



Obiettivo 6 Attività 6.1

Protocollo operativo per la gestione dei filtri di aerosol atmosferico (*outdoor* e *indoor*) destinati alla caratterizzazione microbiologica, molecolare e chimica

2022

Lo scopo di questo protocollo è quello di fornire una procedura univoca per la raccolta, il trasporto, la conservazione e la manipolazione dei filtri di aerosol (campionamenti outdoor e indoor) destinati alla determinazione degli acidi nucleici e/o microrganismi, oltre che alla caratterizzazione del particolato atmosferico.

Sommario

Generalità	2
1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.....	2
2 RIFERIMENTI	2
3 DEFINIZIONI	3
4 ATTREZZATURE E MATERIALI.....	4
5 MODALITA' OPERATIVE	4
5.1 Tipologie di filtri e strumenti di campionamento.....	5
5.2 Preparazione e manipolazione dei filtri di campionamento	6
5.3 Messa in opera dei campionatori e dei filtri, raccolta e conservazione dei campioni	6
5.4 Trasporto e conservazione	7
5.5 Metodi di analisi	7
5.6 Smaltimento del materiale di campo	7
5.7 Come evitare la contaminazione RNAsi.....	7

Generalità

La produzione di matrici di aerosol attraverso il campionamento, da sottoporre successivamente ad analisi, è una fase estremamente complessa e delicata che condiziona i risultati di tutte le operazioni successive e che, di conseguenza, incide in misura non trascurabile sull'attendibilità e l'affidabilità dei risultati analitici. Affinché il campione prelevato sia rappresentativo della matrice esaminata, tutte le operazioni relative al campionamento di un filtro di aerosol atmosferico devono essere eseguite da personale qualificato e costantemente aggiornato sulle procedure in materia e in ottemperanza alle norme di riferimento.

A livello nazionale e internazionale, protocolli e norme di riferimento per il campionamento delle diverse matrici ambientali sono ben definite, per settori, cioè a seconda del tipo di analisi a cui devono essere sottoposte (chimiche, biologiche, fisiche).

Al contrario, non sono attualmente disponibili protocolli che possano essere applicabili per il campionamento misto, ovvero che tenga conto contemporaneamente dei requisiti per le determinazioni microbiologiche, molecolari e chimiche.

L'attuale epidemia causata dal coronavirus (SARS-CoV-2) ha evidenziato l'urgente necessità di sviluppare e ottimizzare metodi per il campionamento e gestione dei campioni di aerosol per la determinazione di agenti infettivi quali virus a trasmissione aerea atti a rafforzare la gestione delle infezioni.

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il protocollo ha lo scopo di fornire una procedura atta a garantire la corretta manipolazione, il trasporto, la conservazione e l'analisi dei campioni di aerosol. La procedura si applica a campioni costituiti da filtri di diversa natura, che dovranno essere sottoposti ad indagini di laboratorio volte alla ricerca di materiale genetico e/o microrganismi o contaminanti chimici. Tale procedura sarà applicabile nei monitoraggi di emergenza.

2 RIFERIMENTI

UNI EN 12341, 2014	Aria ambiente - Metodo gravimetrico di riferimento per la determinazione della concentrazione in massa di particolato sospeso PM10 o PM 2.5
UNI EN ISO 23210, 2009	Emissioni da sorgente fissa – Determinazione della concentrazione in massa di PM10/PM2,5 negli effluenti gassosi – Misurazione a basse concentrazioni mediante l'uso di impattatori
UNI EN 14907, 2008	Qualità dell'aria ambiente. Metodo normalizzato di misurazione gravimetrico per la determinazione della frazione massima PM2,5 del particolato in sospensione.
ISO 13271, 2012	Stationary source emissions – Determination of PM10/PM2,5 mass concentration in flue gas – Measurement at higher concentrations by use of virtual impactors.
UNI CEN/TS 16450, 2013	Aria ambiente - Sistemi di misurazione automatici per la misurazione della concentrazione del particolato (PM10; PM2,5).

DM Maggio 2015	Decreto Ministeriale del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, del 5/5/2015. Metodo di campionamento e di analisi per la misura delle concentrazioni di massa totale e per speciazione chimica del materiale particolato PM10 e PM2.5. (<i>Allegato 1 G.U. Serie Speciale n. 28, 05/06/2015</i>)
D.Lgs. n 81 Aprile 2008	Decreto Legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Testo unico sulla salute e sicurezza sul lavoro. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. (<i>GU. n. 101 Suppl. Ord. n. 108, 30-4-2008</i>).
DM Gennaio 2017	Decreto Ministeriale del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, del 26/01/2017. Attuazione della direttiva (UE) 2015/1480 del 28 agosto 2015, che modifica taluni allegati delle direttive 2004/107/CE e 2008/50/CE nelle parti relative ai metodi di riferimento, alla convalida dei dati e all'ubicazione dei punti di campionamento per la valutazione della qualità dell'aria ambiente. (<i>GU Serie Generale n.33 del 09-02-2017</i>)
DM Marzo 2017	Decreto Ministeriale del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, del 30/03/2017. Procedure di garanzia di qualità per verificare il rispetto della qualità delle misure dell'aria ambiente, effettuate nelle stazioni delle reti di misura. (<i>GU Serie Generale n.96 del 26-04-2017</i>)

3 DEFINIZIONI

Rischio biologico	La probabilità che un individuo entri in contatto con un organismo patogeno, si infetti e contragga una malattia. Il rischio è il risultato di una serie di condizioni che hanno reso possibile l'evento.
Agenti patogeni	Virus, batteri, protozoi, tossine e qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare o endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni.
Misure di prevenzione	Il complesso di disposizioni e/o misure che diminuiscono l'entità del danno. Agiscono sulla magnitudo dell'incidente. Possono essere barriere biologiche, fisiche e chimiche.
Disinfezione	Utilizzo di mezzi fisici o chimici che uccidono i microrganismi, ma non necessariamente le spore.
Sterilizzazione	La sterilizzazione è un processo che uccide e/o rimuove tutte le classi di microrganismi e spore sia patogeni che saprofiti (calore secco o umido).

Contaminazione secondarie	Sono definite come il trasferimento diretto o indiretto di contaminanti, siano essi chimici, fisici o biologici, da una matrice contaminata ad una incontaminata, in modo volontario o involontario.
Ribonucleasi (RNAasi)	Famiglia di enzimi idrolasi.
Soluzione idroalcolica	Soluzione di acqua con una concentrazione alcolica.

4 ATTREZZATURE E MATERIALI

- Guanti in nitrile e/o vinile
- Pennarello indelebile
- Matita
- Sistema di localizzazione
- Pinzette in acciaio inossidabile o rivestite in PTFE, idonee alla manipolazione dei filtri
- Piastre Petri monouso
- Sistema refrigerante per la conservazione dei filtri durante il trasporto (es. borsa frigo e ghiaccio)
- Fogli di alluminio per proteggere le piastre Petri.
- Parafilm
- Detergente a base alcolica (almeno al 70%) per sterilizzare le pinzette
- Procedura di sterilizzazione
- Scheda di campo dei parametri ambientali quali temperatura, pH, etc.
- Bilancia (incertezza estesa (al 95%) di taratura inferiore a 25µg nel campo compreso tra 0,2 e 200 mg)
- Filtri bianchi di riferimento "di sala"
- Filtri bianchi di campo

5 MODALITA' OPERATIVE

Le modalità operative per il campionamento dell'aria previste dalle norme di riferimento sono

- **Campionamento attivo o volumetrico:** utilizzando un aspiratore, volumi predeterminati di aria vengono convogliati su una matrice adsorbente quale filtri, un mezzo liquido o fiale di desorbimento termico.
- **Campionamento passivo:** si basa su una raccolta per diffusione degli analiti su un adsorbente per sedimentazione ad intervalli temporali.
- **Campionamento dell'aria totale:** prevede la raccolta di un campione aspirando l'aria in un recipiente di contenimento, un contenitore in acciaio inossidabile o un canister in vetro.

Quando si lavora con agenti biologici è sempre necessario utilizzare tecniche adeguate di asetticità, al fine di evitare contaminazioni secondarie del campione (*cross-contamination*) nonché il rischio di esporre l'operatore ad eventuali contaminazioni. Le misure di prevenzione sono l'insieme di disposizioni e/o misure che diminuiscono l'entità del danno agendo sulla magnitudo dell'incidente e sono rappresentate da barriere biologiche, fisiche e chimiche. L'RNA è più suscettibile alla degradazione del DNA, a causa della capacità dei gruppi ossidrilici 2' di agire come nucleofili. Molte ribonucleasi (RNasi) aggirano la necessità di ioni metallici sfruttando il gruppo idrossile 2' come specie reattiva. Queste RNasi sono resistenti agli agenti chelanti dei metalli e alcuni di loro, come gli enzimi della famiglia RNasi A, possono sopravvivere all'ebollizione prolungata o all'autoclavaggio. Gli enzimi di tipo RNasi A si basano su residui di istidina del sito attivo per l'attività catalitica (1) e possono essere inattivati dall'agente alchilante specifico dell'istidina dietil pirocarbonato (DEPC).

Le Ribonucleasi (RNasi) sono una superfamiglia di enzimi, idrolasi, che si trovano in tutti i tipi di cellule e organismi, dai procarioti agli eucarioti. Questi enzimi hanno generalmente un'attività specifica molto elevata, il che significa che anche se presenti in piccolissime quantità in un campione di RNA sono sufficienti per distruggerlo. Le principali fonti di contaminazione da RNasi in un tipico laboratorio includono:

- Soluzioni acquose, reagenti utilizzati negli esperimenti.
- Esposizione ambientale, RNasi sono nell'aria, la maggior parte delle superfici e la polvere.
- Contatto umano con mani e pelle.

5.1 Tipologie di filtri e strumenti di campionamento

In relazione agli obiettivi del monitoraggio, viene effettuata la scelta del supporto filtrante. Tale scelta è motivata dalla tecnica analitica utilizzata per la caratterizzazione ed analisi del aerosol campionato.

I materiali adsorbenti generalmente utilizzati sono classificati in base alla tipologia di materiale e si distinguono in:

- **filtri a matrice fibrosa:** fibra di vetro, fibra di quarzo;
- **filtri a membrana:** estere di cellulosa, polivinilcloruro PVC, politetrafluoroetilene PTFE);
- **struttura porosa capillare:** policarbonato PC.

Strumenti comunemente utilizzati per il campionamento microbiologico dell'aria indoor sono:

- **Surface Air System –SAS:** è utilizzato nel campionamento attivo ad impatto ortogonale
- **Reuter Centrifugal Sampler –RCS:** aspira l'aria convogliandola su una striscia di substrato agarizzato.

In particolare, il filtro in fibra di quarzo è adatto per la determinazione del carbonio, degli ioni, degli IPA e dei metalli. I filtri vanno sempre manipolati con molta cura utilizzando pinzette a testa piatta, liscia e arrotondata, per non danneggiare il filtro e devono essere maneggiati in assenza di correnti d'aria. Le pesate dei filtri bianchi e, successivamente, degli stessi dopo il campionamento, devono essere conformi alle indicazioni della norma tecnica UNI EN 12341.

Misure di PM_{2,5} e PM₁₀. Il metodo di riferimento per il campionamento e la misurazione è descritto nella norma UNI EN 12341:2014 “Aria ambiente - Metodo gravimetrico di riferimento per la determinazione della concentrazione in massa di particolato sospeso PM₁₀ o PM_{2,5}”. Principio di misura: gravimetria, assorbimento radiazione β .

Poiché non esiste uno standard di riferimento per la misura di PM₁₀ e PM_{2,5}, la normativa definisce la quantità misurata come PM_x per convenzione, specificando il disegno della testa di prelievo e tutti i parametri operativi ad essa associati in modo da coprire l'intero processo di misura. La Tabella 1 della UNI EN 12341 fornisce i requisiti che devono essere posseduti dal sistema di campionamento. In definitiva, si definisce PM_x il materiale particolato sospeso in aria, sufficientemente piccolo da passare attraverso il sistema di prelievo a flusso costante, con un'efficienza di taglio del 50% alla dimensione di $x \mu\text{m}$ come diametro aerodinamico.

Per la categoria di monitoraggi di emergenza qui trattati, è necessario che tutta l'attrezzatura direttamente o indirettamente a contatto con i filtri sia opportunamente pulita.

5.2 Preparazione e manipolazione dei filtri di campionamento

La preparazione e la manipolazione dei filtri prima e dopo il campionamento di PM deve avvenire secondo le procedure standard in vigore (UNI EN 12341). I filtri da sottoporre a campionamento devono necessariamente essere pretrattati in muffola ad almeno 600°C per 5 ore, per eliminare qualsiasi eventuale traccia di sostanze organiche che possa aver contaminato il filtro stesso creando un artefatto.

Una volta concluso il campionamento in campo, è necessario porre particolare attenzione per minimizzare la contaminazione da RNasi.

Per operare in modo privo di RNasi, è necessario prendere le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'utilizzo di contenitori e soluzioni monouso e non monouso mentre si lavora con l'RNA:

- *Non utilizzare plastica o vetreria senza prima eliminare la possibile contaminazione da RNasi. Usare detergenti in commercio per la loro neutralizzazione.*
- *Indossare sempre guanti in lattice o vinile durante la manipolazione dei campioni di RNA per evitare la contaminazione da RNasi dalla superficie della pelle o da apparecchiature di laboratorio polverose.*
- *Cambiare frequentemente i guanti e tenere i tubi chiusi quando possibile.*
- *Mantenere l'RNA purificato su ghiaccio quando le aliquote vengono pipettate per applicazioni a valle.*

5.3 Messa in opera dei campionatori e dei filtri, raccolta e conservazione dei campioni

Individuato nella fase preliminare di verifica il sito di misura, l'installazione della strumentazione deve rispondere alle vigenti norme in materia di sicurezza elettrica e comunque non costituire rischio per gli operatori e per la popolazione. Per la gestione tecnica della strumentazione prescelta si rimanda agli idonei manuali degli strumenti.

I filtri bianchi, una volta passati in muffola, vanno siglati e opportunamente condizionati secondo i criteri della UNI EN:12341 per le determinazioni gravimetriche. Successivamente, con gli

accorgimenti riportati nel paragrafo precedente, i filtri vanno montati ciascuno nel proprio portafiltro e caricati nell'idoneo vano sul campionatore, dando avvio alla fase di campionamento impostando sul campionatore individuato i parametri di funzionamento (flusso, durata del singolo prelievo, durata dei campionamenti, etc.).

Al termine del campionamento i filtri possono essere prelevati dal vano di scarico del campionatore e riposti in una borsa termica per il trasferimento al laboratorio ove verranno effettuate le operazioni gravimetriche per la determinazione della concentrazione di PM_x secondo normativa. I filtri campionati saranno così trasferiti nelle piastre Petri monouso e consegnati al laboratorio per le analisi.

5.4 Trasporto e conservazione

In laboratorio le membrane campionate devono essere conservate a temperature inferiori a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ e l'analisi deve essere eseguita entro 60 giorni dell'arrivo dei campioni.

Utilizzare un doppio contenitore a tenuta ermetica munito di assorbente che garantisca, in caso di incidente, la non fuoriuscita del campione e che abbia le seguenti caratteristiche:

- Il contenitore deve essere sterilizzabile.
- Sulla parete esterna non deve rimanere alcun residuo.
- Ogni contenitore deve essere identificato con etichetta autoadesiva indelebile.
- Gli eventuali documenti di accompagnamento non devono essere arrotolati attorno al contenitore ma inseriti in un sacchetto a doppia tasca ermetica.
- Deve essere applicato il simbolo di rischio biologico sia sul contenitore che sulla **documentazione in caso di trasporto di agenti del gruppo 2,3,4.**

Si tenga presente che i ripetuti scongelamenti compromettono gravemente l'esito dei test biologici, molecolari e chimici. Evitare l'esposizione dei campioni alla luce (oltre che ad alte temperature) poiché alcuni composti risultano essere fotosensibili.

5.5 Metodi di analisi

Dopo la raccolta del campione per il rilevamento di acidi nucleici si procede per la verifica con tecniche di biologia molecolare per replicare ripetutamente (amplificare), in modo estremamente selettivo, un tratto definito di DNA o RNA: come ad esempio la reazione a catena della polimerasi, PCR (Polymerase Chain Reaction), o Real-Time PCR.

5.6 Smaltimento del materiale di campo

Si rimanda alle norme nazionali in materia.

5.7 Come evitare la contaminazione RNAsi

L'estrazione dell'RNA è un processo preciso e difficile che deve essere eseguito il più rapidamente possibile. Quando si lavora con l'RNA, è sempre necessario utilizzare una tecnica microbiologica e

asettica adeguata. Le mani e le particelle di polvere possono trasportare batteri e muffe e sono le fonti più comuni di contaminazione da RNasi. Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che generalmente non richiedono cofattori per funzionare, sono difficili da inattivare e anche quantità minime sono sufficienti per distruggere l'RNA.

È necessario prestare molta attenzione per evitare di introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante il campionamento, il trasporto e la conservazione del campione.

La contaminazione da RNasi può essere prevenuta seguendo alcune semplici ma efficaci procedure di buon senso:

- Indossare sempre i guanti durante un campionamento e/o l'esperimento e cambiarli spesso, specialmente dopo il contatto con la pelle, i capelli o altre superfici potenzialmente contaminate da RNasi come le maniglie delle porte, le tastiere e gli animali. Indossare mascherine.
- Utilizzare soluzioni prive di RNasi. Quando possibile, utilizzare articoli in plastica monouso e certificati privi di RNasi e puntali con filtro.
- Pulire accuratamente le superfici.
- Decontaminare la vetreria cuocendola a 180 ° C o più per diverse ore, oppure immergendola in DEPC allo 0,1% (v / v) appena preparato in acqua o etanolo per 1 ora, quindi drenando e sterilizzando in autoclave. La sterilizzazione in autoclave distruggerà qualsiasi DEPC non reagito che potrebbe altrimenti reagire con altre proteine e RNA.

Il processo di campionamento, anche se correttamente eseguito, presenta delle criticità aggiuntive introdotte dall'operatore che può, per mancanza di formazione o solo di attenzione, tralasciare alcune accortezze ed introdurre una contaminazione aggiuntiva dall'esterno.

Si raccomanda di eseguire tutte le operazioni, dall'installazione in campo del campionatore, passando dalle ispezioni periodiche, fino alla rimozione, trasporto, conservazione e analisi dei filtri campione (e per tutte le manovre previste dal protocollo di riferimento UNI EN 1234, 2014), utilizzando guanti monouso (in nitrile e/o vinile) al fine di evitare cross-contaminatio da parte dell'operatore (presenza di RNasi), e di mascherine che proteggono dalla possibile contaminazione dei campioni biologici.