



CONVENZIONE TRA IL DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA DELL'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE E LA SOCIETA' NEXT TECHNOLOGY TECNOTESSILE – SOCIETA' NAZIONALE DI RICERCA SRL PER LA RICERCA “TEMPI DI PERSISTENZA DI VIRUS INFETTANTE SU SUPERFICI DI RIVESTIMENTO”.

RELAZIONE FINALE

In base alla convenzione stipulata, il Dipartimento di Sanità Pubblica si è impegnato a eseguire uno studio virologico per determinare la possibilità di persistenza di virus infettante su materiale prodotto e fornito dal committente, secondo le modalità indicate nell'allegato tecnico alla convenzione.

Premessa. La possibilità di contaminazione di superfici da parte virus patogeni per l'uomo rappresenta un rischio di trasmissione di infezioni di varia natura e gravità. La sopravvivenza dei virus su superfici è influenzata da numerosi fattori: la natura della superficie (ad esempio, porosa o no), le condizioni ambientali (temperatura, pH, umidità, esposizione alla luce solare), la presenza di materiale organico che può avere un effetto stabilizzante, e, prima ancora, le proprietà dei diversi virus. In particolare la struttura superficiale del virus ha una notevole influenza sulla sua resistenza a condizioni ambientali diverse, così come a trattamenti inattivanti; quindi, l'essere il virus provvisto o privo di envelope e la struttura del capsido, nel caso di virus nudi, possono essere responsabili di una diversa capacità di sopravvivenza, anche in identiche condizioni ambientali. Tuttavia, anche a parità di caratteristiche strutturali, possono esservi differenze di comportamento anche tra virus della stesso genere, ma, ad esempio di sottotipo diverso (WHO - Virus survival report – 21 August 2003; Sobsey DM. Microbial Survival in the Environment: with Special Attention to Enteric and Respiratory Pathogens. ENVR 133-Lecture 14).

Modalità di esecuzione dello studio.

Sono state consegnate direttamente alla Prof.ssa Azzi, responsabile dello studio, due tipi di piastrelle; uno di superficie minore (dimensioni 4,5 X 4,5 cm) oggetto dello studio e uno di superficie lievemente maggiore (dimensioni 5,5 X 5,5 cm) da utilizzare come eventuale controllo. Le piastrelle del primo tipo verranno di seguito indicate come “piastrelle T” (per trattate) e quelle del secondo tipo come “piastrelle NT” (per non trattate).



Descrizione delle metodiche

I virus scelti per eseguire le prove di contaminazione e di sopravvivenza sono stati:

- Virus influenzale di tipo A(H1N1) 2009, isolato e coltivato nel nostro laboratorio (H1N1 2009)
- Herpes simplex virus di tipo 1, ottenuto dalla Prof.ssa G.Campadelli Fiume, Università di Bologna (HSV 1)
- Adenovirus di tipo 2, ottenuto dalla Dr.ssa M.R Capobianchi, Ospedale Spallanzani di Roma (ADV 2)
- Poliovirus vaccinale di tipo 1, ottenuto dall'Istituto Superiore di Sanità, Roma. (PV1)

I suddetti virus sono stati coltivati e titolati in TCID₅₀ (Dosi infettanti il 50% delle colture cellulari) utilizzando le seguenti linee cellulari:

- Virus influenzale di tipo A(H1N1) 2009: cellule MDCK (passaggio 81)
- Herpes simplex virus di tipo 1: cellule VERO (passaggio 130)
- Adenovirus di tipo 2 e poliovirus vaccinale di tipo 1: cellule Hep-2 (passaggio 395)

Le linee cellulari sono state mantenute coltivandole in MEM + siero fetale bovino al 10 %.

Le sospensioni virali titolate da utilizzare per le prove sono state conservate congelate in aliquote a -80°C.

Per la determinazione delle TCID₅₀, secondo la formula di Reed e Muench, si è proceduto all'inoculazione di diluizioni scalari dei virus in 4 pozzetti ciascuna. Le colture sono state osservate quotidianamente al microscopio invertito per verificare la comparsa dell'effetto citopatico (ECP), per 5 giorni.

Per contaminare le piastrelle (precedentemente sterilizzate in autoclave) sono stati utilizzati 10 µl di diluizioni 1/10 di virus influenzale H1N1 2009, PV1 e HSV 1 e 100 µl di una diluizione ½ di ADV 2, in quanto quest'ultimo virus aveva, in partenza, un titolo inferiore agli altri di circa un log.

Come diluente è stato usato un terreno di trasporto per virus (UTM, Copan), per il suo effetto stabilizzante sulle sospensioni virali.

Le piastrelle inoculate con il virus venivano in parte esposte alla luce della lampada fornita dal committente (e contrassegnate come R2) e, in parte, poste in un contenitore apposito al riparo dalla luce (e contrassegnate come R1).

La temperatura ambientale era di 25°C, con una percentuale di umidità del 58%.

Per ogni prova si è proceduto al recupero del virus subito dopo l'inoculazione (tempo 0). I tempi di incubazione delle piastrelle dopo l'inoculazione del virus andavano da 30 min a 24 ore.



Per il recupero del virus residuo dalle piastrelle ai vari tempi si è proceduto a due lavaggi dell'area della piastrella contaminata con 200 µl ciascuno di PBS che venivano poi raccolti in un'unica provetta. Il liquido residuo dopo i lavaggi veniva poi asportato con un tampone di cotone che veniva poi immerso e mescolato con il liquido usato per i lavaggi. La sospensione così recuperata veniva poi sottoposta a diluizioni scalari per il calcolo delle TCID₅₀.

Tutte le prove sono state eseguite almeno in doppio e ripetute almeno 2 volte.

Risultati

I risultati delle varie prove eseguite sono riassunti nelle due tabelle di seguito riportate.

La TCID₅₀ di virus influenzale recuperato al tempo 0 nelle varie prove corrisponde alla concentrazione di virus eliminato da pazienti con influenza al primo giorno di infezione [Galli L, Azzi A, Chiappini E, et al. A real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to evaluate natural history of viral shedding in outpatients children and adolescents with pandemic 2009 influenza A(H1N1). Chest. 2010]

Tabella 1. Persistenza dell'infettività virale su piastrelle T e NT a vari tempi dalla contaminazione con virus dell'influenza pandemica 2009 e con poliovirus di tipo 1 vaccinale (risultati espressi in log TCID₅₀±SD)

virus		0	30 min	1 ora	2 ore
H1N12009	T R1	5,2±0,26	4,75±0,40	4,25±0,38	2,25±0,23
	T R2		2,50±0,25	1,25±0,20	0
	NT R1		4,50±0,38	4,25±0,38	2,25±0,23
	NT R2		4,25±0,38	4,25±0,38	2,25±0,23
PV 1	T R1	5,5±0,43	4,5±0,43	4,5±0,43	3,5±0,23
	T R2		1,5±0,25	1,5±0,25	0
	NT R1		4,5±0,43	4,5±0,43	3,5±0,23
	NT R2		4,5±0,43	4,5±0,43	3,25±0,23

TR1, piastrelle T non esposte alla luce; TR2, piastrelle T esposte alla luce;
NTR1, piastrelle NT non esposte alla luce; NTR2, piastrelle NT esposte alla luce

La tabella 1 mostra che sulle piastrelle trattate ed esposte alla luce della lampada già dopo un'ora la presenza del virus influenzale era notevolmente diminuita e dopo 2 ore non era più dimostrabile. Sulle piastrelle T non esposte alla luce e sulle NT virus influenzale infettante persisteva ancora dopo 8 e dopo 16 ore dalla contaminazione. Non molto diverso è stato il comportamento del virus polio



Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Sanità Pubblica
Direttore: prof. Nicola Comodo

vaccinale di tipo 1. Anche in questo caso si è osservata una netta riduzione della carica infettante dopo 30 minuti e dopo due ore di esposizione alla luce delle piastrelle T contaminate il virus non era più recuperabile.

Tabella 2. Persistenza dell'infettività virale su piastrelle T e NT a vari tempi dalla contaminazione con Herpes virus umano di tipo 1 e con adenovirus umano di tipo 2 (risultati espressi in log TCID₅₀±SD)

Virus		0	2 ore	4 ore	8 ore	16 ore	24
HSV 1	T R1	5,33±0,14	5,25±0,20	4,25±0,25	3,25±0,20	3,25±0,20	1,50±0,20
	T R2		3,5±0,25	1,5±0,275	1,25±0,20	1,25±0,20	0
	NT R1		5,25±0,30	4,00±0,25	3,25±0,20	3,25±0,20	1,50±0,20
	NT R2		5,25±0,20	4,00±0,20	3,25±0,20	3,25±0,20	1,25±0,20
ADV 2	T R1	5,2±0,13		4,5±0,32	3,25±0,25	3,25±0,37	1,75±0,37
	T R2			2,75±0,37	1,75±0,37	1,62±0,22	0
	NT R1			4,5±0,25	3,25±0,25	3,25±0,20	1,75±0,22
	NT R2			4,5±0,25	3,25±0,25	3,25±0,20	1,75±0,37

Un comportamento diverso è stato osservato con l'herpes virus di tipo 1 e con l'adenovirus di tipo 2 che, anche dopo l'esposizione alla luce della lampada per due, quattro, 8 e 16 ore persistono sulle piastrelle T, e, naturalmente, anche sulle piastrelle non esposte e su quelle NT (tabella 2). E' tuttavia da rilevare che già dopo 4 ore di esposizione alla luce la carica virale residua sulle piastrelle T, soprattutto per quanto riguarda HSV 1 (quasi 3 log), ma anche per ADV 2 (quasi due log), è notevolmente diminuita. La completa eliminazione del virus dalle superfici contaminate si è osservata dopo 24 ore di esposizione delle piastrelle T alla luce della lampada. Come si può osservare nella tabella 2, dopo 24 ore la carica virale su tutte le piastrelle contaminate sia con herpes virus che con adenovirus è notevolmente diminuita.



Conclusioni

Le condizioni in cui è stato condotto lo studio sono state basate sull'impiego di virus isolati in colture cellulari e coltivati ripetutamente in laboratorio. Le concentrazioni utilizzate sono da considerare medio-alte, per riprodurre condizioni "estreme", probabilmente non comunemente verificabili.

In tali condizioni sperimentali, dallo studio condotto emerge che la foto-attivazione della superficie delle piastrelle T, oggetto dello studio, determina una rapida inattivazione sia del virus influenzale pandemico A(H1N1) 2009 che del polio virus vaccinale di tipo 1. Infatti i due virus non sono più recuperabili dopo due ore e già dopo 30 min di esposizione la carica virale è diminuita in modo evidente. Viceversa, entrambi i virus sulle piastrelle T non esposte e sulle NT persistevano ancora a 8 ore dalla contaminazione. Tempi più lunghi, tra 16 e 24 ore, sono invece risultati necessari per l'inattivazione dei due virus a DNA usati nello studio, HSV 1 e ADV 2. Viceversa, la sopravvivenza di questi due virus utilizzati sulle piastrelle T non esposte alla luce e sulle piastrelle NT superava le 24 ore, sia pure con una notevole riduzione della carica virale, a quest'ultimo tempo, in accordo con quanto noto dalla letteratura circa la capacità di tali virus di persistere per molti giorni su superfici di tipo diverso. [Bean B, Moore BM, Sterner B et al. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. J.Infect. Dis 1982; Sakaguchi H, Wada K, Kjioka J et al. Maintenance of influenza virus infectivity on the surfaces of personal protective equipment and clothing used in healthcare settings. Environ Health Prev Med 2010; Thomas Y, Vogel G, Wunderli W et al. Survival of Influenza virus on banknotes. Appl Environ Microbiol. 2008; Vasickova P, Pavlik I, Verani M, Carducci A. Issues concerning survival of viruses on surfaces. Food Environ Virol 2010; Bardell D. Survival of herpes simplex virus type 1 on some frequently touched objects in the home and public buildings. Microbios. 1990; Mahl MC, Sadler C. Virus survival on inanimate surfaces. Can J Microbiol 1975; Abad FX, Villena C, Guix S et al. Potential role of fomites in vehicular transmission of human astroviruses. Appl Environ Microbiol. 2001]

Il responsabile della ricerca
Prof. Alberta Azzi

Il Direttore del Dipartimento
Prof. Nicola Comodo

Firenze, agosto 2011