



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TREBALL DE FI DE GRAU**

**OPTIMITZACIÓ DE LA METODOLOGIA  
D'AÏLLAMENT I QUANTIFICACIÓ DE SARS-CoV-2 A  
MOSTRES AMBIENTALS**

**Carla Oliver Pons**

**Grau de Biologia**

**Facultat de Ciències**

**Any Acadèmic 2020-21**

# OPTIMITZACIÓ DE LA METODOLOGIA D'AÏLLAMENT I QUANTIFICACIÓ DE SARS-CoV-2 A MOSTRES AMBIENTALS

**CARLA OLIVER PONS**

**Treball de Fi de Grau**

**Facultat de: CIÈNCIES**

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

**Any Acadèmic 2020-21**

Paraules claus del treball:

ARN, bioaerosols, BioSampler, COVID-19, medi recol·lecció, RT-qPCR, SARS-CoV-2

**Nom Tutor/Tutora del Treball:** Josep Mercader Barceló

Autoritzo la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

| Autor/a                             |                          | Tutor/a                             |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Sí                                  | No                       | Sí                                  | No                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

## RESUM

---

L'actual pandèmia de la COVID-19, causada pel SARS-CoV-2 ha fet posar el focus a les autoritats sanitàries i a la comunitat científica sobre la transmissió d'aquest coronavirus. Una de les fonts de transmissibilitat del virus que s'ha estat estudiant és a través de microgotes d'origen biològic de llarga duració dins l'ambient, anomenats bioaerosols. Davant aquest fet, aquest treball proposa millorar alguns aspectes d'una metodologia que permeti quantificar els nivells de SARS-CoV-2 dels bioaerosols, la qual cosa és necessària per estimar el risc d'infecció i facilitar la gestió de desinfecció. Per tal de trobar una resposta al problema que es planteja, s'han dut a terme diferents experiments en els que s'analitza la influència del número de persones presents en un espai tancat, la ventilació, el volum d'aire recollit i, el medi de recollecció en la quantificació d'ARN a bioaerosols, i l'estudi dels encebadors més òptims per a la detecció del genoma de SARS-CoV-2. Com a resultats més rellevants destaquem que l'ARN aïllat de les mostres d'aire no prové exclusivament dels bioaerosols de la respiració sinó que hi ha un alt percentatge que prové de la microbiota natural de l'aire. S'ha pogut establir una correlació positiva entre el número de persones i el CO<sub>2</sub> que hi ha a un espai tancat, però aquests dos paràmetres presenten una correlació dèbil amb l'ARN aïllat. També s'ha pogut comprovar que les recolleccions de volums d'aire més grans no suposen un increment en la quantitat d'ARN recollit. El medi de recollecció hidròfob ha permès recollir més ARN de l'aire. Finalment, s'han establert tres encebadors N i N1 (reconeixen el gen de la nucleocàpsida) i la seqüència ORF1ab del genoma de SARS-CoV-2 que podrien ser més òptims per a la detecció del virus a bioaerosols. L'encebador que reconeix la seqüència ORF1ab destaca per tenir una major eficiència. L'encebador que reconeix la seqüència N és el més específic en la detecció del virus. Finalment, l'encebador que reconeix el gen N1 destaca per tenir una major sensibilitat en la detecció de SARS-CoV-2. L'estudi dels factors metodològics que aquí s'han analitzat contribuirà a millorar el protocol de detecció de SARS-CoV-2 a bioaerosols.

## ABSTRACT

---

The current COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has put the health authorities and the scientific community in the spotlight on the transmission of this coronavirus. One of the sources of transmissibility of the virus that has been studied is through microdroplets of long biological origin that stays more time in the air, called bioaerosols. Given this fact, this work proposes to improve some aspects of a methodology to quantify the SARS-CoV-2 levels of bioaerosols, which is necessary to estimate the risk of infection and facilitate disinfection management. To find an answer to the problem posed, different experiments have been carried out in which the influence of the number of people present in an enclosed space, ventilation, the volume of air collected and the collection media on the quantification of RNA to bioaerosols

in analysed, as well as the study of the most optimal primers for the detection of the genome of SARS-CoV-2. As more relevant results, we note that the RNA isolated from air samples does not come exclusively from the bioaerosols of respiration but there is a high percentage that comes from the natural microbiota of the air. A positive correlation has been established between the number of people and the CO<sub>2</sub> levels in an enclosed space, but these two parameters have a weak correlation with the amount of isolated RNA. It has also been shown that collecting larger volumes of air does not increase the amount of RNA collected. The hydrophobic collection medium has made it possible to collect more RNA from the air. Finally, three primers N and N1 (recognizing the nucleocapsid gene) and the ORF1ab sequence of the SARS-CoV-2 genome have been established that may be a better option for virus detection. The primers that recognize the ORF1ab sequence stands out for its greater efficiency. The primers that recognize the N sequence is the most specific in detecting the virus. Finally, the primers that recognize the N1 gene stands out for having a higher sensitivity in the detection of SARS-CoV-2. The methodological factors studied here will contribute to improving the SARS-CoV-2 detection protocol in bioaerosols.

## ÍNDEX

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUM .....</b>                       | <b>3</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                     | <b>3</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓ.....</b>                  | <b>6</b>  |
| <b>HIPÒTESI I OBJECTIUS .....</b>        | <b>12</b> |
| <b>DISSENY EXPERIMENTAL .....</b>        | <b>13</b> |
| <b>MATERIALS I METODOLOGIA.....</b>      | <b>15</b> |
| Preparació medis de recol·lecció.....    | 15        |
| Recollida mostres aire .....             | 16        |
| Extracció i quantificació de l'ARN ..... | 16        |
| RT-qPCR .....                            | 17        |
| <b>RESULTATS .....</b>                   | <b>19</b> |
| <b>DISCUSSIÓ .....</b>                   | <b>26</b> |
| <b>CONCLUSIONS .....</b>                 | <b>30</b> |
| <b>AGRAÏMENTS.....</b>                   | <b>31</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                 | <b>31</b> |

## INTRODUCCIÓ

---

L'actual pandèmia de la COVID-19, causada pel SARS-CoV-2 ha fet posar el focus a les autoritats sanitàries i a la comunitat científica sobre la transmissibilitat d'aquest coronavirus. Un dels aspectes que s'estan evidenciant és de la transmissió de SARS-CoV-2 mitjançant aerosols (Ge, Z. Y. *et al.*, 2020). Els aerosols que es consideren derivats d'una font biològica són denominats bioaerosols. Els bioaerosols duren més temps a l'aire que les gotes respiratòries i poden viatjar més lluny. Es creu que els bioaerosols presenten un major risc de propagació de la COVID-19 entre persones que es troben a distàncies considerables en comparació amb les gotes (Rabaan, A.A. *et al.*, 2021).

Es sap que les partícules que es produeixen a l'hora de parlar, respirar, esternudar i tossir varia entre  $<1$  i  $>100$   $\mu\text{m}$ . Els humans només poden inhalar partícules  $<100$   $\mu\text{m}$ , ja que, s'ha de considerar que les partícules més grans de  $100\mu\text{m}$  poden experimentar una evaporació ràpida en funció de la humitat relativa ambiental (Guzman, M. I., 2020). Dins aquest rang de partícules, trobem que les que són  $<5\mu\text{m}$  estan considerades com a bioaerosols (Wei, J. & Li, Y. 2016).

Una persona portadora del SARS-CoV-2 parlant, esternudant o tossint a una distància de 2 m pot emetre una càrrega patogènica de bioaerosols que romanen viables a l'aire fins a 3 hores en un recinte tancat. Els bioaerosols dipositats contaminen les superfícies (fòmits) que, si es toquen, poden actuar com un camí per introduir el patogen dins la boca, el nas o els ulls i causar malalties, com ara el COVID-19 (Guzman, M. I., 2020).

Estudis recents han demostrat la possibilitat que aquest virus es pugui propagar d'un hoste a un altre usant els bioaerosols de l'aire com a mitjà de transport, i de la detecció d'aquest a través de mostrejos d'aire i la posterior amplificació del material genòmic per PCR. Aquests estudis presenten tres evidències. Per començar, la transmissió del virus a través d'individus asimptomàtics demostren que la respiració i la parla, produeixen efectivament bioaerosols. Una altra evidència és que les partícules de SARS-CoV-2 aerosolitzades que romanen suspeses a l'aire durant hores, poden ser transportades a distàncies considerables. Finalment, la gran incidència que tenen els aerosols sobre la transmissió de malalties infeccioses (Anderson, E.L. *et al.*, 2020).

Totes aquestes dades, donen lloc a prestar una atenció immediata a la importància que tenen els bioaerosols i les seves implicacions per a la protecció de la salut pública enfront al SARS-CoV-2.

Així, és necessari estandarditzar una metodologia per quantificar els nivells de SARS-CoV-2 a bioaerosols, la qual cosa ens permetria estimar el risc d'infecció i facilitaria la gestió de les tasques de desinfecció.

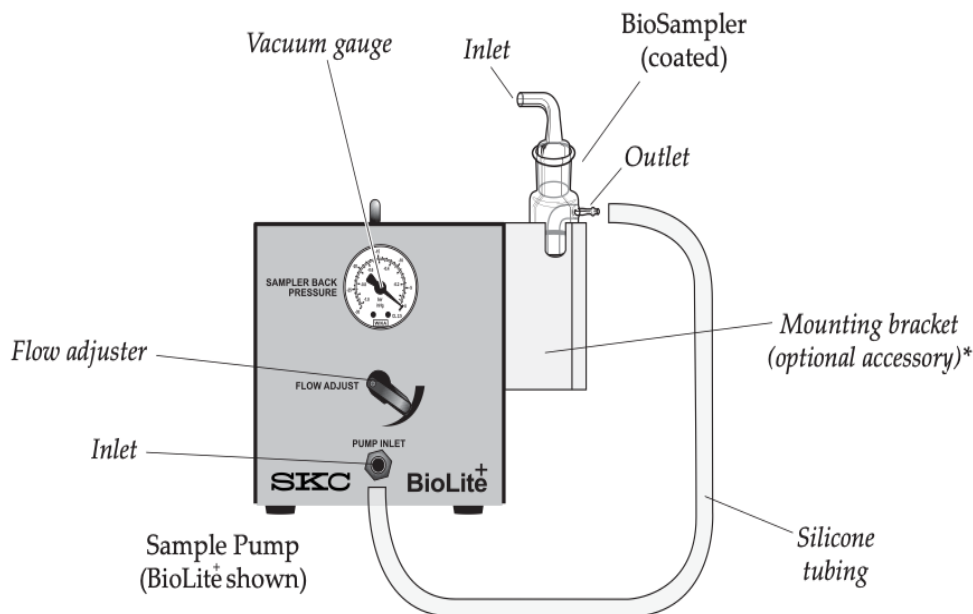
Malauradament, encara falta informació i estudis que proposin una metodologia estandarditzada de recollida i quantificació dels nivells ambientals de SARS-CoV-2, sigui dins l'ambient que sigui. Davant els resultats de diversos treballs publicats, la detecció de l'ARN ambiental del virus sembla no donar resultats reproduïbles. Així, a diversos estudis en els que s'ha mostregat aire d'habitacions ocupades per pacients amb COVID-19, no es va detectar el virus a cap mostra (Ong, S. W. X. *et al.*, 2020; Lane, M.A. *et al.*, 2020). Mentre que a altres estudis han estat capaços de detectar SARS-CoV-2 dins llocs públics i vehicles (Hadei, M. *et al.*, 2021) i també a mostres recollides dins habitacions amb pacients amb COVID-19 (Santarpia, J.L. *et al.*, 2020).

La gran varietat de resultats que s'han vist als estudis on s'ha mostregat aire per detectar SARS-CoV-2 (Cheng, V.C. *et al.*, 2020; Chan, K.H. *et al.*, 2020; Aghalari, Z. *et al.*, 2021), podria dependre d'una sèrie de factors, entre els quals es destaquen:

- Metodològics: Uns dels factors més importants a l'hora de mostregar bioaerosols, és la selecció del mètode de recollida més òptim en funció del tipus de partícules que es volen recollir. Trobem una gran varietat de mètodes per a la recollida de bioaerosols: mostrejadors de ciclons, impingers líquids, mostrejadors d'esclatxa, precipitadors electroestàtics i filtres (Verreault, D. *et al.*, 2008).

En el present estudi s'ha utilitzat el mostregador d'aire BioSampler® Bioaerosol Collection Device (Cat. No. 225 Series) i la bomba SKC BioLite+ (228-9620) (**Figura 1**). El BioSampler és un dispositiu de recollida de vidre d'alta eficiència que requereix d'una bomba que genera un flux sònic gràcies a tres canals, per atrapar els microorganismes transmesos a l'aire pel seu posterior anàlisi. Aquest, està compost per tres parts: la secció d'entrada, la secció de sortida i el recipient de recollida.

Les entrades d'aire de BioSampler estan dissenyades per a la recollida de partícules aerotransportades similars a les que passen a través del nas dels humans. Cada un dels tres canals tangencials del BioSampler, un permet passar 4,2 L/min d'aire ambiental per obtenir una cabal total de 12,5 L/min. El flux d'aire passa a través de tres canals que impacten l'aire tangencialment a la paret cilíndrica del recipient de vidre. Això suposa una major conservació de la mostra, ja que, gràcies al moviment circular de l'aire que provoca, preserva la integritat i viabilitat dels microorganismes.



**Figura 1.** Mostrejador d'aire BioSampler® Bioaerosol Collection Device (Cat. No. 225 Series) i la bomba SKC BioLite (228-9620).

El Biosampler presenta uns trets diferencials que el fan més atractiu que altres mostrejadors. Així, en un estudi, en el que es compara l'eficiència de 29 mostrejadors en la recol·lecció de partícules inerts que es troben dins el rang respirable (és a dir, entre 1 i 5 micres), s'ha demostrat que l'eficiència mitjana del BioSampler és una de les més elevades i, a més, presenta la major eficiència de recol·lecció de partícules inerts d'entre 1 i 3 micres (Kesavan, J. & Sagripanti, J.L., 2015).

Un altre estudi en el que es compara l'eficiència de recol·lecció de virus de la grip emprant 4 mostrejadors distints, mostra que el BioSampler presenta una eficiència també molt elevada recollint aerosols carregats de virus i, a més, és l'aparell que millor preservava la viabilitat del virus (Fabian, P. *et al.*, 2009), cosa que també es va considerar que seria rellevant a l'hora d'intentar recollir un virus que és relativament làbil.

Per altra banda, un aspecte que en principi podria ser negatiu és que, el temps de mostreig, i per tant, el volum d'aire, es veu limitat per l'evaporació del líquid col·lector ja que el flux màxim és tan sols de 12,5 L/min.

- Ambientals: També és molt important destacar certs factors ambientals que afecten a la viabilitat dels virus. Cox, C.S. *et al.* (1974) van enumerar la humitat, la temperatura, la radiació i la circulació de l'aire com els paràmetres més importants que influeixen en la supervivència dels microorganismes transportats per l'aire.



La concentració de CO<sub>2</sub> a l'aire és un factor important a tenir en compte, ja que, segons resultats recents (Velarde, F. *et al.*, 2020), la probabilitat de contagi per COVID-19 depèn en gran mesura del temps d'exposició i de la ventilació dels entorns. Com més llarga sigui la durada d'un esdeveniment i més baixa sigui la ventilació de l'entorn, major serà la probabilitat de contagi.

- Individuals: Les concentracions de bioaerosols que proporciona cada individu al respirar no és el mateix, ja que depèn de l'activitat que s'estigui duent a terme (parlar amb mascareta o sense, fer exercici, menjar...). Les concentracions de bioaerosols seran majors si hi ha més quantitat d'individus i si l'activitat que es du a terme requereix una respiració més constant (Heo, K.J. *et al.*, 2017).
- Clínics: Determinats factors intrínsecs dels pacients podrien influir en la producció de bioaerosols carregats de virus i, per tant, afectar els resultats de la detecció de SARS-CoV-2 als bioaerosols.

En un estudi es van quantificar els aerosols vírics de les habitacions de pacients infectats (Leblond, D. N. *et al.*, 202). Es va analitzar la possible influència de l'edat del pacient, el sexe, nombre de dies entre els primers símptomes i el mostreig, els símptomes que presentaven (tossina, febre, dispnea, diarrea, vòmits, mal de coll, cefalea, fatiga i pèrdua de gana i miàlgia).

Però en aquest estudi no es va poder observar cap correlació entre símptomes particulars, la durada de l'estada a l'hospital, els paràmetres clínics i el temps des de l'aparició dels primers símptomes i la detecció de l'ARN viral en els bioaerosols. No obstant aquest resultat, es necessiten més estudis amb un número d'individus major per poder analitzar la influència dels factors clínics dels pacients en la detecció de SARS-CoV-2 a bioaerosols. Per això s'han iniciat estudis que intenten mantenir més controlats tots aquests factors que poden limitar la detecció de SARS-CoV-2 a l'ambient.

En el marc del projecte "Identificació, quantificació i reducció de la càrrega ambiental de SARS-CoV-2" (IDEQUIRE), s'ha quantificat la concentració d'ARN present en els bioaerosols recollits de les habitacions ocupades per pacients COVID-19 i els nivells de SARS-CoV-2 per ddPCR (Truyols, V. J. *et al.*, 2021).

S'han dut a terme dos estudis, variant el volum d'aire mostrejat, el medi de recollida i l'etapa de la malaltia en la qual es troben els individus infectats per SARS-CoV-2. Part d'aquests resultats han estat presentats al 2º Congreso Nacional Multidisciplinar COVID19 de las Sociedades Científicas de España.

**Taula 1.** Condicions de mostreig de bioaerosols dels dos estudis realitzats a pacients amb COVID-19. DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium); P/S: Penicil·lina/ Estreptomicina; BSA: Bovin Serum Albumin.

|          | Volum d'aire   | Medi de recollida                             | Condicions pacients  |
|----------|----------------|---|--|
| ESTUDI 1 | 250-375 litres | Aigua estèril                                 | Pacients diagnosticats amb COVID-19 amb PCR positiva   |
| ESTUDI 2 | 625-750 litres | DMEM, 1% P/S,<br>0,5% BSA i 0,25%<br>Antifoam | Pacients diagnosticats amb COVID-19 amb PCR positiva<br>+<br>Inici de símptomes de la malaltia com a màxim de 7 dies abans de la recollida de mostres de bioaerosols |

Com es pot observar a la **Taula 2**, trobem una major concentració d'ARN a les mostres de l'estudi 1. Tot i trobar una concentració menor a l'estudi 2, hi ha un major percentatge de PCRs positives per qualsevol de les seqüències amplificades del genoma. Desconeixem quin és el factor de tots els que s'han modificat responsable de la variació dels resultats.

**Taula 2.** Resultats obtinguts dels dos estudis amb la mitjana i el SEM de la concentració d'ARN i el percentatge de mostres de bioaerosols que han donat positius pels gens N, N1 o ORF1ab a la ddPCR.

|                  | Estudi 1 | Estudi 2 |
|------------------|----------|----------|
| <b>ng/ml ARN</b> | 3612±554 | 2613±444 |
| <b>Gen N</b>     | 5,3%     | 12,9%    |
| <b>Gen N1</b>    | 5,3%     | 22,6%    |
| <b>ORF1ab</b>    | 26,3%    | 32,3%    |

Analitzant aquests resultats, s'han plantejat una sèrie de preguntes que es volen respondre en el present treball. L'aire que es recull de les habitacions dels pacients amb COVID-19, conté exclusivament bioaerosols produïts per la respiració o també conté part de la microbiota present a l'aire (espores, bacteris, fongs i altres virus)? Els medis de recollida emprats, influeixen en l'eficiència de recollida de bioaerosols? Realitzant mostrejos de bioaerosols més llargs, obtindrem major quantitat d'ARN? Quins són els encebadors més òptims per a la detecció de SARS-CoV-2 a bioaerosols?

Respondre a aquestes preguntes contribuirà a estandarditzar una metodologia que permeti la quantificació de SARS-CoV-2 a bioaerosols.

## HIPÒTESI I OBJECTIUS

---

Les hipòtesis que es plantegen són les següents:

1. L'ARN aïllat de les mostres d'aire recollides no prové exclusivament dels bioaerosols de la respiració.
2. Existeix una correlació positiva entre la concentració d'ARN del bioaerosols, i el nombre de persones presents dins un recinte tancat o la concentració de CO<sub>2</sub>.
3. Recol·leccions de volums més grans d'aire permeten obtenir més quantitat d'ARN.
4. El medi de recol·lecció té influència sobre la concentració d'ARN recollit.
5. Hi ha encebadors més òptims que altres per a la detecció d'ARN de SARS-CoV-2 a bioaerosols.

L'objectiu principal d'aquest treball és, la optimització de la metodologia de recol·lecció i detecció d'ARN de SARS-CoV-2 a bioaerosols.

Els objectius específics són:

1. Quantificar la concentració d'ARN provinent dels bioaerosols recollits dins 3 ambients que difereixen en el nombre de persones i en l'abundància de la microbiota natural.
2. Correlacionar la concentració d'ARN aïllat provinent de bioaerosols amb els nivells de CO<sub>2</sub> i la quantitat d'individus.
3. Analitzar si el mostreig de volums molt grans d'aire permet recollir més quantitat d'ARN.
4. Analitzar l'eficiència d'un medi hidròfob en la recol·lecció d'ARN.
5. Comparar l'eficiència, l'especificitat i la sensibilitat de quatre parelles d'encebadors en la detecció de SARS-CoV-2.

## DISSENY EXPERIMENTAL

---

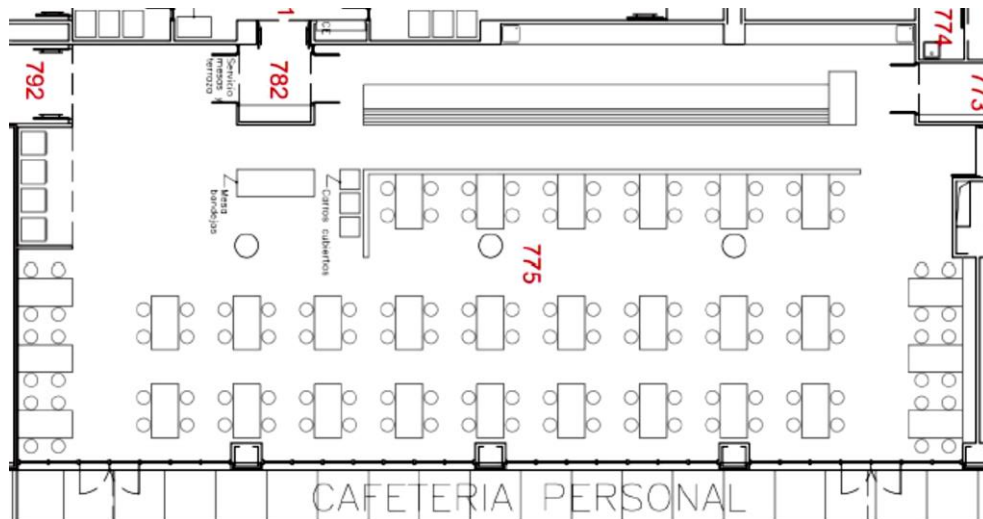
Per a respondre a les preguntes que s'han plantejat, s'han dissenyat els següents experiments:

- a. La primera part de l'experiment vol aconseguir els objectius 1 i 2. Per a poder donar resposta a aquests objectius, s'han plantejat mostrejors de bioaerosols dins tres ambients que difereixen en el nombre de persones i en la ventilació. Aquests són: la cafeteria de l'hospital de Son Espases (zona molt concorreguda i no ventilada a l'exterior), un magatzem de l'hospital de Son Espases (zona no habitada i gens ventilada) i l'exterior.

La recollida de mostres d'aire es realitzen dins el vas col·lector del BioSampler, on s'hi introdueixen 5 ml del medi de transport de virus. Els mostrejors no superiors a 60 minuts, ja que líquid recol·lector es va evaporant a mesura que passa el temps.

La col·locació de la bomba de mostreig, tant a la cafeteria com al magatzem, ha estat estratègicament pensada per a que agafi l'aire des de la part central del recinte.

Com es pot observar a la **Figura 2**, la cafeteria consta de dues portes (792 i 773), les quals donen accés des de l'interior de l'hospital i des de les dependències del personal; una més que dona excés a l'exterior, utilitzada per sortir de la cafeteria. Per tant, és un espai semiobert no ventilat i amb una circulació constant de persones. La cafeteria té les següents dimensions: 12x27x2,5m, per tant, hi ha aproximadament uns 810.000 litres d'aire, dels quals en recollim 750 a cada mostreig (0,097% del volum d'aire total del recinte). El magatzem té unes dimensions de 8x20x3,5m, per tant, hi ha aproximadament uns 560.000 litres d'aire, dels quals també se'n podran processar 750 per cada mostra (0,134 % del volum d'aire total del recinte).



**Figura 2.** Mapa cafeteria hospital universitari Son Espases.

Els mostrejos de bioaerosols a la cafeteria tenen una duració d'entre 50 i 60 minuts. Cada 5 minuts s'han mesurat paràmetres d'interès com són: la temperatura del recinte, la humitat (%), la concentració de CO<sub>2</sub> (ppm) i el nombre de persones que hi ha.

Els mostrejos de bioaerosols fets al magatzem i a la zona d'exterior han durat 50-60 minuts, però els paràmetres de temperatura, humitat i concentració de CO<sub>2</sub> només s'apunten un cop, ja que, com que no són llocs concorreguts aquests paràmetres no varien. Una vegada hem recollit les mostres, es fa una extracció i quantificació de l'ARN recollit en aquestes 3 zones.

- b. La segona part de l'experiment vol aconseguir els objectius 3 i 4. Per a poder donar resposta a aquests objectius, s'han realitzat mostrejos de bioaerosols amb un medi de recol·lecció hidròfob durant 1 hora i 8 hores.

El BioSampler es pot utilitzar amb líquids de recollida no evaporants que tenen una viscositat molt superior a l'aigua, com ara el ViaTrap, un oli mineral especial que s'usa per prendre mostres de bioaerosols. Quan s'utilitza el ViaTrap, l'eficiència de recollida d'aire del BioSampler es manté constant durant un període de mostreig de 8 hores. Aquestes mostres s'han pres de dins un laboratori del mòdul F de l'hospital universitari de Son Espases. Aquest espai està poc ventilat i poc concorregut amb unes dimensions de 3x6x2,5m, per tant hi ha aproximadament uns 45.000 litres d'aire. En 60 minuts es processaran 750 litres d'aire (1,6% del volum d'aire total del recinte) i en 8 hores 6.000 litres (13,3% del volum d'aire total del recinte). Posteriorment s'ha realitzat l'extracció i la quantificació de l'ARN. A part del volum d'aire recollit, es vol analitzar la influència del medi de recol·lecció, comparant la concentració d'ARN obtingut durant les recol·leccions de bioaerosols de 60 minuts de llocs habitats (laboratori i cafeteria).

- c. La tercera part de l'experiment vol aconseguir l'objectiu 5. Per poder donar resposta a aquest objectiu, s'han elegit encebadors dirigits a 4 seqüències específiques de SARS-CoV-2 que s'han utilitzat en assaigs de RT-qPCR com a proves diagnòstiques (Ahn, D. G. *et al.*, 2020) amb l'objectiu de determinar quins d'ells presenta una major eficiència, especificitat i sensibilitat per a la detecció del virus. Els encebadors que s'han fet servir són: ORF1ab (*open reading frame*), N i N1 (gens que reconeixen per nucleocàpsida) i RdRp (gen de reconeix per l'ARN polimerasa dependent d'ARN). La RT-qPCR s'ha dut a terme a partir d'una mostra nasofaríngea d'un pacient positiu COVID-19 amb el kit de MasterMix SensiFAST SYBR No-Rox Kit. Per a l'anàlisi d'eficiència i especificitat, s'han preparat 5 dilucions de la mostra de cDNA de SARS-CoV-2: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 i 1/160. Per a l'anàlisi de la sensibilitat dels encebadors s'ha tornat a fer la RT-qPCR, diluint encara més la mostra biològica a 1/100 i 1/1000.

## MATERIALS I METODOLOGIA

---

### Preparació medis de recol·lecció

S'han utilitzat dos tipus medis de recol·lecció, un medi de transport de virus i un medi hidròfob (ViaTrap). Preparam el medi de transport víric dins un tub Falcon estèril que conté: un 10% de FCS (Fetal Calf Serum), un 1% de P/S (Penicilin- Streptomycin), entre un 0,3 i 0,5% d'Antifoam i un 0,5% de BSA en DMEM. Tots els components del medi es manipulen dins una campana de gasos, és a dir, dins un ambient estèril, menys el BSA que s'ha de pesar fora de la campana de gasos. Per això, per tal d'esterilitzar la solució de BSA, es passa a través d'un filtre de 0,22 micres. El medi de recol·lecció es conserva a 4 °C, com a màxim 7 dies.

Com a medi de recol·lecció hidròfob fem servir l'oli mineral ViaTrap. Pipetegem 1 ml d'oli, prèviament esterilitzat amb un filtre de 0,22 micres dins el vas recol·lector.

## Recollida mostres aire

Per començar, s'encén la bomba BioLite+ durant 5 minuts sense connectar cap tub perquè s'estabilitzi. Un cop s'ha estabilitzat la bomba, aquesta s'ha de calibrar amb el flux adient per a la recollida de bioaerosols. Connectem el BioSampler a la bomba i el mesurador de flux al BioSampler. Posem en marxa la bomba i usem l'ajustador de cabdal fins a tenir una pressió de 0,5 atmosferes, per tal d'arribar al flux sònic.

Els mostrejors de bioaerosols que es duen a terme dins la cafeteria, el magatzem i a l'exterior, s'han executat de la mateixa manera. S'han fet recollides de 60 minuts, que equival a 750 litres d'aire per mostra, emprant la bomba SKC BioLite+ i el mostrejador de bioaerosols BioSampler.

A cada mostreig s'ha situat el BioSampler en el mateix punt de cada espai a mostrejar. Després s'encén la bomba durant 60 minuts i amb el detector de qualitat de l'aire (Tackly) mesurem la temperatura, la humitat i el CO<sub>2</sub>. Una vegada ha transcorregut el temps de mostreig, s'apaga la bomba, s'introdueix la mostra dins gel per mantenir la seva integritat i es procedeix a la immediata extracció d'ARN.

## Extracció i quantificació de l'ARN

L'extracció d'ARN es du a terme a la campana de gasos per evitar la inhalació dels gasos tòxics que emeten els reactius que s'utilitzen en el protocol d'aïllament, com és el cas del TRItidy i emprant material estèril per evitar la degradació de l'ARN.

En el cas de les mostres de bioaerosols recollides amb el medi de transport de virus, es treu el BioSampler amb la mostra de dins el gel i es pren tota la mostra que hem obtingut i ho introduïm dins un tub de microcentrífuga estèril (dels 5 ml de líquid de recollida que tenim inicialment, després de 60 minuts queden uns 100- 300µl). Seguidament s'introdueix TRItidy en una proporció de 1:3 (per exemple, si es treuen 200 µl de mostra, es posen 600 µl de TRItidy). Es deixa reposar la mostra durant 5 minuts a temperatura ambient per a permetre la correcta precipitació d'ADN i proteïnes. Després s'introdueixen 80 µl (per 200 µl de mostra) de 1-bromo-1-cloropropà per a que es doni la formació de tres fases on l'ARN queda en el sobrenedant. Es vorteja durant 15 segons i es deixa reposar durant 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament es centrifuga durant 15 minuts a 4°C a una velocitat de 12000 g. Una vegada acabada la centrifugació, s'observa que s'han format 3 fases: fase inferior orgànica, una intermitja que conté l'ADN i una superior aquosa que conté l'ARN. Prenem la fase aquosa



i la posem dins un nou tub de microcentrífuga estèril. Afegim isopropanol amb la mateixa proporció de sobrenedant que hem obtingut (1:1) perquè es doni la precipitació de l'ARN.

La mostra es conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al dia següent. D'aquesta manera deixem actuar l'isopropanol durant més hores per obtenir una major concentració d'ARN. Es centrifuga durant 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  a una velocitat de 12000 g per a què el pellet precipiti. Després de la centrifugació eliminem la fase aquosa i deixem el pellet. Seguidament s'introdueix 1 ml d'etanol 75% per eliminar les sals que hagin pogut quedar i vortejam el tub per desfer el pellet. Centrifuguem durant 5 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  a una velocitat de 12000 g. Eliminem l'etanol, deixant solament el pellet. Deixem la mostra oberta dins la campana entre 5 i 10 minuts perquè s'evapori l'etanol que no s'ha pogut eliminar.

Finalment per a la quantificació d'ARN afegim 20  $\mu\text{l}$  de Water DEPC (0,1%) a cada mostra. Per a la quantificació d'ARN s'ha usat l'espectrofotòmetre Synergy H1. Al lector de la placa de l'espectrofotòmetre pipetegem 2  $\mu\text{l}$  de Water DEPC (0,1%) com a blanc i 2  $\mu\text{l}$  de la mostra que volem quantificar. Obtenim la concentració d'ARN en  $\text{ng}/\mu\text{l}$  i el rati 260/280 que indica el nivell de contaminació per proteïnes.

En el cas de les mostres de bioaerosols recollides amb el medi de recol·lecció ViaTrap, com que no hi ha hagut evaporació del medi, seguim tenint 1 ml de mostra. Aquesta s'introdueix dins 5 tubs de microcentrífuga posant 200  $\mu\text{l}$  de mostra dins cada un. Una vegada hem introduït el TRIidty, vortejam durant 15 segons i posem les mostres a centrifuga durant 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  a una velocitat de 12000 g per separar la fases greixosa de la part aquosa. Eliminem el sobrenedant que correspon a la fase greixosa i introduïm 80  $\mu\text{l}$  de 1-bromo-1-cloropropà per a que es formin dues fases. Es vorteja durant 15 segons i es deixa reposar durant 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament es centrifuga durant 15 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  a una velocitat de 12000 g. Una vegada acabada la centrifugació prenem la fase superior aquosa i la posem dins un nou tub de microcentrífuga. Afegim isopropanol amb la mateixa proporció de sobrenedant que hem obtingut (1:1). A partir d'aquí el procés d'extracció que es segueix és el mateix que s'ha seguit pel medi de transport de virus.

## RT-qPCR

El cDNA s'ha sintetitzat incubant 10  $\mu\text{l}$  de l'ARN total a  $65^{\circ}\text{C}$  durant 5 minuts. Després, s'han barrejat les mostres d'ARN amb 1  $\mu\text{l}$  de 200 U/ $\mu\text{l}$  M-MuLV TRANSCRIPTME transcriptasa inversa (Bliirt), 1  $\mu\text{l}$  40 U/ $\mu\text{l}$  d'inhibidor Riboprotect RNase, 1  $\mu\text{l}$  a 10 mM de dNTPs MIX, 2  $\mu\text{l}$  de tampó de reacció 10x RT i 1  $\mu\text{l}$  de random nonamers (Merck), en un volum final de 20  $\mu\text{l}$ , i incubats a  $50^{\circ}\text{C}$  durant 30 min i  $85^{\circ}\text{C}$  durant 5 min.

El cDNA s'ha amplificat mitjançant usant el kit SensiFAST SYBR No-Rox. S'ha dut a terme un banc de 5 dilucions de cDNA de SARS-CoV-2, on la primera dilució que es va preparar va ser 1/10 i, a partir d'aquesta, es van fer dilucions 1/2 fins arribar a una dilució 1/180.

Per dur a terme el banc de dilucions, a la dilució 1/10 s'han mesclat 6µl de la mostra de cDNA amb 54µl de Water DEPC (0,1%). Per a la dilució 1/20, s'han pres 30µl de la dilució 1/10 i s'ha mesclat amb 30µl Water DEPC (0,1%). S'ha seguit el mateix procediment fins a obtenir una dilució 1/180. Cada dilució s'ha processat per duplicat.

Els encebadors que s'han emprat reconeixen les seqüències: N, N1, ORF1ab i RdRp (**Taula 3**) i s'han emprat solucions de treball a 10µM. Dins cada pouet de la placa de PCR es van introduir:

- 2,5µl cDNA
- 0,5µl Primer Mix
- 5µl SensiFAST SYBR No-Rox
- 2µl Water DEPC (0,1%)

A la RT-qPCR que s'ha fet per a estudiar la sensibilitat dels quatre encebadors, s'han processat les dilucions 1/100 i 1/1000 per triplicat. S'han seguit les mateixes pautes que a la primera RT-qPCR.

**Taula 3.** Encebadors usats a la RT-qPCR.

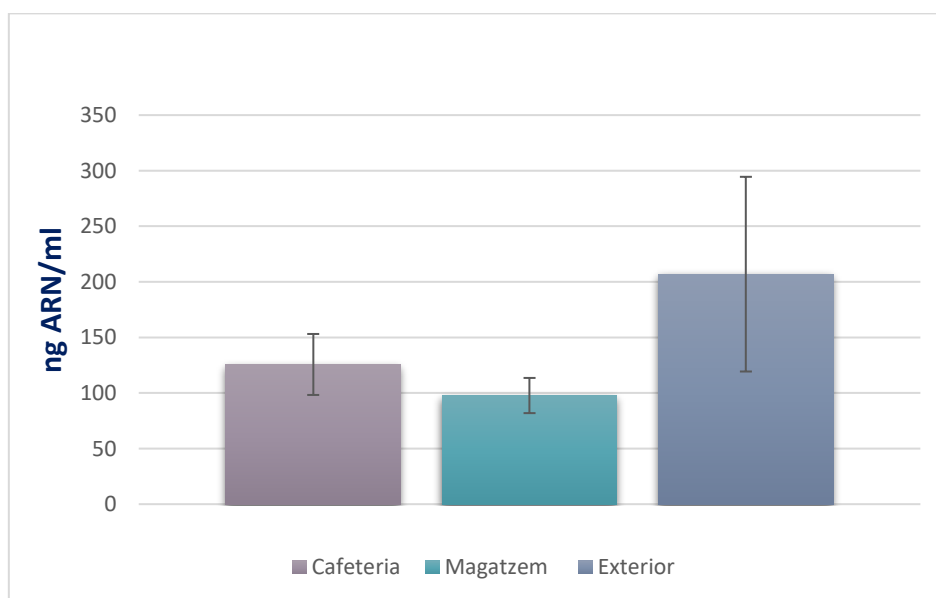
| <b>Seqüència</b> | <b>Encebador</b> | <b>Seqüència (5'-3')</b>   |
|------------------|------------------|----------------------------|
| <i>Gen N</i>     | Forward          | GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAT    |
|                  | Reverse          | CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG     |
| <i>Gen N1</i>    | Forward          | GACCCCAAATCAGCGAAAT        |
|                  | Reverse          | TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG   |
| <i>ORF1ab</i>    | Forward          | CCCTGTGGGTTTTACTTAA        |
|                  | Reverse          | ACGATTGTGCATCAGCTGA        |
| <i>Gen RdRp</i>  | Forward          | GTGARATGGTCATGTGTGGCGG     |
|                  | Reverse          | CARATGTTAAASACACTATTAGCATA |

**Taula 4.** Cicle tèrmic RT-qPCR

|  |             |             |           |
|--|-------------|-------------|-----------|
| <b>Activació Polimerasa i<br/>Desnaturalització cDNA</b> | 95°C        |             | 2'        |
| <b>Desnaturalització</b>                                 | 95°C        | x 45 cicles | 5''       |
| <b>Hibridació i Extensió</b>                             | 60°C        |             | 30''      |
| <b>Gradient de temperatura</b>                           | 65°C – 95°C |             | 0,5°C/5'' |
| <b>Conservació</b>                                       | 4 °C        |             |           |

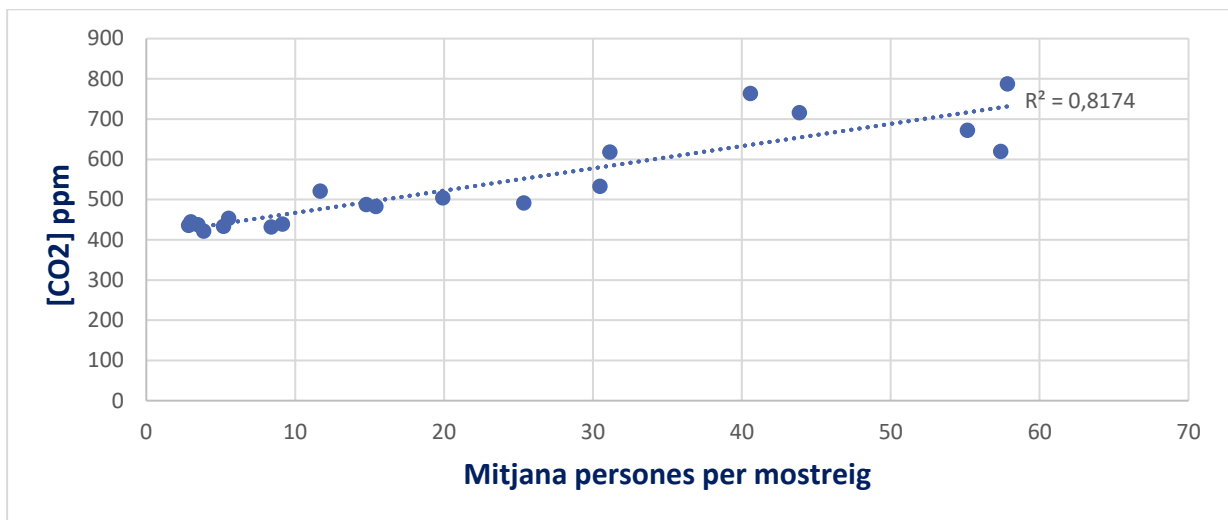
## RESULTATS

- a. En el primer experiment s'ha quantificat la concentració d'ARN que trobem als bioaerosols recollits dins 3 ambients que difereixen en el nombre de persones i en l'abundància de la microbiota natural. S'han recollit un total de 20 mostres de la cafeteria, 5 mostres del magatzem i 5 mostres de l'exterior. Com es pot observar a la **Figura 3**, s'ha trobat una major quantitat d'ARN, expressat per volum de medi de recollecció, a les mostres preses a l'exterior amb  $207 \pm 88$  ng ARN/ml. A la cafeteria s'ha quantificat una concentració d'ARN de  $126 \pm 27$  ng ARN/ml i al magatzem és on s'han registrat una menor quantitat d'ARN, amb  $98 \pm 16$  ng ARN/ml.

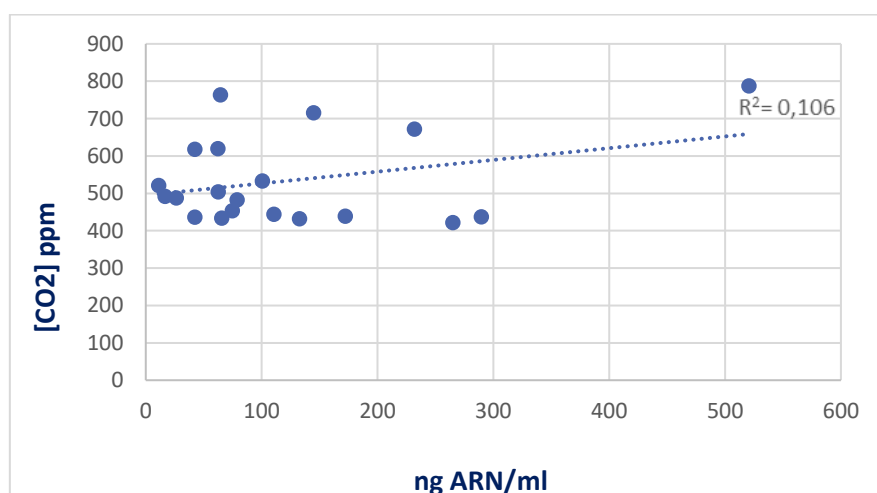


**Figura 3.** Concentració d'ARN obtingut de bioaerosols en 3 ambients (cafeteria, magatzem i exterior) amb l'error estàndard de la mitjana (SEM).

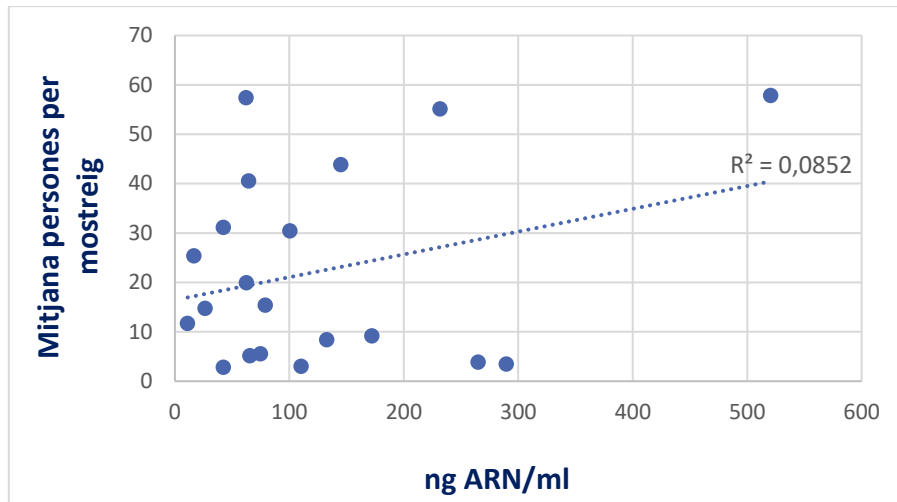
Posteriorment, s'han correlacionat les concentracions obtingudes de les 20 mostres de la cafeteria amb els nivells de CO<sub>2</sub> i amb el nombre mitjà d'individus que estaven a la cafeteria. Les correlacions s'han obtingut a partir del coeficient de determinació R<sup>2</sup>. A la **Figura 4**, s'ha representat la mitjana de persones per mostreig en relació amb la concentració de CO<sub>2</sub> de la cafeteria. Aquí trobem una correlació molt propera a 1 (R<sup>2</sup>= 0,817). Com es pot observar a la **Figura 5**, hi ha una correlació moderada (R<sup>2</sup>=0,106) entre la concentració d'ARN en bioaerosols i la concentració de CO<sub>2</sub> a l'ambient. Finalment, a la **Figura 6**, s'ha representat la concentració d'ARN obtingut de bioaerosols en relació a la mitjana de persones que s'han compatibilitzat cada 5 minuts durant els 60 minuts de mostreig. Com es pot observar, trobem una correlació molt dèbil entre aquests dos factors (R<sup>2</sup>=0,085).



**Figura 4.** Mitjana de persones per mostreig en relació amb la concentració de CO<sub>2</sub> de la cafeteria amb el coeficient de determinació R<sup>2</sup>.

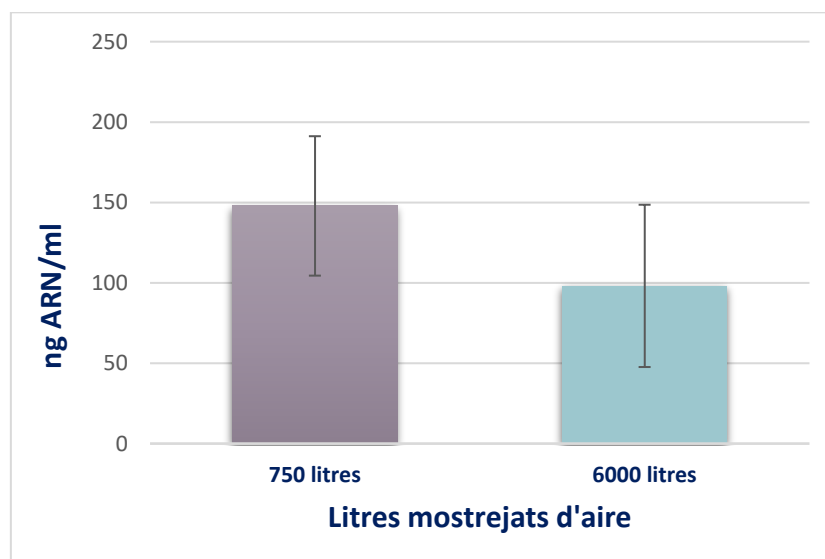


**Figura 5.** Concentració d'ARN obtingut de bioaerosols durant els 60 minuts de mostreig en relació amb la ventilació de la cafeteria. Amb el coeficient de determinació R<sup>2</sup>.



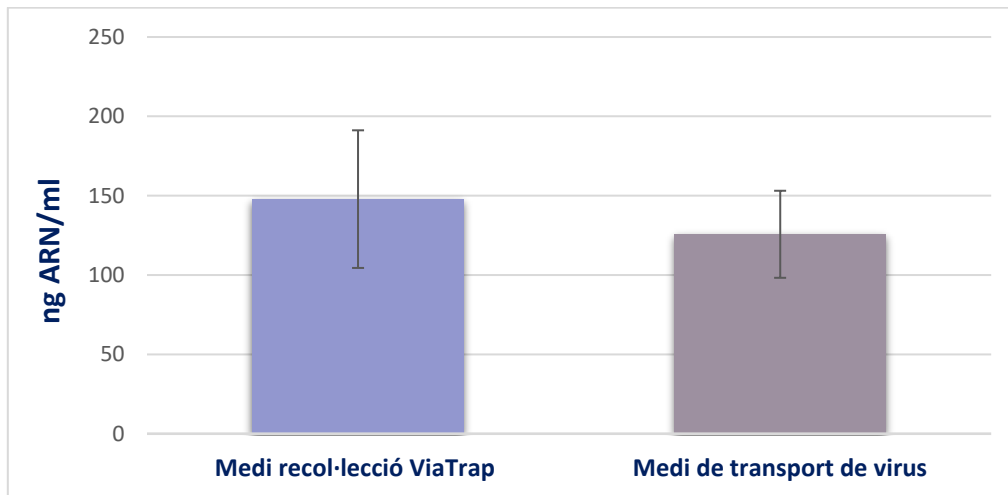
**Figura 6.** Concentració d'ARN obtingut de bioaerosols en relació la mitjana de persones que han estat a la cafeteria durant el temps de mostreig amb el coeficient de determinació  $R^2$ .

- b. A la segona part de l'experiment s'ha quantificat ARN de bioaerosols amb el medi de recollida hidròfob (ViaTrap) amb l'objectiu de comprovar si els mostrejos de volums molt grans d'aire permeten recollir més quantitat d'ARN. S'han quantificat un total de 5 mostrejos de bioaerosols recollits durant 60 minuts (750 litres d'aire) i un total de 4 mostrejos recollits durant 8 hores (6000 litres d'aire). Com es pot observar a la **Figura 7**, s'ha recollit una major concentració d'ARN durant els mostrejos de 60 minuts, amb una concentració mitjana de  $148 \pm 43$  ng ARN/ml. En canvi, durant els mostrejos de 8 hores (6000 litres), s'ha quantificat una mitjana de  $98 \pm 50$  ng ARN/ml. Per tant, això suposa un 24,8% menys respecte als mostrejos de 60 minuts.



**Figura 7.** Concentració d'ARN obtingut de bioaerosols amb mostrejos de 750 litres d'aire i de 6000 litres d'aire a partir del medi recollidor ViaTrap amb l'error estàndard de la mitjana (SEM).

També s'ha analitzat l'eficiència del medi de recol·lecció hidròfob (ViaTrap) en comparació amb el medi de transport de virus. Per a fer això, s'han comparat les concentracions d'ARN de les mostres de bioaerosols recollides en un laboratori de Son Espases amb el medi de recol·lecció ViaTrap, amb les concentracions d'ARN de les mostres de la cafeteria recollides amb el medi de transport de virus. Aquests dos espais es caracteritzen per ser zones habitades poc ventilades. Com es pot observar a la **Figura 8**, s'han obtingut concentracions molt semblants entre els dos medi de recol·lecció:  $148 \pm 43$  ng ARN/ml amb el medi ViaTrap i  $126 \pm 27$  ng ARN/ml amb el medi de transport de virus.



**Figura 8.** Concentració mitjana d'ARN de bioaerosols de llocs habitats (laboratori i cafeteria) emprant dos medis de recol·lecció amb l'error estàndard de la mitjana (SEM).

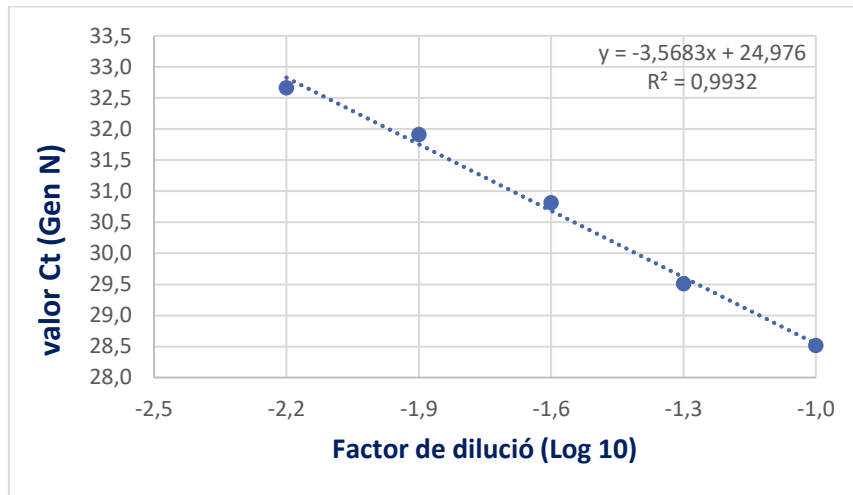
- c. A la tercera part de l'experiment s'ha comprovat l'eficiència, l'especificitat i la sensibilitat de quatre parelles d'encebadors en la detecció de SARS-CoV-2 a través d'una RT-qPCR.

L'eficiència es refereix a l'amplificació màxima que es pot obtenir en un nombre determinat de cicles. Per a la comprovació de l'eficiència de cada encebador, s'han representat els factors de dilució amb un logaritme en base 10 per tal que hi hagi la mateixa distància entre cada punt. Com es pot observar a la **Figura 9**, els encebadors que reconeixen la seqüència N, presenten una  $R^2=0,9932$ . A la **Figura 10**, els encebadors que reconeixen la seqüència N1 presenta una  $R^2=0,9761$ . A la **Figura 11**, els encebadors que reconeixen la seqüència ORF1ab, presenta una  $R^2=0,9692$ . I finalment a la **Figura 12**, l'encebador que reconeixen la seqüència RdRp, presenten una  $R^2=0,9928$ . Els encebadors que reconeixen la seqüència N són els que presenten un valor de  $R^2$  més proper a 1, per tant, proporciona una bona confiança per a correlacionar els valors. D'acord amb els valors de l'eficiència que es presenta a la **Taula 5**, l'encebador que reconeix la seqüència del gen ORF1ab resulta ser el més

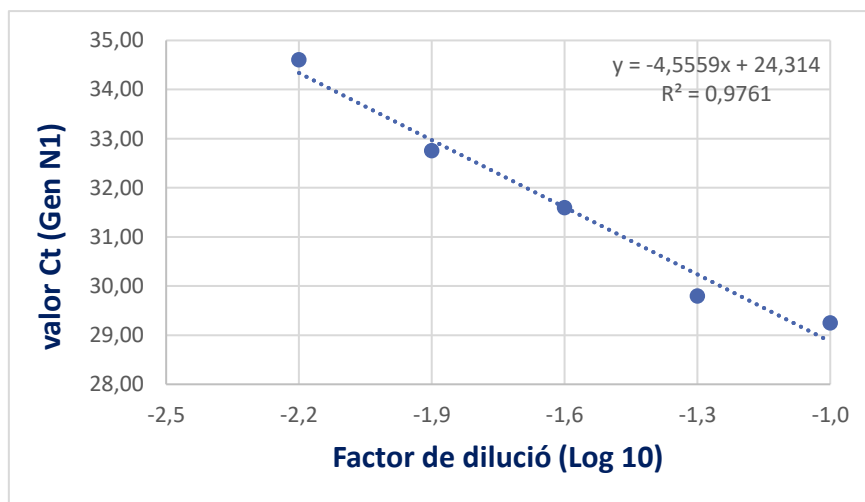
eficient (E=102,96%)

**Taula 5.** Valors de R<sup>2</sup> i eficiència de cada encebador. Eficiència acceptada (90-110%).

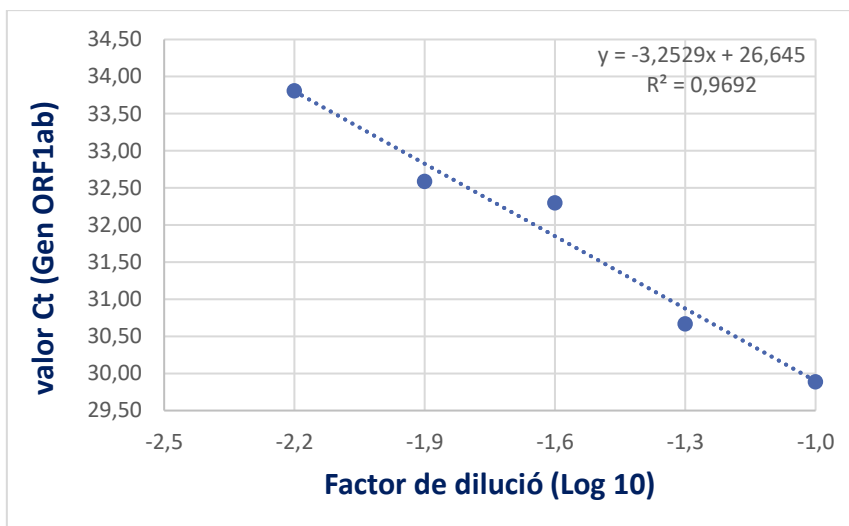
| Seqüència      | Gen N  | Gen N1 | ORF1ab  | Gen RdRp |
|----------------|--------|--------|---------|----------|
| R <sup>2</sup> | 0,9932 | 0,9761 | 0,9692  | 0,9928   |
| Eficiència (%) | 90,66% | 65,78% | 102,96% | 72,58%   |



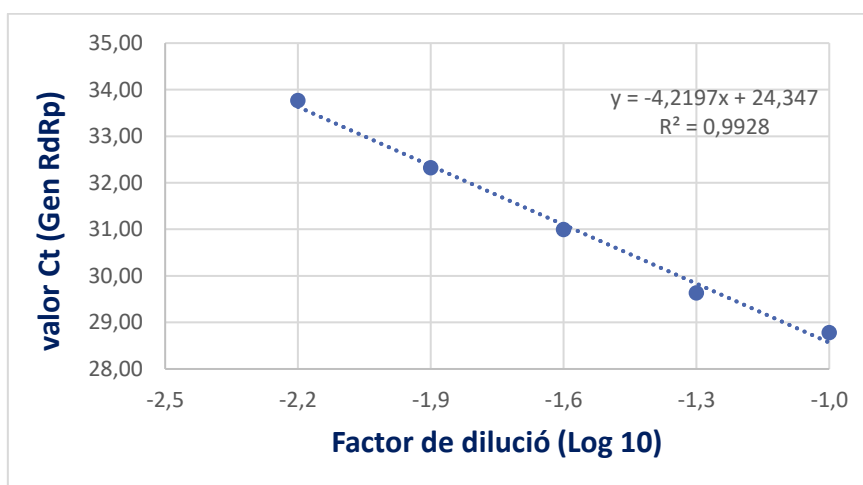
**Figura 9.** Valors de Ct del gen N per a cada factor de dilució.



**Figura 10.** Valors de Ct del gen N1 per a cada factor de dilució.



**Figura 11.** Valors de Ct del gen ORF1ab per a cada factor de dilució.

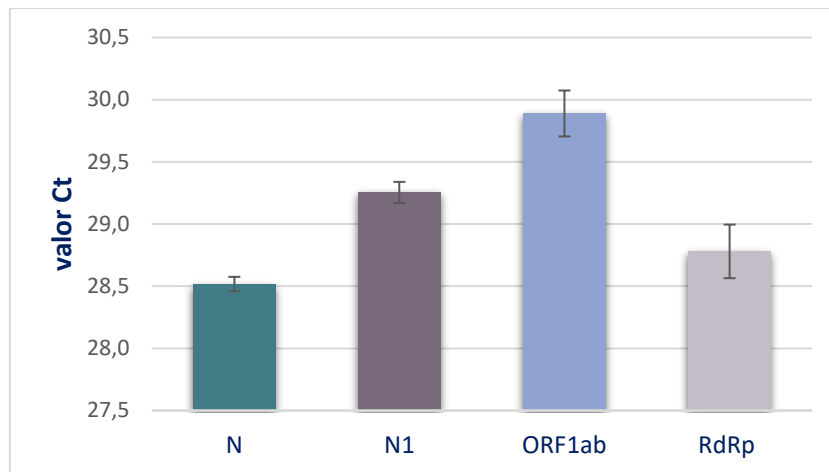


**Figura 12.** Valors de Ct del gen RdRp per a cada factor de dilució.

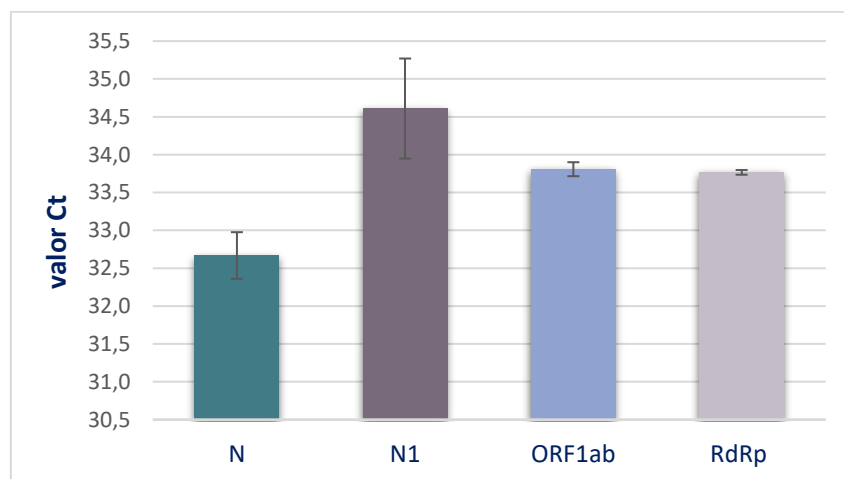
Per a la comprovació de l'especificitat dels 4 encebadors, s'han representat els valors de Ct de cada encebador que reconeixen les seqüències N, N1, ORF1ab i RdRp. Amb l'especificitat es vol saber si l'encebador que s'han emprat, realment s'estiguin unint a la regió del cDNA que es vol amplificar, i que no estiguin amplificant altres seqüències que no són d'interès.

A la **Figura 13** s'ha representat el valor Ct de la concentració més alta de cDNA que s'ha mesurat (1/10) i a la **Figura 14** s'ha representat el valor Ct de la concentració més baixa de cDNA que s'ha mesurat (1/160). Clarament, els encebadors que ha requerit menys cicles per amplificar la seva seqüència són els que reconeixen la seqüència N. S'han requerit 28,52 cicles per amplificar la seqüència del gen N quan la mostra es troba a una concentració 1/10 i 32,67 cicles per amplificar la seqüència del gen N quan la mostra es troba a una concentració 1/160.



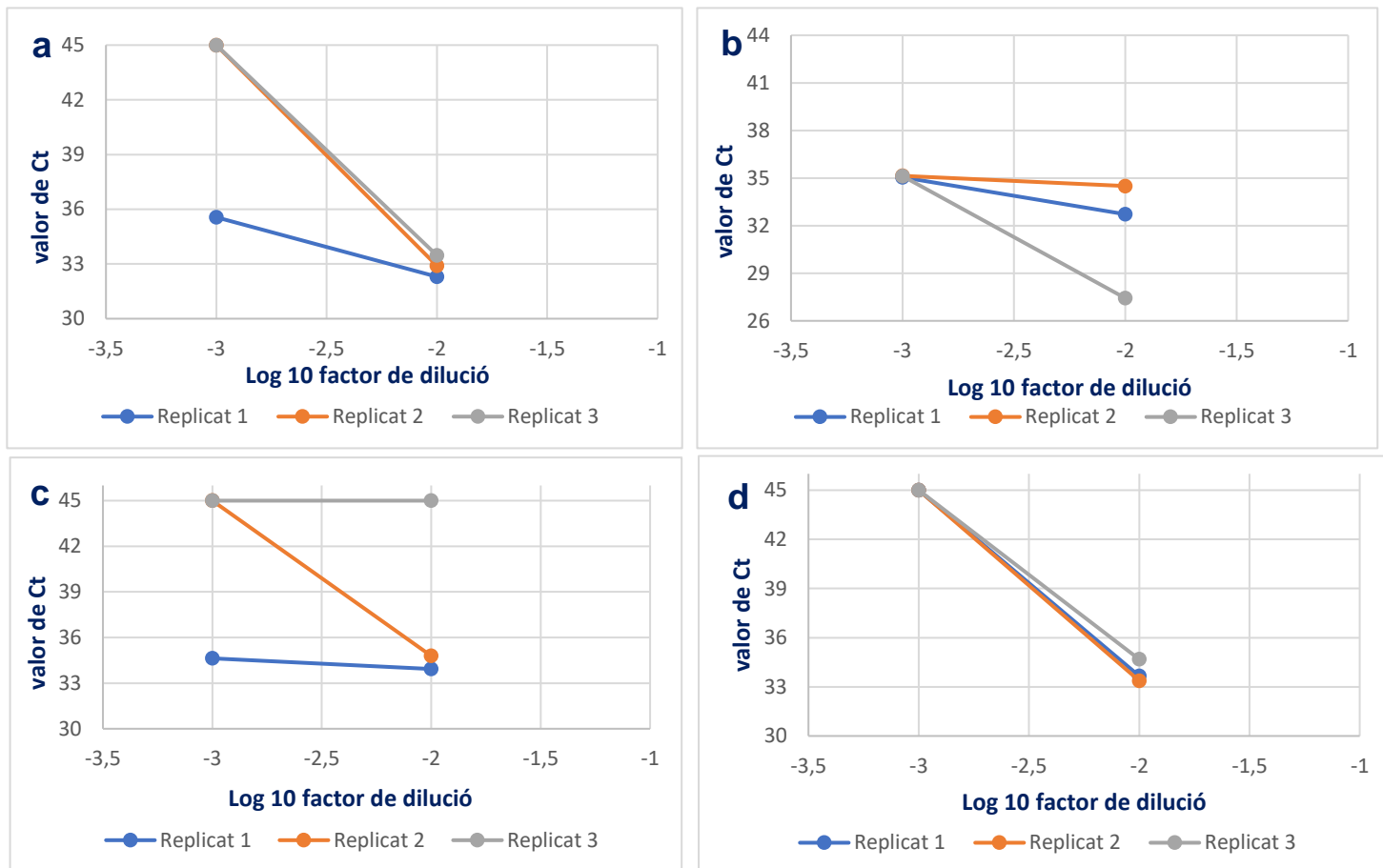


**Figura 13.** Valor promig de Ct de totes les seqüències per a una concentració 1/10 de la mostra amb l'error estàndard de la mitjana (SEM).



**Figura 14.** Valor promig de Ct de totes les seqüències per a una concentració 1/160 de la mostra amb l'error estàndard de la mitjana (SEM).

La sensibilitat es refereix a la quantitat mínima que es necessita de cDNA per a que es pugui detectar amplificació de les seqüències. Per analitzar la sensibilitat de les quatre parelles d'encebadors, es presenten a la **Figura 15** els valors de Ct de les tres rèpliques de cada mostra. Només hi ha hagut un sol encebador (N1) que ha amplificat el cDNA a tots els replicats de les dues dilucions, ja que, valors de Ct > 45 signifiquen que no hi ha hagut amplificació. Els replicats 1, 2 i 3 del gen N1 per a la dilució 1/100, han donat valors de Ct molt heterogenis, és a dir, el nombre de cicles necessaris per amplificar el cDNA ha variat. En canvi, a la dilució 1/1000, els tres replicats tenen el mateix valor de Ct. Es podria dir, que l'encebador que reconeix la seqüència N1 del genoma de SARS-CoV-2 té una major sensibilitat. L'encebador que presenta una menor sensibilitat és el que reconeix per la seqüència ORF1ab, ja que, cada rèplica dona uns valors de Ct diferents i una d'elles no ha estat detectada a cap de la dues dilucions.



**Figura 15.** Comparació de la sensibilitat analítica de les quatre parelles d'encebadors a través de dilucions 1/100 i 1/1000. (a) Valors de Ct de la seqüència per N. (b) Valors de Ct de la seqüència N1. (c) Valors de Ct de la seqüència que reconeix per ORF1ab. (d) Valors de Ct de la seqüència per RdRp. El cycle 45 indica que el valor Ct no és detectable.

## DISCUSSIÓ

Aquest treball, segons els resultats obtinguts, ha pogut confirmar que l'ARN aïllat de les mostres d'aire recollides a habitacions interiors no ventilades, no prové exclusivament dels bioaerosols de la respiració, sinó que també prové de la microbiota natural. Trobem quantitats d'ARN similars o inclús majors a l'exterior, i també quantitats d'ARN similars en un espai interior no ocupat per persones.

Té sentit que es trobi una major concentració d'ARN a l'exterior, ja que hi ha una gran aportació d'ARN per part de microorganismes que es troben en suspensió a l'aire, especialment bacteris i fongs. La presència d'un o un altre tipus depèn de l'origen, la direcció i intensitat de la corrent d'aire i de la supervivència del microorganisme. A part de bacteris i fongs, com ja sabem, els virus també es poden trobar a l'aire i ser transportat per ell (Mosso, M.A. *et al.*, 2002). El

nombre de microorganismes i, com a conseqüència, la concentració d'ARN serà major a l'espai exterior ja que aquest augmenta a zones poblades i amb molta activitat, com és el nostre cas (Mosso, M.A. *et al.*, 2002).

Però hi ha un factor molt important que impedeix que no es produeixin tants contagis a zones d'exterior. Aquest factor és la ventilació. Està confirmat que els espais a l'aire lliure, encara que trobem molts microorganismes, hi ha un risc baix de contagis. No només per la major ventilació que suposa, sinó també per l'efecte de la radiació solar. S'ha vist que la radiació solar inactiva el virus SARS-CoV-2 (Constantin, J.G. *et al.*, 2020).

La presència de persones a la cafeteria és el factor que provoca que s'hagin quantificat majors concentracions d'ARN que en el magatzem. Segons els resultats, es pot dir que la presència de persones a la cafeteria ha aportat un 22,24% més d'ARN ambiental en comparació amb el magatzem. És a dir, la resta d'ARN de bioaerosols que s'ha recollit a la cafeteria provindria de la microbiota natural de l'aire.

En relació a les correlacions entre la concentració d'ARN quantificat de les mostres de bioaerosols de la cafeteria i la concentració de CO<sub>2</sub> i la mitjana de persones per mostreig, es veu que hi ha una correlació dèbil. On sí que es troba una forta correlació és entre la mitjana de persones que hi ha a la cafeteria i la concentració de CO<sub>2</sub> que es detecta dins el recinte. Aquesta correlació té sentit, ja que, dins un lloc semiobert com és la cafeteria, la concentració de CO<sub>2</sub> va augmentant a mesura que augmenta la proporció d'individus. Seguint aquest raonament, la concentració d'ARN respecte a la concentració de CO<sub>2</sub> i al nombre d'individus a la cafeteria a priori també hauria de seguir una correlació alta, però no és el cas.

Creiem que ens trobem davant certes limitacions durant la recollida de mostres de bioaerosols a l'hora de preservar la integritat total de l'ARN. Encara que el BioSampler presenta una eficiència molt elevada recollint aerosols i és l'aparell que millor preserva la viabilitat dels virus recol·lectats (Fabian, P. *et al.*, 2009), podria ser que la pressió de l'aire que exerceix el mostrejador sigui un factor important per a la viabilitat de les mostres recol·lectades (Kim, S.W. *et al.*, 2007), particularment sobre l'estabilitat de l'ARN. Per tant, pot ser que el BioSampler no sigui suficientment adequat per aconseguir la viabilitat de tots els virus. A part de la pressió de l'aire sobre les mostres, també es planteja la possibilitat que l'ARN es vagi degradant durant el temps de recol·lecció de bioaerosols, cosa que els resultats de recollides de 8 hores ens suggereix. Per tant, aquests dos factors serien els motius pels quals no s'estableix una correlació més forta entre la concentració de CO<sub>2</sub> i la mitjana d'individus amb l'ARN dels bioaerosols.

No s'ha pogut confirmar la hipòtesi inicial que s'ha plantejat al principi d'aquest treball en relació a l'obtenció d'una major concentració d'ARN en mostres de volums més grans d'aire.

Com s'ha exposat als resultats, s'ha vist que, tot i fent mostrejors de 8 hores (6000 litres d'aire) amb un medi de recol·lecció hidròfob, s'obté un 33,65% menys d'ARN en comparació amb mostrejors de 60 minuts. Podem interpretar que els mostrejors llargs resulten en una major degradació de l'ARN, ja que és una molècula molt més inestable i fràgil que l'ADN. Per tant, no seria recomanable realitzar recol·leccions de bioaerosols tant llargues, ja que, s'obtidran inclús menors concentracions d'ARN que a les recol·leccions de 60 minuts.

Veient els resultats obtinguts, es pot dir que, amb el medi de recol·lecció hidròfob (ViaTrap), s'ha obtingut un 15% més d'ARN que amb el medi de transport víric. Es compleix la hipòtesi que s'ha proposat a l'inici d'aquest treball, que proposa que el medi de recol·lecció té influència sobre la concentració d'ARN recollit. Sabent aquests resultats, sembla interessant realitzar altres estudis basats en la recol·lecció de virus que tenen un embolcall lipídic en un medi hidròfob per obtenir una major quantitat d'ARN.

Segons els resultats obtinguts, es pot afirmar que el medi de recol·lecció on s'acumula la mostra del bioaerosols és un factor metodològic a considerar, encara que trobem estudis que consideren que és un paràmetre secundari (Kim, S.W. *et al.*, 2007). Per tant, per a futures recol·leccions de mostres de bioaerosols, podria ser interessant emprar aquest medi hidròfob.

En relació a l'eficiència dels encebadors, en una reacció de PCR perfectament eficient, la quantitat o el nombre de còpies de molècules d'ADN es duplica a cada cicle, però, a causa d'una sèrie de factors, en condicions experimentals l'eficiència pot variar lleugerament. Un dels factors més important és l'error de mostreig. Normalment s'accepta l'eficiència d'un encebador quan es troba en un interval entre el 90 i el 110% ("Real-time PCR: understanding Ct" ThermoFisher Scientific). Per tant, segons els resultats que s'han vist anteriorment, l'encebador més eficient és el que reconeix per la seqüència ORF1ab, ja que presenta una eficiència d'un 102,96% amb una  $R^2=0,9692$ . En línia amb aquests resultats, la seqüència ORF1ab està considerada com una bona diana pel diagnòstic de SARS-CoV-2 (Park, C. *et al.*, 2021).

Segons els resultats obtinguts, s'ha vist que l'encebador més específic per a la detecció de SARS-CoV-2, correspon l'encebador que reconeix el gen N. Això implica que, aquest encebador reconeix la seqüència del gen que es vol amplificar, amb un percentatge de fiabilitat més alt que els altres. L'ús d'aquest encebador pot ser molt interessant a l'hora de detectar SARS-CoV-2 a mostres on es sap que hi ha concentracions elevades del virus; com pot ser el cas d'una persona amb COVID-19. No obstant, per a concentracions baixes del virus, com és el cas del bioaerosols, aquest encebador podria no ser el més útil. Cal recordar que en els dos estudis realitzats en el projecte IDEQUIRE es troben més resultats positius a bioaerosols quan s'empren els encebadors que reconeixen ORF1ab (Estudi 1= 26,3% i Estudi 2=32,3%).

Els resultats d'aquest treball no estan d'acord amb els resultats del projecte IDEQUIRE. Aquesta discordança es podria explicar per la utilització de mostres de distint origen. Així, en un estudi s'han analitzat mostres biològiques de pacients amb COVID-19 que es troben a la fase inicial de la patologia, la qual és la més infecciosa. Aquestes mostres han resultat tenir una major positivitat es el gen RdRp amplificat. També s'han pres mostres de pacients amb COVID-19 amb una fase més avançada de la patologia, és a dir, la menys infecciosa. Aquí, en canvi, s'ha observat una major positivitat en el gen N amplificat (Reina, J. & Suárez, L. 2020). Podria ser que en aquesta fase els virus ja estiguin més degradats i que, per això algunes regions ja no es reconeixen i se'n reconeixen d'altres. Aquest resultats permeten donar una explicació als resultats d'aquest treball, ja que, podria ser que a les mostres biològiques analitzades en el present treball. Es proposa que aquesta diferència de resultats es degut a l'origen de les mostres, unes d'origen biològic i les altres provinents de bioaerosols.

Tal i com s'ha dit als resultats, es pot afirmar que l'encebador que presenta una major sensibilitat és el que reconeix el gen N1. Un estudi, va analitzar la sensibilitat entre els encebadors que reconeixen els gens N1 i N2. Es va concloure que l'encebador N1 tenia una major sensibilitat que l'encebador N2. També es va trobar que usant el encebador N1, es trobaven més mostres amb valors de Ct més baixos comparat amb els valor de Ct del encebador N2 (Vogels, C.B. *et al.*, 2020).

L'encebador N1, podria ser molt útil a l'hora d'amplificar mostres poc concentrades d'ARN, ja que permet la detecció de la seqüència a baixes concentracions. D'acord amb els resultats aquí presentats, l'alta sensibilitat que té l'encebador N1 permetria detectar SARS-CoV-2 a mostres on la concentració és molt baixa, com són els bioaerosols.

Tot això, trobem una contradicció entre els resultats de l'especificitat i els de la sensibilitat. Per l'anàlisi de l'especificitat el Ct de l'encebador que reconeix el gen N1 a una concentració 1/160 és el que té un valor més elevat. Seria l'encebador menys específic en aquesta concentració. En canvi, aquest mateix encebador, a l'anàlisi de la sensibilitat és el que té valor més baixos de Ct, per tant, el més sensible. En conclusió, la sensibilitat dels encebadors depèn de la concentració que considerem . Encara així, es pot afirmar, que independentment de la dilució que es consideri, l'encebador més específic correspon al que reconeix el gen N.

## CONCLUSIONS

---

1. L'ARN aïllat de les mostres d'aire recollides no prové exclusivament dels bioaerosols de la respiració. Un percentatge petit prové de la respiració, però una altra part prové de la microbiota natural de l'aire. I per aquest motiu s'han quantificat concentracions més altes d'ARN a una zona d'exterior on no hi ha aportació de bioaerosols provinents de la respiració, sinó que el que s'obté és l'ARN d'altres microorganismes que habiten a l'ambient.
2. No s'ha pogut establir que existeixi una correlació forta entre la concentració d'ARN del bioaerosols, i el nombre de persones de persones que trobem dins un recinte tancat o la concentració de CO<sub>2</sub>. Això podria ser degut a una possible degradació de l'ARN. Aquesta degradació pot ser provocada durant el temps de recol·lecció o per l'alta pressió a la que es sotmet la mostra durant la recol·lecció.
3. S'ha vist que en recol·leccions de volums més grans de bioaerosols trobem menys quantitat d'ARN probablement degut a la degradació de l'ARN durant el temps de mostreig dels bioaerosols.
4. El medi de recol·lecció presenta una certa influència sobre la concentració d'ARN recollit, ja que s'han trobat lleugeres diferències en la quantificació de mostres recollides amb els dos medis de recol·lecció. El medi hidròfob és el que permet una major recol·lecció d'ARN ambiental.
5. Hi ha tres encebadors que, en principi, podrien ser més interessants a l'hora de detectar SARS-CoV-2. Els encebadors que reconeixen la seqüència ORF1ab mostren una major eficiència respecte als altres encebadors estudiats. Els encebadors que reconeixen el gen N mostren una major especificitat en la detecció del virus. En canvi, els encebadors que reconeixen el gen N1 mostren una major sensibilitat respecte als altres encebadors. Tenint en compte els resultats de detecció a bioaerosols, es conclou que les característiques dels encebadors difereixen en funció del tipus de mostra analitzada (biològica, bioaerosol).

## AGRAÏMENTS

---

Vull donar les gràcies als meus companys i companyes de la carrera, als meus amics i amigues i a la meua família. Totes elles m'han estat animant durant aquesta etapa i han fet que tot sigui més fàcil. També vull agrair als companys i companyes del laboratori de Son Espases per ensenyar-me a posar en pràctica tot el que he après durant la carrera.

## BIBLIOGRAFIA

---

Aghalari, Z., Dahms, H. U., Sosa-Hernandez, J. E., Oyervides-Muñoz, M. A., & Parra-Saldívar, R. (2021). Evaluation of SARS-COV-2 transmission through indoor air in hospitals and prevention methods: A systematic review. *Environmental Research*, 110841.

Ahn, D. G., Shin, H. J., Kim, M. H., Lee, S., Kim, H. S., Myoung, J., ... & Kim, S. J. (2020). Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Journal of microbiology and biotechnology*, 30(3), 313-324.

Anderson, E. L., Turnham, P., Griffin, J. R., & Clarke, C. C. (2020). Consideration of the aerosol transmission for COVID-19 and public health. *Risk Analysis*, 40(5), 902-907.

Chan, K. H., Sridhar, S., Zhang, R. R., Chu, H., Fung, A. F., Chan, G., ... & Yuen, K. Y. (2020). Factors affecting stability and infectivity of SARS-CoV-2. *Journal of Hospital Infection*, 106(2), 226-231.

Cheng, V. C., Wong, S. C., Chen, J. H., Yip, C. C., Chuang, V. W., Tsang, O. T., ... & Yuen, K. Y. (2020). Escalating infection control response to the rapidly evolving epidemiology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) due to SARS-CoV-2 in Hong Kong. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 41(5), 493-498.

Constantin, J. G., Montesinos, N. V., Santágata, D., Quici, N., Lichtig, P., Espada, R., & Rössler, C. Transmisión de SARS-CoV-2 por vía aérea (inhalación de aerosoles). Medidas de reducción de exposición.

Cox, C. S., Gagen, S. J., & Baxter, J. (1974). Aerosol survival of *Serratia marcescens* as a function of oxygen concentration, relative humidity, and time. *Canadian journal of microbiology*, 20(11), 1529-1534.

Dumont-Leblond, N., Veillette, M., Mubareka, S., Yip, L., Longtin, Y., Jouvét, P., ... & Duchaine,

C. (2020). Low incidence of airborne SARS-CoV-2 in acute care hospital rooms with optimized ventilation. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 2597-2605.

Fabian, P., McDevitt, J. J., Houseman, E. A., & Milton, D. K. (2009). Airborne influenza virus detection with four aerosol samplers using molecular and infectivity assays: considerations for a new infectious virus aerosol sampler. *Indoor air*, 19(5), 433.

Ge, Z. Y., Yang, L. M., Xia, J. J., Fu, X. H., & Zhang, Y. Z. (2020). Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 1-8.

Guzman, M. I. (2020). Bioaerosol size effect in COVID-19 transmission.

Hadei, M., Mohebbi, S. R., Hopke, P. K., Shahsavani, A., Bazzazpour, S., Alipour, M., ... & Chobineh, H. (2021). Presence of SARS-CoV-2 in the air of public places and transportation. *Atmospheric pollution research*, 12(3), 302-306.

Heo, K. J., Lim, C. E., Kim, H. B., & Lee, B. U. (2017). Effects of human activities on concentrations of culturable bioaerosols in indoor air environments. *Journal of Aerosol Science*, 104, 58-65.

Kesavan, J., & Sagripanti, J. L. (2015). Evaluation criteria for bioaerosol samplers. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(3), 638-645.

Kim, S. W., Ramakrishnan, M. A., Raynor, P. C., & Goyal, S. M. (2007). Effects of humidity and other factors on the generation and sampling of a coronavirus aerosol. *Aerobiologia*, 23(4), 239-248.

Lane, M. A., Brownsword, E. A., Babiker, A., Ingersoll, J. M., Waggoner, J., Ayers, M., ... & Kraft, C. S. (2021). Bioaerosol sampling for SARS-CoV-2 in a referral center with critically ill COVID-19 patients March-May 2020. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.

Mosso, M. A., Ullán, C., & de la Rosa, M. C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio medioambiental*, (5), 375-402.

Ong, S. W. X., Tan, Y. K., Chia, P. Y., Lee, T. H., Ng, O. T., Wong, M. S. Y., & Marimuthu, K.



(2020). Air, surface environmental, and personal protective equipment contamination by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient. *Jama*, 323(16), 1610-1612.

Park, C., Lee, J., Ul Hassan, Z., Ku, K. B., Kim, S. J., Kim, H. G., ... & Kim, S. (2021). Comparison of digital PCR and quantitative PCR with various SARS-CoV-2 primer-probe sets.

Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Al-Malkey, M. K., Alsubki, R. A., Ezzikouri, S., Al-Hababi, F. H., ... & Rodriguez-Morales, A. J. (2021). Airborne transmission of SARS-CoV-2 is the dominant route of transmission: droplets and aerosols. *Infez Med*, 29, 10-19.

"Real-time PCR: understanding Ct"- ThermoFisher Scientific- Applied biosystems.

Reina, J., & Suarez, L. (2020). Evaluación de diferentes genes en la detección por RT-PCR del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección. *Revista Española de Quimioterapia*, 33(4), 292.

Santarpia, J. L., Rivera, D. N., Herrera, V., Morwitzer, M. J., Creager, H., Santarpia, G. W., ... & Lowe, J. J. (2020). Transmission potential of SARS-CoV-2 in viral shedding observed at the University of Nebraska Medical Center. *MedRxiv*.

Truyols-Vives J, Sala-Llinàs., Río C, García-Baldoví H, Mercader-Barceló J(2021). Cuantificación del SARS-CoV-2 en muestras de aire del HUSE mediante PCR digital.2º Congreso Nacional Multidisciplinar COVID19 de las Sociedades Científicas de España.

Velarde, F., Mamani-Paco, R., & Andrade-Flores, M. (2020). Estimación de la probabilidad de contagio de covid-19 por aerosoles en ambientes cerrados: Aplicaciones a casos en la ciudad de La Paz, Bolivia. *Revista Boliviana de Física*, 37(37), 22-30.

Verreault, D., Moineau, S., & Duchaine, C. (2008). Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(3), 413-444.

Vogels, C. B., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Ott, I. M., Kalinich, C. C., ... & Grubaugh, N. D. (2020). Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature microbiology*, 5(10), 1299-1305.

Wei, J., & Li, Y. (2016). Airborne spread of infectious agents in the indoor environment.

American journal of infection control, 44(9), S102-S108.