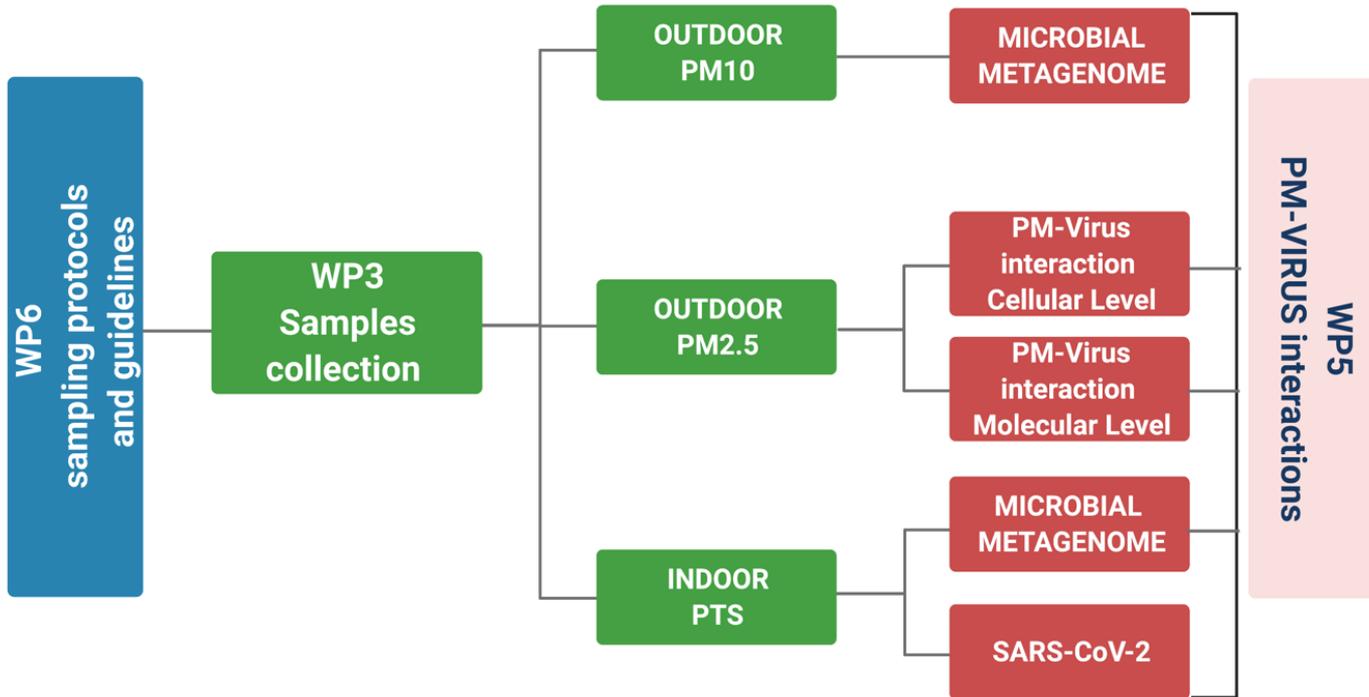


# **Virus e PM: quali eventi molecolari nell'interazione PM e SARS-CoV-2?**

**Annamaria Colacci**  
**Agenzia Regionale Prevenzione, Ambiente e Energia  
(Arpae), Emilia-Romagna**







## Base razionale dello studio

- **ESISTE UN'INTERAZIONE BIOLOGICAMENTE PLAUSIBILE FRA INQUINAMENTO ATMOSFERICO E LA PANDEMIA DI COVID-19?**
  - *Il virus interagisce direttamente con il particolato atmosferico?*
    - 5.2 Analisi dell'interazione fra PM e virus modello e identificazione degli effetti delle componenti del PM sulla vitalità virale
  - *L'inquinamento influenza la gravità di COVID-19?*
    - 5.3 Studi degli eventi molecolari derivanti dall'interazione dei meccanismi di azione del PM e SARS-CoV-2

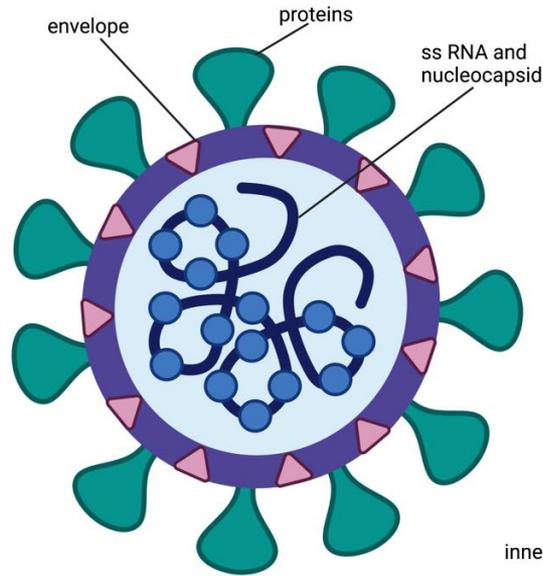


# La plausibilità biologica

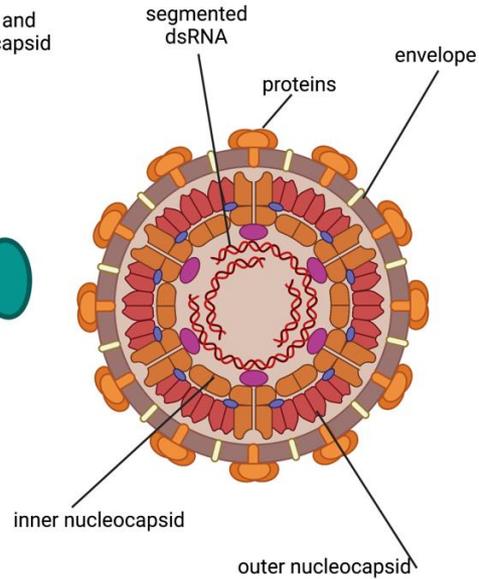
- La plausibilità biologica rappresenta un determinante critico che mette in relazione una causa e un effetto
- Consistenza e credibilità dei risultati sperimentali o osservazionali o clinici rispetto alle correnti conoscenze scientifiche in campo biologico
- Rinforza il nesso di causalità sulla base dei meccanismi che determinano la malattia
- Processo di comprensione ancorato
  - ai meccanismi che sottendono la relazione tra un evento biologico e un esito avverso o una malattia
  - a una gerarchia di livelli di informazione, che possono essere scomposti in ulteriori sottolivelli,



## 5.2 Analisi dell'interazione fra PM e virus modello e identificazione degli effetti delle componenti del PM sulla vitalità virale

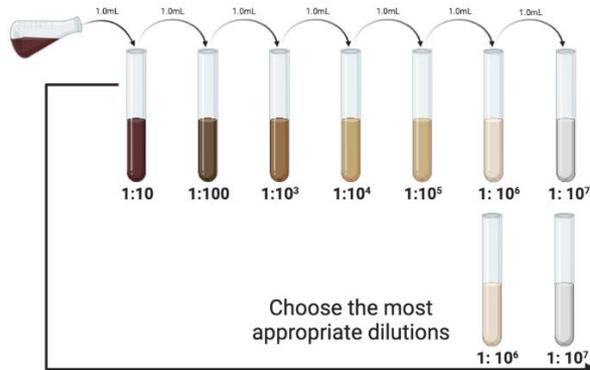


Coronaviruses



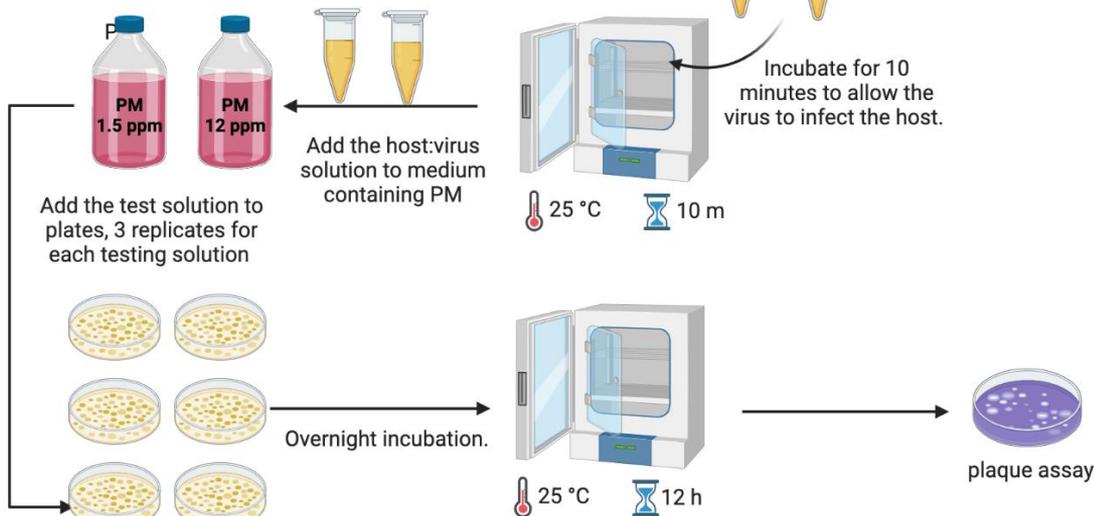
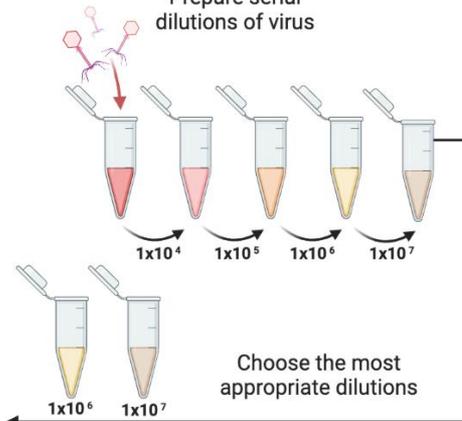
Bacteriophage Phi6

Prepare serial dilutions of bacteria

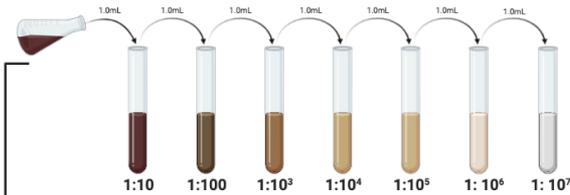


Virus plaque assay Method 1

Prepare serial dilutions of virus



### Prepare serial dilutions of bacteria

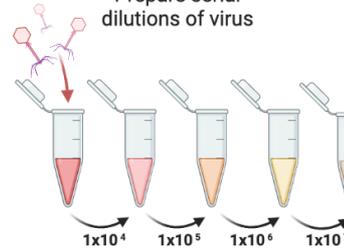


Choose the most appropriate dilutions

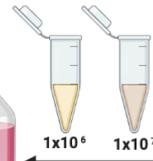


### Virus plaque assay Method 2

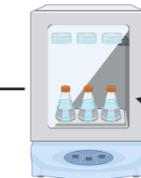
### Prepare serial dilutions of virus



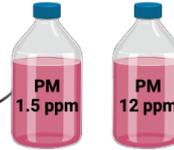
Choose the most appropriate dilutions



Add the host solution to PM:virus solution

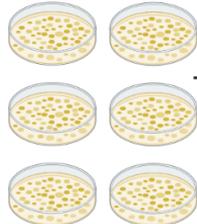


Incubated shaker  
⌚ 30 or 60 min

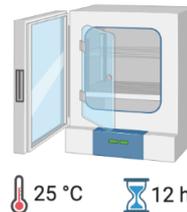


25 °C ⌚ 10 m  
Incubate for 10 minutes to allow PM and virus react with the host.

Add the test solution to plates, 3 replicates for each testing solution



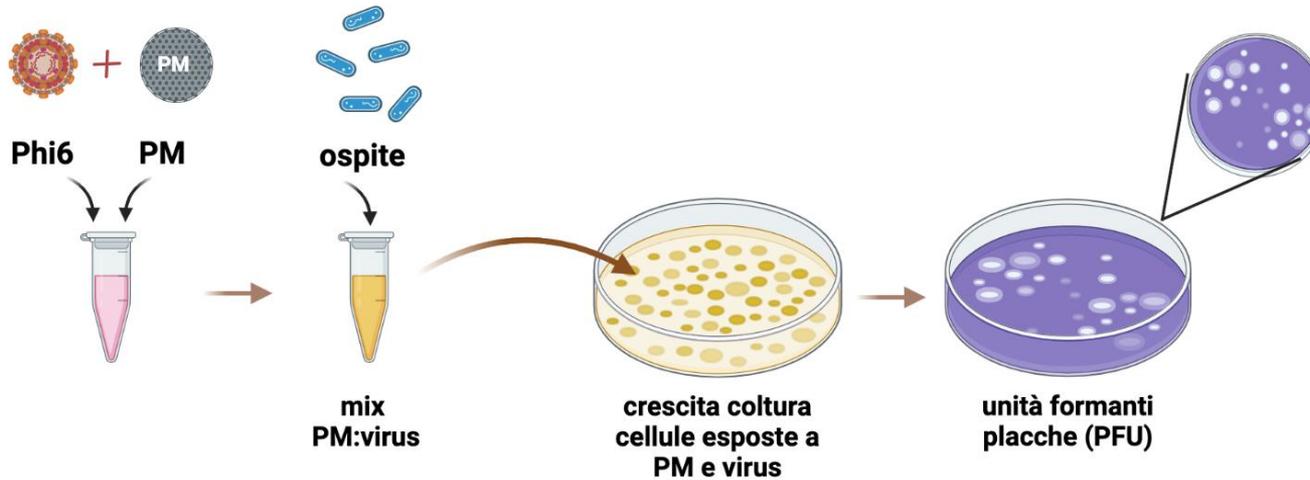
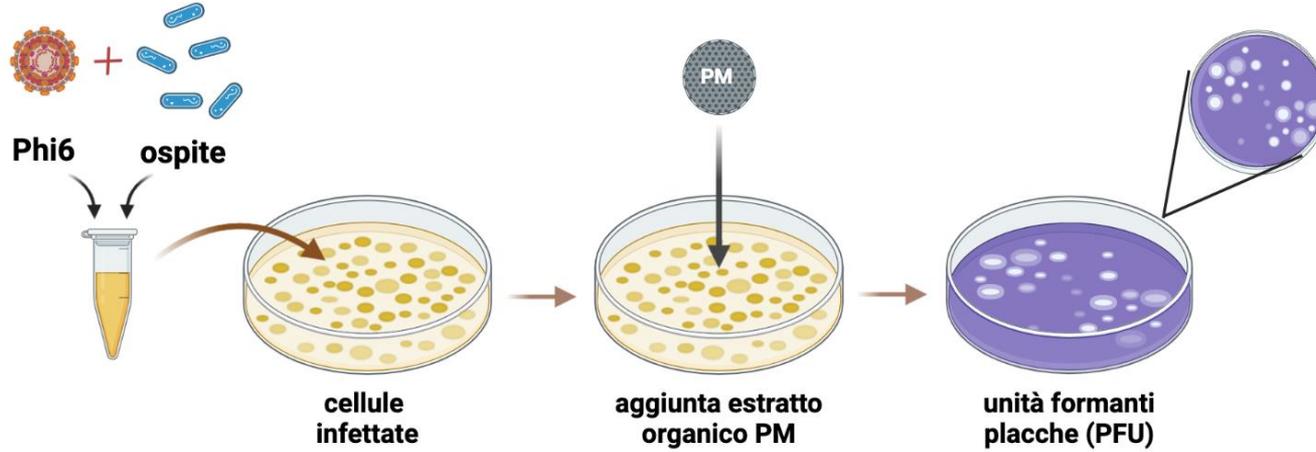
Overnight incubation.



25 °C ⌚ 12 h



plaque assay



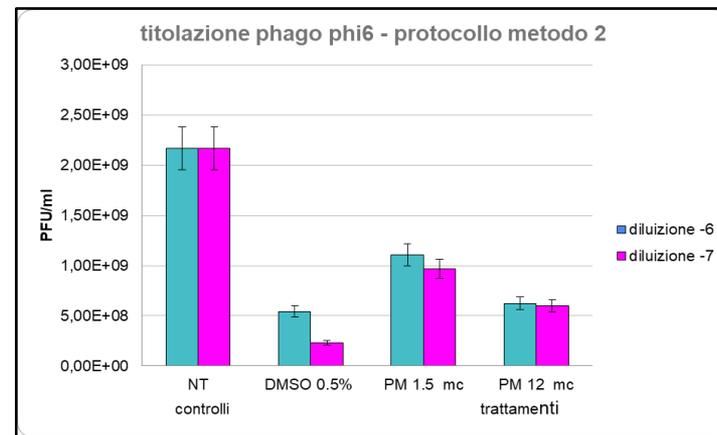
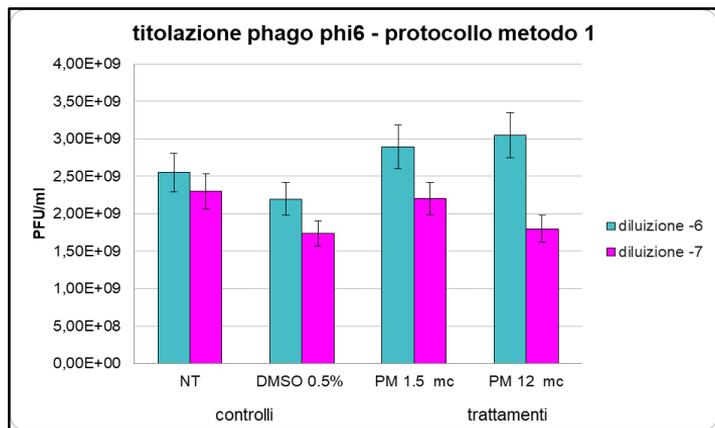


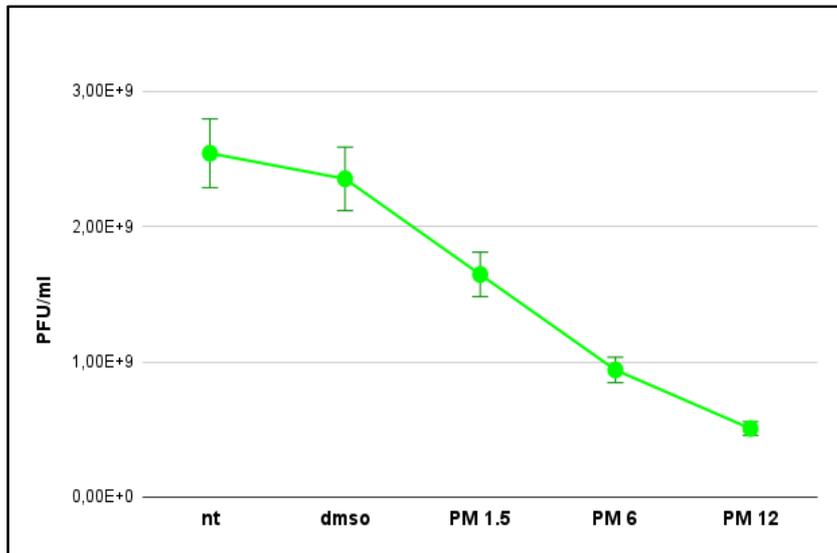
Grafico 1: risultati titolazione phago phi6 - protocollo metodo 1 – NT: non trattati

Graf.2: risultati titolazione fago - Trattamento del solo Fago a Temperatura ambiente in SM Buffer per 1 ora - protocollo metodo 2 –NT: non trattati

# Definizione del “*main assay*” e valutazione degli effetti di PM<sub>2.5</sub>

5.2

- scelta del metodo: il protocollo Metodo 2
- concentrazione del solvente DMSO 0.1%
- analizzate **tre** differenti dosi di estratto organico di PM<sub>2.5</sub> : 1.5 m<sup>3</sup>, 6 m<sup>3</sup> e 12 m<sup>3</sup>.
- piastra/trattamento come controllo della crescita dell’ospite.
- diluizione del fago phi6 scelta è stata la -6
- 5 repliche per ogni trattamento.



I risultati ottenuti ci danno una informazione quantitativa, cioè basata sul numero di PFU formati in seguito a trattamento. Possiamo affermare con certezza che le due dosi (6 m<sup>3</sup> e 12 m<sup>3</sup>) di estratto organico di particolato atmosferico determinano un effetto altamente inibitorio sulla replicazione virale, manifestando un effetto dose risposta in base alla concentrazione di PM analizzate. Anche la più bassa dose 1.5 m<sup>3</sup> di PM<sub>2.5</sub> risulta avere degli effetti significativi rispetto ai due gruppi di controllo.

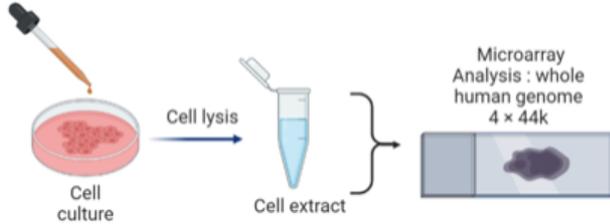
Graf 3: risultati titolazione phago phi6 - PFU/ml in seguito a trattamento



## 5.3 Studi degli eventi molecolari derivanti dall'interazione dei meccanismi di azione del PM e SARS-CoV-2

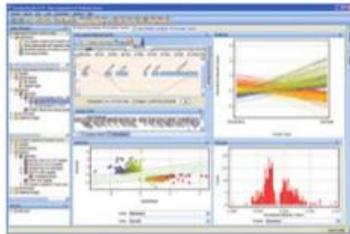
### Utilizzo di due modelli cellulari e trattamento con PM pre-pandemia (Progetto Supersito)

T47D e A549 Trattate con estratti organici di PM (8m<sup>3</sup> e 12m<sup>3</sup>)



### Analisi Statistica effettuata nell'ambito del Progetto Supersito

Two Samples analysis T-test Trattati Vs Controlli DMSO P < 0.05 Benjamini-Hockberg



### RECETTORI di interesse espressi

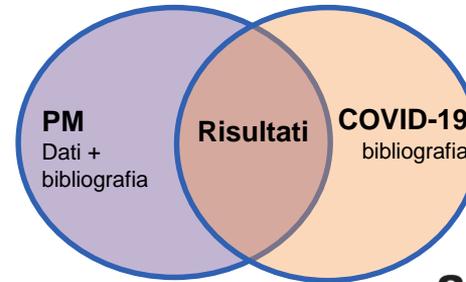
- AhR
- ACE2
- AT1
- AT2
- MAS

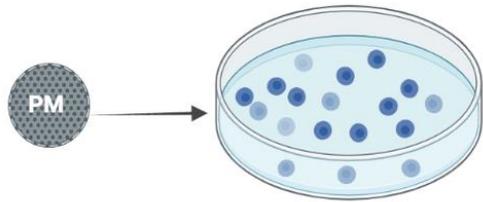
### Progetto Pulviris: Analisi delle liste Geniche e Ricerche bibliografiche su COVID-19

Analisi Biologica con Metacore

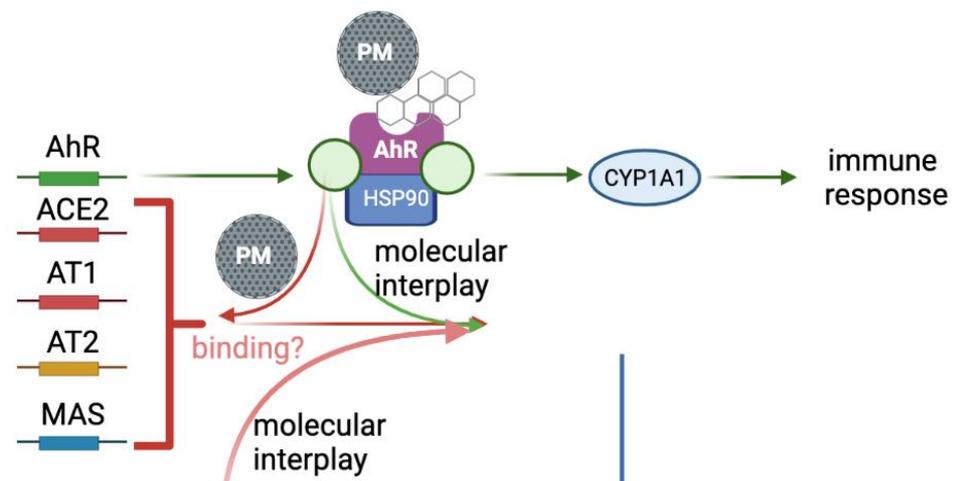
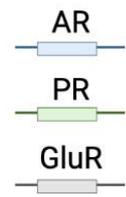


Individuazione di meccanismi molecolari comuni con target l'endotelio

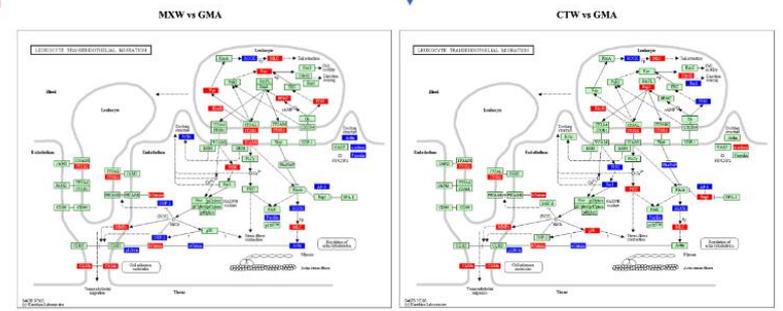
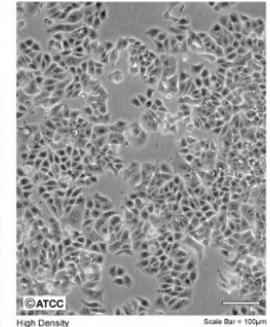
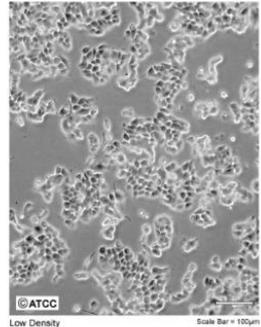


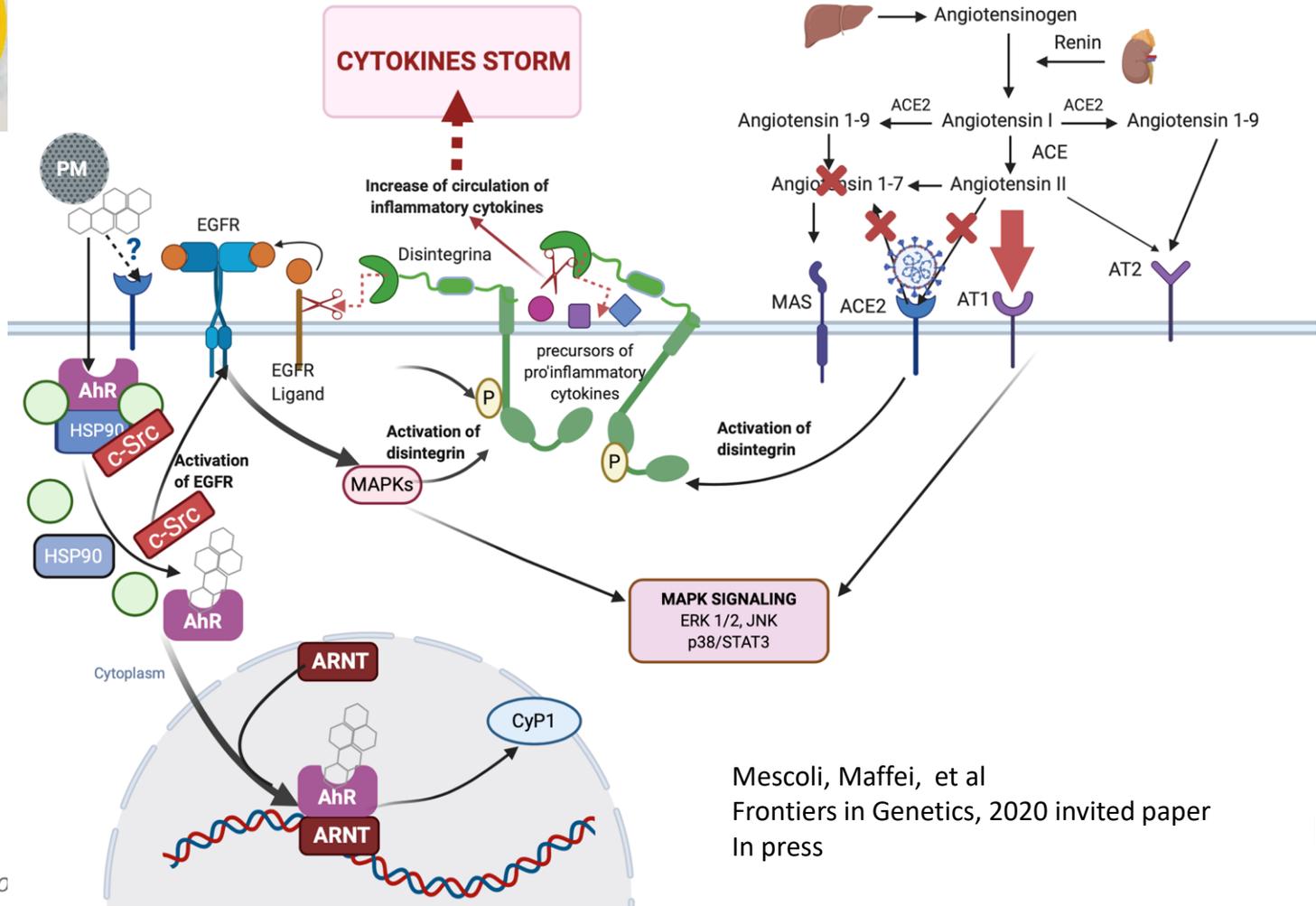


T47D cells

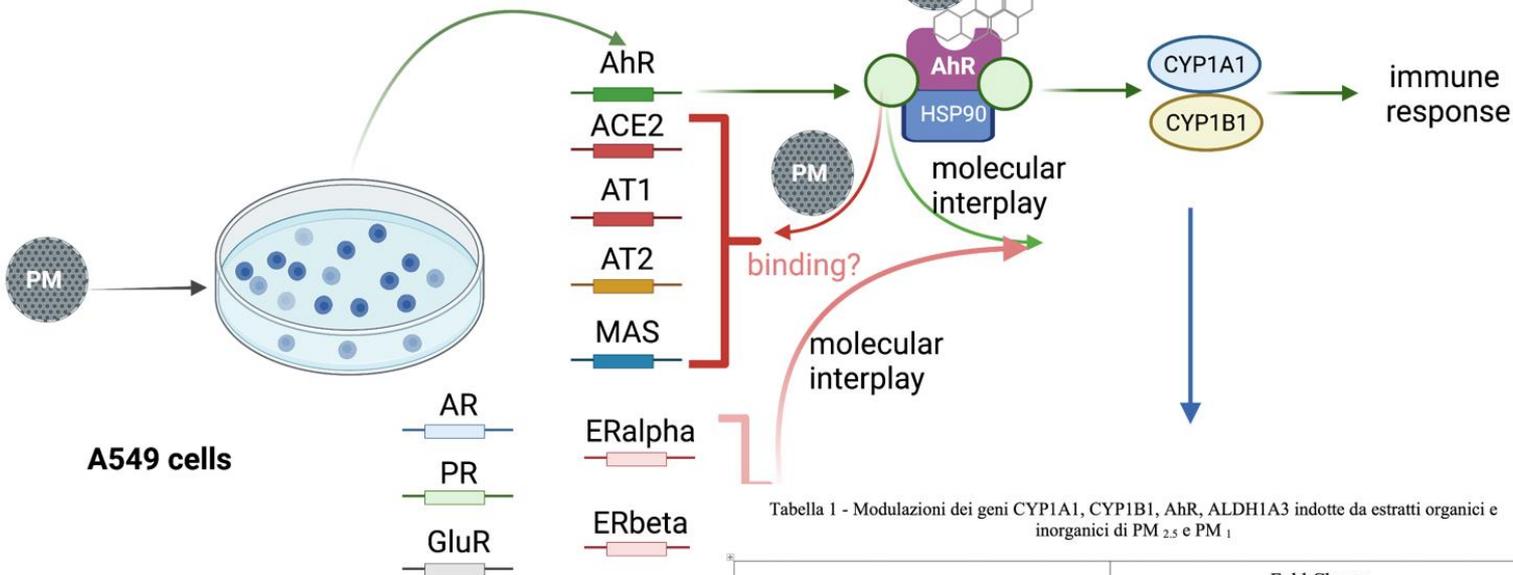


ATCC Number: HTB-133  
Designation: T-47D





Mescoli, Maffei, et al  
Frontiers in Genetics, 2020 invited paper  
In press



A549 cells

ATCC Number: CCL-185  
Designation: A-549

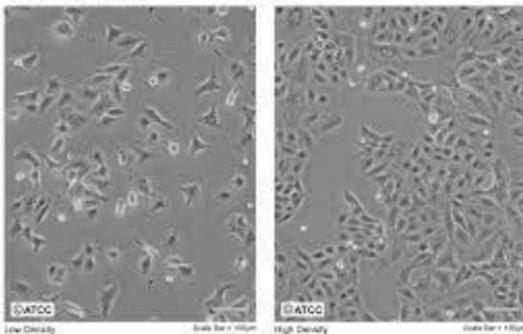
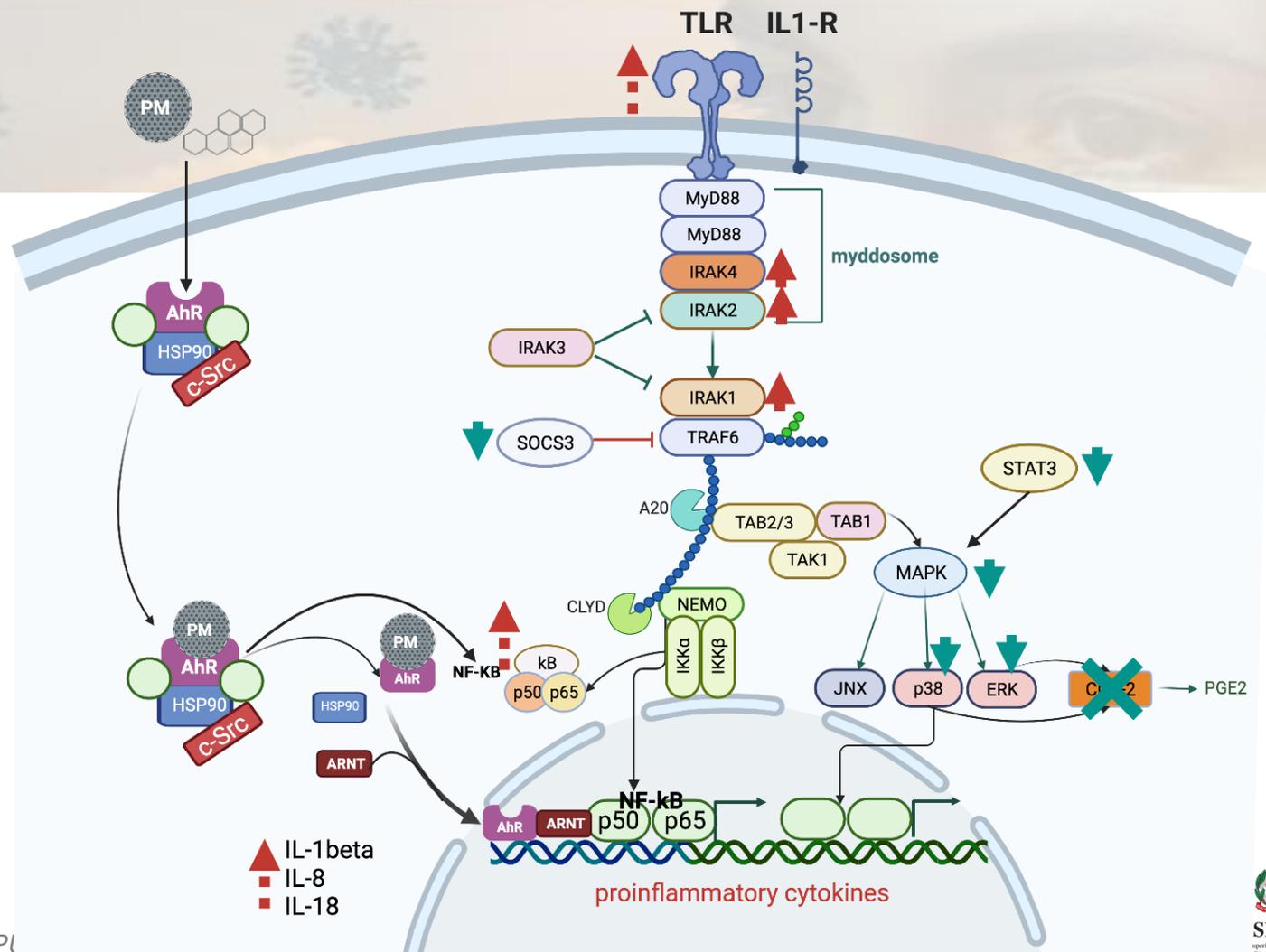


Tabella 1 - Modulazioni dei geni CYP1A1, CYP1B1, AhR, ALDH1A3 indotte da estratti organici e inorganici di PM<sub>2.5</sub> e PM<sub>1</sub>

	Fold Change			
	CYP1A1	CYP1B1	Ahr	ALDH1A3
Estratti organici (PM <sub>2.5</sub> e PM <sub>1</sub> ) vs DMSO (p<0.05; multiple testing correction: Benjamin-Hochberg)	3.53	1.93	1.9	1.66
Estratti inorganici (PM <sub>2.5</sub> e PM <sub>1</sub> ) vs NT (p<0.05; multiple testing correction: no correction)	2.82	1.89	1.81	1.63

5.3



▲ IL-1beta  
■ IL-8  
■ IL-18

proinflammatory cytokines

## Coronavirus Disease 2019 (1.57x10<sup>-2</sup>)

### Network Objects

 close

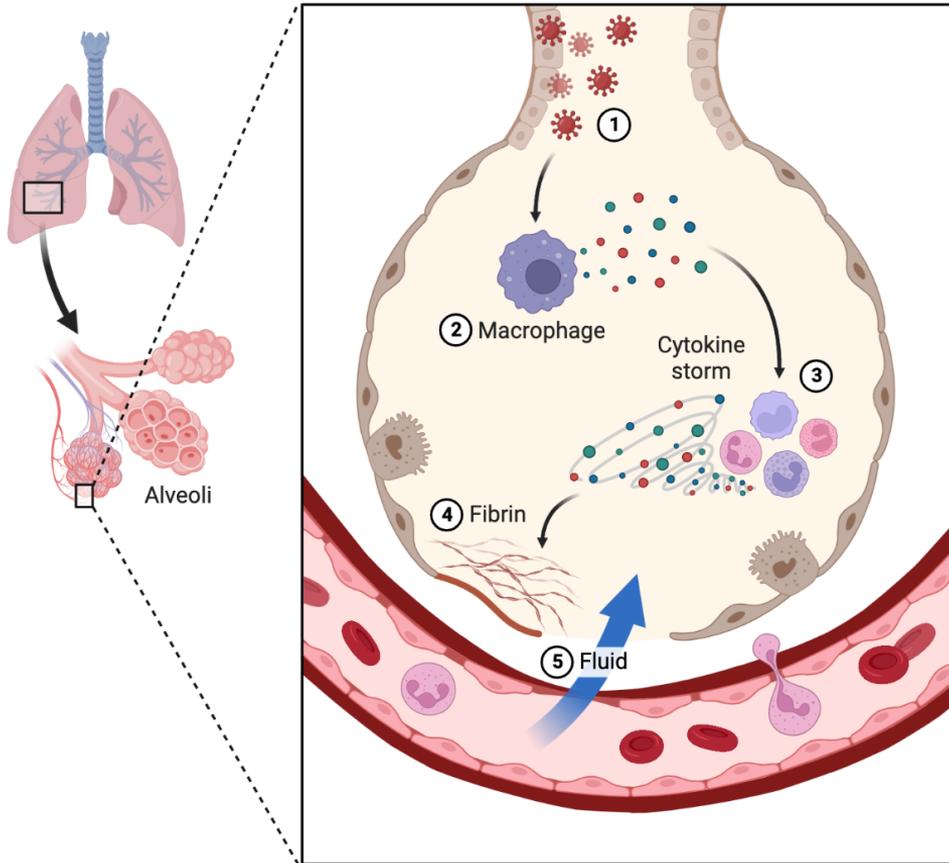
 [Export](#)  [Build Network](#)

highlight text...

0/0

Result pages: **1** (Showing results 1 to 4 of 4)

<input checked="" type="checkbox"/>	#	Name	↑	organicivsdm...	
<input checked="" type="checkbox"/>	1	<a href="#">active IL-1 beta</a>			2.245
<input checked="" type="checkbox"/>	2	<a href="#">IL-1 beta</a>			2.245
<input checked="" type="checkbox"/>	3	<a href="#">IL-8</a>			1.993
<input checked="" type="checkbox"/>	4	<a href="#">Troponin I, cardiac</a>			1.653

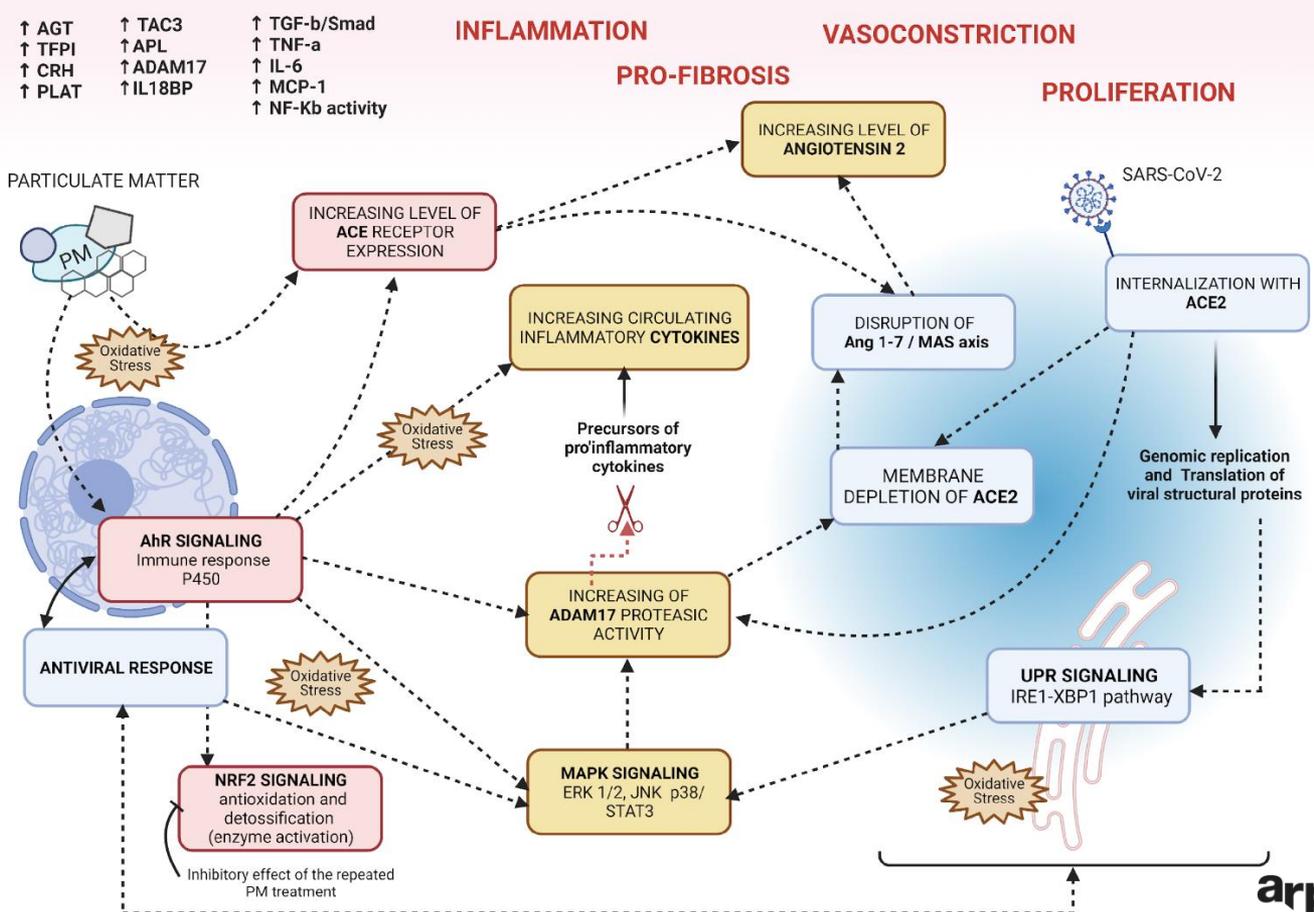


## Cytokine Storm

- 1** Coronavirus infects lung cells
- 2** Immune cells, including macrophages, identify the virus and produce cytokines
- 3** Cytokines attract more immune cells, such as white blood cells, which in turn produce more cytokines, creating a cycle of inflammation that damages the lung cells
- 4** Damage can occur through the formation of fibrin
- 5** Weakened blood vessels allow fluid to seep in and fill the lung cavities, leading to respiratory failure

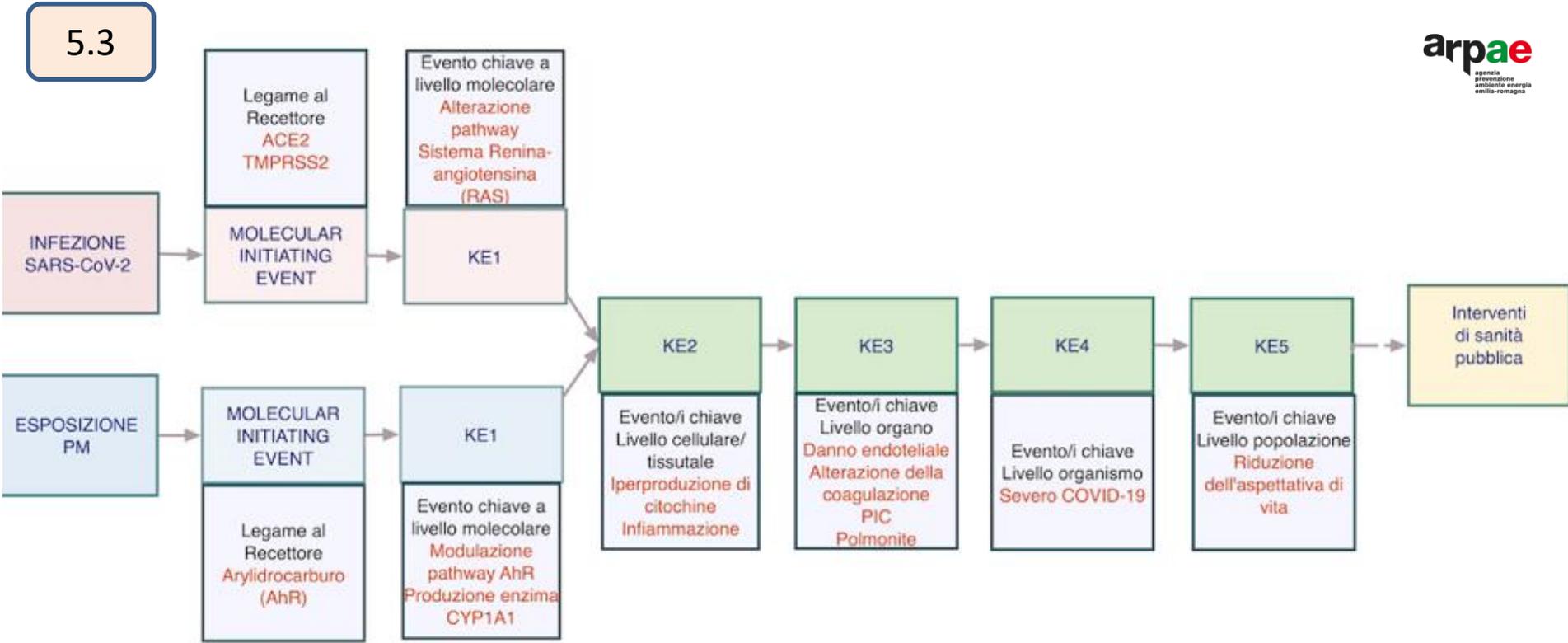
# Interplay Molecolare PM/COVID-19

5.3

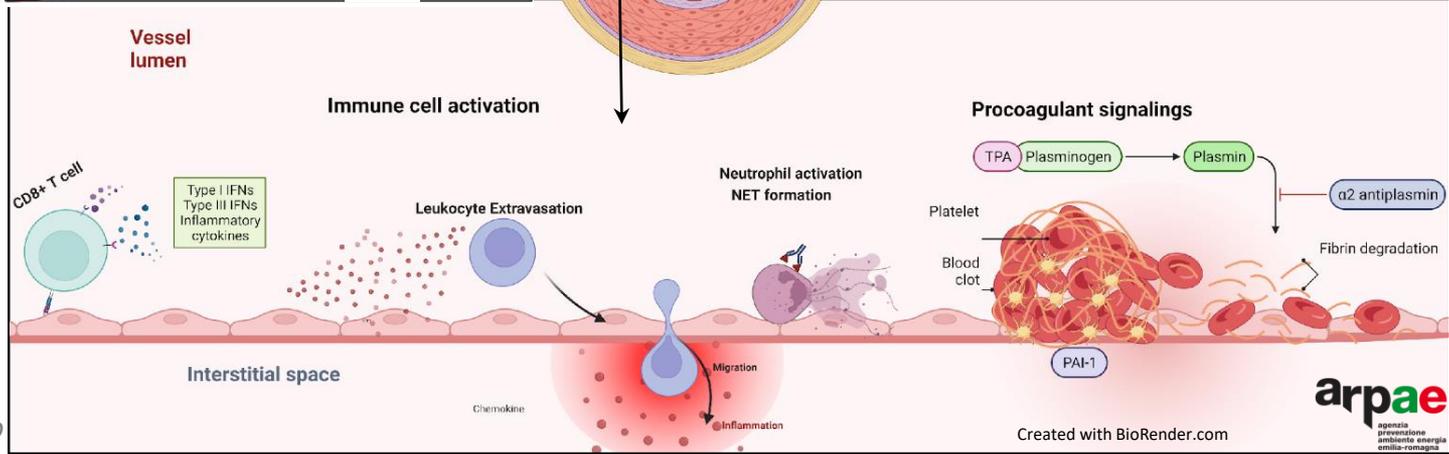
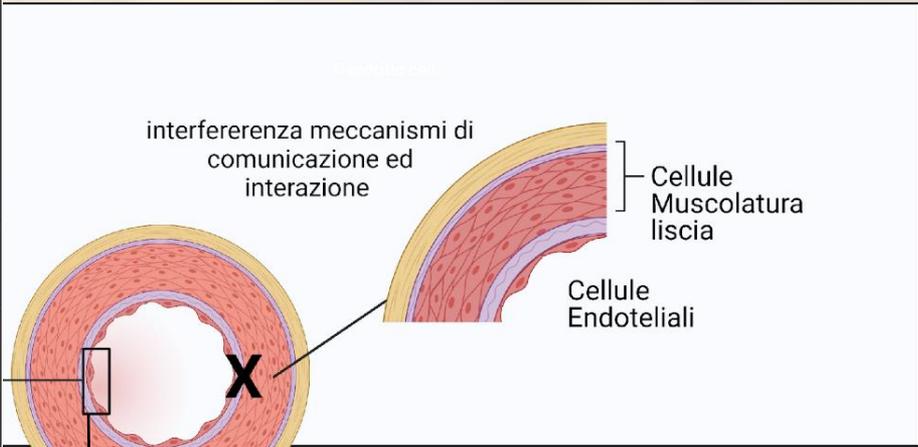
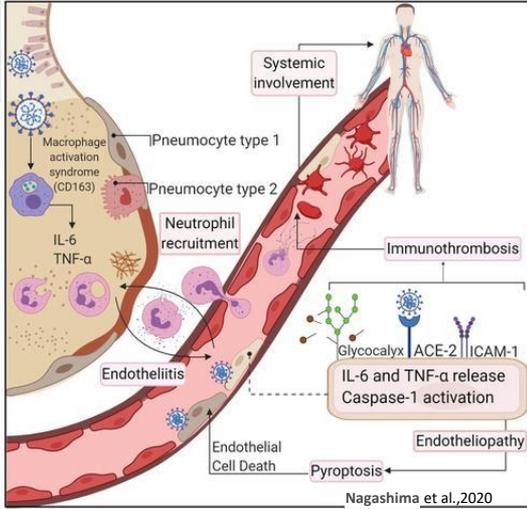


Created with BioRender.com

## 5.3



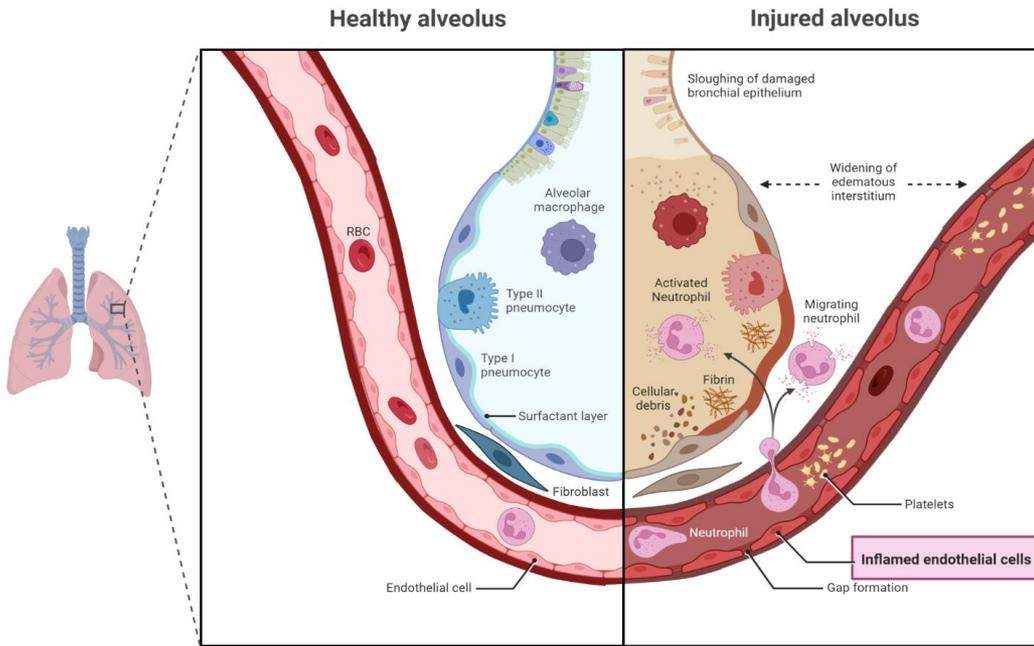
## SARS-CoV-2



Il PM media la disfunzione endoteliale

Centralità del danno endoteliale nel COVID-19

5.3



I sistemi renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e bradichinina-ossido nitrico (NO) svolgono un ruolo centrale nell'omeostasi dell'endotelio (azione reattive-regolatorie su RAAS: ACE, ACE2, AT1 e AT2, MAS)

## Conclusioni

- la componente organica del PM è fortemente tossica per il virus e ne riduce drasticamente la vitalità e la capacità di penetrazione all'interno della cellula ospite.
- virus e PM inducono gli stessi effetti, in particolare nell'indurre quella tempesta di citochine, responsabile di uno stato infiammatorio degli organi interessati
- PM e virus possono interagire anche nel compromettere il tessuto endoteliale
- I risultati dimostrano il PM svolge un ruolo di booster nella malattia COVID-19

## 5.4 - Studi dell'interazione della distribuzione del bio-aerosol in ambienti confinati (indoor)



# Campionamenti indoor

5.4

- **Campionamenti avvenuti in un plesso scolastico**
  - *Settembre 2020*
  - *Maggio 2021*
- **Messa a punto della metodica di posizionamento dei filtri**
- **Protocollo per la raccolta dei campioni da superfici**
- **Analisi molecolare**

Nessuna traccia di SARS-CoV-2 (né di altri virus a RNA)

## ARIA

PUNTO CAMPIONAMENTO	PARAMETRO	CAMPIONAMENTO 21/9/2020	CAMPIONAMENTO DOPO H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> del 30/09/2020
LOCALE 1—BAR PIANO TERRA	CARICA BATTERICA MESOFILA	540	80
	CARICA BATTERICA PSICROFILA	430	20
	CARICA FUNGINA	2460	630
	ESCHERICHIA COLI	<2	<2
	ENTEROCOCCHI	<2	<2
	STAFILOCOCCO AUREO	<2	<2
LOCALE 2—AULA COMPUTER D5	CARICA BATTERICA MESOFILA	230	150
	CARICA BATTERICA PSICROFILA	120	140
	CARICA FUNGINA	1260	170
	ESCHERICHIA COLI	<2	<2
	ENTEROCOCCHI	<2	<2
	STAFILOCOCCO AUREO	<2	<2



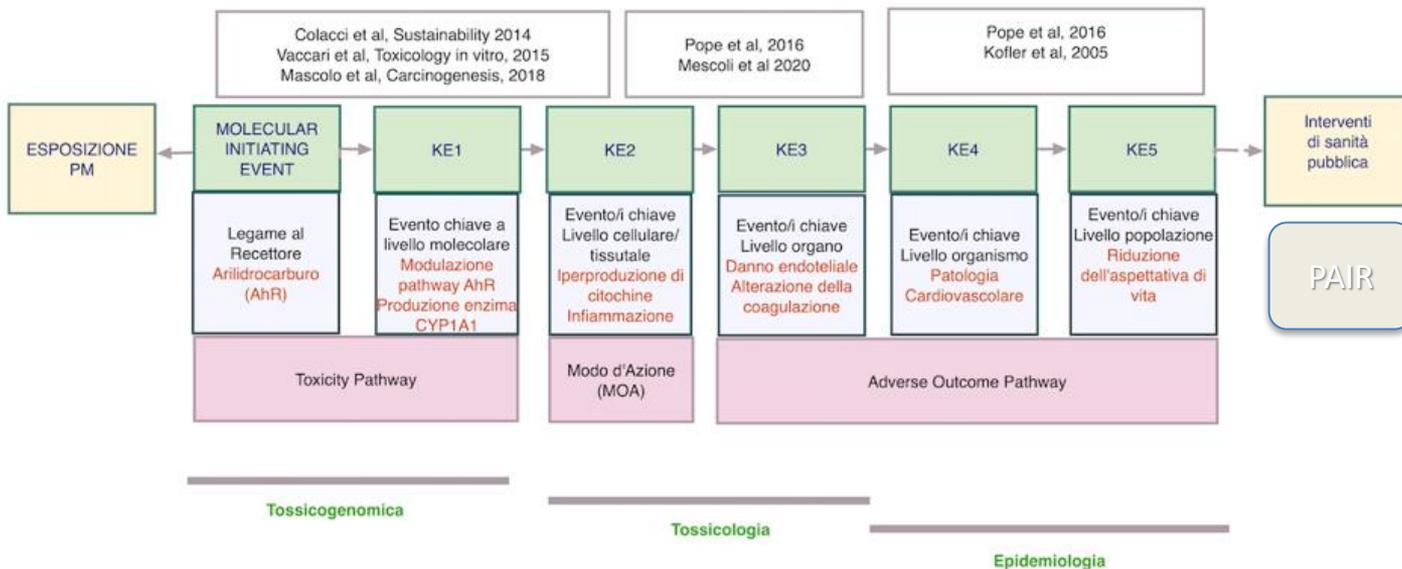
# Oltre gli obiettivi di Pulvirus

*“Progetto PULVIRUS” | Presentazione dei risultati - Roma, 24 ottobre 2022*





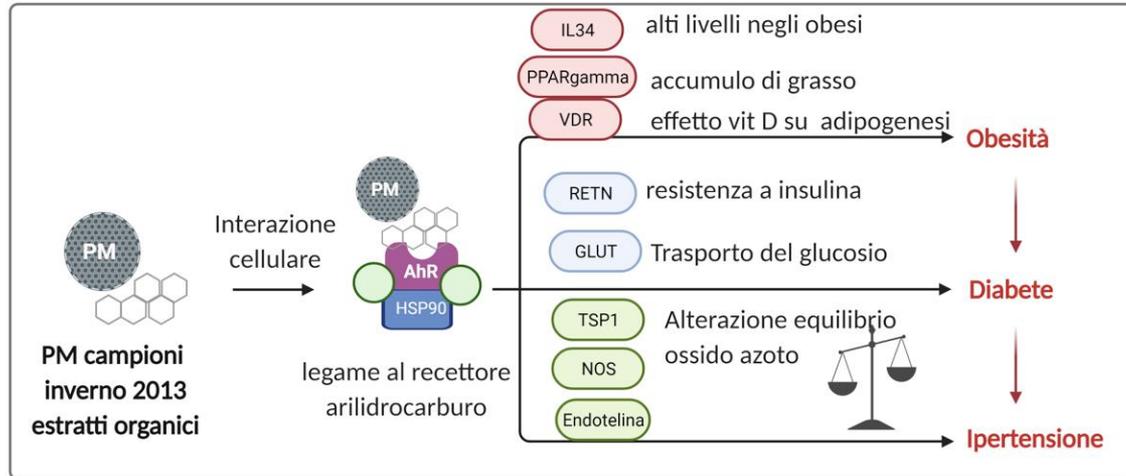
# Esposizione a PM e meccanismi molecolari



## Risultati Public Health England



## Risultati Arpae



## II TEAM

- **Struttura Tematica Ambiente, Prevenzione Salute - Arpae**

- *Annamaria Colacci (coordinatore obiettivo 5)*
- *Stefania Serra (coordinatore 5.2)*
- *Maria Grazia Mascolo (coordinatore 5.3, 5.4)*
- *Gelsomina Pillo (5,2, e 5.3)*
- *Stefano Marchesi (coordinatore 5.4)*
- *Monica Vaccari (5.2)*
- *Federico Aldrovandi (5.2) (Unibo-IHP)*
- *Giangabriele Maffei (5.3) (Unibo- IHP)*
- *Ada Mescoli (5.2, 5.3) (Unibo-IHP)*

- **Centro Tematico Qualità dell’Aria – Arpae**

- *Vanes Poluzzi*
- *Dimitri Bacco*
- *Silvia Ferrari*
- *Stefano Zauli Sajani*

*In collaborazione con Heratech del gruppo Hera (5.4)*

*This is evolving science*