR Real Time Bio-rad

Mix per la determinazione del Mengovirus:
AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents della Applied BioSystems



Primers, probes e Mengovirus:
CeeramTools® PCR kit bioMeriérieux

BIBLIOGRAFIA

- **Evaluating the presence of SARS-CoV-2 RNA in the particulate matters during the peak of COVID-19 in Padua, northern Italy**
Science of the Total Environment 784 (2021) 147129
- **SARS-CoV-2 in Atmospheric Particulate Matter: An Experimental Survey in the Province of Venice in Northern Italy**
Int. J. Environ. Res. Public Health 2022, 19, 9462.
- **First data analysis about possible COVID-19 virus airborne diffusion due to air particulate matter (PM): The case of Lombardy (Italy)**
Environmental Research 186 (2020) 109639
- **SARS-Cov-2RNA found on particulate matter of Bergamo in Northern Italy: First evidence**
Environmental Research 188 (2020) 109754
- **On the concentration of SARS-CoV-2 in outdoor air and the interaction with pre-existing atmospheric particles.**
Environ. Res. 2020, 193, 110603
- **SARS-CoV-2 airborne transmission: A validated sampling and analytical method**
Environ. Res. 2021, 200, 111783.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

