

Obiettivo 6 Attività 6.1

Protocollo operativo a supporto del campionamento per il Caso studio Bologna OB3 –OB5

2020

Lo scopo di questo protocollo è quello di definire le procedure da eseguire per la corretta manipolazione, trasporto e conservazione dei filtri utilizzati per il campionamento di polveri atmosferiche destinati al rilevamento degli acidi nucleici ed alla caratterizzazione chimica.

Sommario

Generalità	2
1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.....	2
2 RIFERIMENTI	3
3 DEFINIZIONI	4
4 ATTREZZATURE E MATERIALI.....	5
5 MODALITA' OPERATIVE	5
5.1 Raccomandazioni generali	6
5.2 Preparazione e manipolazione dei filtri di campionamento	7
5.3 Preparazione del materiale, campionamento conservazione	7
5.4 Trasporto	8
5.5 In laboratorio	8
5.6 Smaltimento del materiale	9
5.7 Sicurezza e Formazione dell'operatore	9

Generalità

Il campionamento 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 campionata, devono essere eseguite tutte le procedure previste e richieste dalle norme di riferimento (UNI, EN, ISO), al fine di evitare contaminazioni secondarie durante le fasi di manipolazione, trasporto e conservazione sino all'inizio della fase analitica vera e propria. Inoltre, il campionamento deve essere eseguito da personale qualificato, aggiornato e formato.

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La procedura descritta in questo documento ha lo scopo di fornire integrazioni al protocollo per il campionamento dell'aria per la determinazione del materiale particolato PM10 e PM2.5 (UNI EN 12341, 2014), al fine di garantire la corretta manipolazione, trasporto e conservazione del campione raccolto su filtri in quarzo da sottoporre successivamente ad indagini di laboratorio per la ricerca di materiale genetico (incluso SARS-COV-2). Per questa campagna sono stati raccolti campioni da 55 m³/giorno di PM 2.5 e PM 10 su filtri in quarzo da 47 mm di diametro pre-trattati in muffola a 600°C per 5 h in modo da eliminare eventuali tracce di sostanze organiche presenti sui filtri. Il sito selezionato (Bologna) è un fondo urbano rappresentativo dell'esposizione media della popolazione alle sorgenti di particolato atmosferico oggetto di diversi progetti (Ricciardelli *et al.*, 2017).



Figura 1. Sito di campionamento di Bologna, via Gobetti.

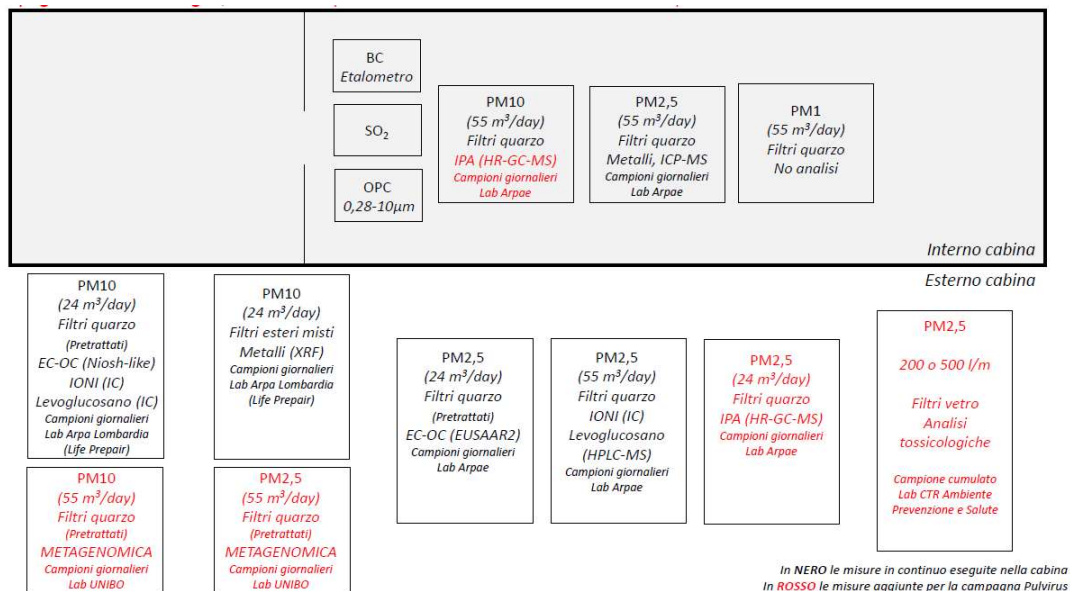


Figura 2. Schema dell'intera campagna di campionamento di novembre-dicembre 2020.

2 RIFERIMENTI

- UNI EN 12341, 2014 Aria ambiente - Metodo gravimetrico di riferimento per la determinazione della concentrazione in massa di particolato sospeso PM10 o PM2,5
- D.M. 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. (GU Serie Generale n.33 del 09-02-2017)
- D.M. 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. (GU Serie Generale n.96 del 26-04-2017)
- D.M. Maggio 2015 Decreto Ministeriale del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare del 5/5/2015. Allegato 1 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. (*GU Serie Speciale n. 28 05/06/2015*)

D.Lgs. n 81 Aprile 2018 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. (*GU. n. 101 del 30-4-2008 Supp. Ord. n. 108*).

DPR n 254 Luglio 2003 Decreto del Presidente della Repubblica 15 luglio 2003, n.254. Regolamento recante disciplina della gestione dei rifiuti sanitari a norma dell'art. 24 della legge 31 luglio 2002, n. 179, (*GU n. 211 del 11-9-2003*)

Approfondimenti

Ricciardelli, D. Bacco, M. Rinaldi, G. Bonafè, F. Scotto, A. Trentini, G. Bertacci, P. Ugolini, C. Zigola, F. Rovere, C. Maccone, C. Pironi, V. Poluzzi, A three-year investigation of daily PM2.5 main chemical components in four sites: the routine measurement program of the Supersito Project (Po Valley, Italy). *Atmospheric Environment*, 152 (2017) 418-430.

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 e che 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 (RNasi)	Famiglia di nucleasi che catalizzano l'idrolisi dell'acido ribonucleico.
Soluzione idroalcolica	È una soluzione di acqua con una concentrazione alcolica.

4 ATTREZZATURE E MATERIALI

- Guanti; nitrile e/o lattice e/o vinile.
- Pennarello indelebile.
- Matita.
- Sistema di localizzazione geografica.
- Piastra eutettiche refrigeranti.
- Borsa termica
- Pinzette.
- Piastre Petri monouso.
- Parafilm.
- Detergente a base alcolica (almeno al 70%) per sterilizzare le pinzette.
- Detergente per decontaminazione RNasi.

5 MODALITA' OPERATIVE

Quando si lavora con agenti biologici è sempre necessario utilizzare le tecniche di asetticità adeguate, al fine di evitare contaminazioni secondarie del campione (*cross-contamination*) nonché esporre gli operatori ad eventuali contaminazioni. Le misure di prevenzione sono l'insieme di disposizioni che diminuiscono il rischio di subire un danno agendo sia sulla magnitudo dell'effetto prodotto dall'incidente e sia sulla probabilità di un suo accadimento. Le misure sono rappresentate da barriere biologiche, fisiche e chimiche nonché da procedure di corretto comportamento.

5.1 Raccomandazioni generali

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 così una contaminazione secondaria involontaria. Guanti e mascherine proteggono il campione dalla possibile contaminazione con materiali biologici.

- *Si raccomanda di indossare guanti monouso e mascherine durante l'esecuzione di tutte le operazioni in campo richieste per l'installazione del campionatore, durante le ispezioni periodiche del filtro e in tutte le manovre previste dal protocollo di riferimento (UNI EN 12341, 2014).*
- Il recupero del filtro esposto deve essere eseguito utilizzando delle pinzette opportunamente disinfettate con soluzione idroalcolica almeno al 70%, avendo cura di ripetere la procedura di disinfezione tra un campione e l'altro se si dispone di un solo strumento.
- Il filtro deve essere conservato in piastre Petri precedentemente etichettata e sigillate con la pellicola (Parafilm), per evitare che durante il trasporto i filtri possano fuoriuscire. La conservazione in piastre opportunamente chiuse preserva il campione sia dalla perdita di potenziale materiale genetico ivi raccolto nonché da potenziali contaminazioni secondarie dovute a RNasi libere.

Le Ribonucleasi (RNasi) costituiscono una superfamiglia di enzimi, idrolasi, che si trovano in tutti i tipi di cellule e organismi, dai procarioti agli eucarioti. Sono nucleasi che catalizzano l'idrolisi dell'acido ribonucleico caratterizzate, generalmente, da un'attività specifica molto elevata, il che significa che anche se presenti in piccolissime quantità in un campione di RNA sono sufficienti per distruggerlo. L'RNA è più suscettibile alla degradazione rispetto al DNA, a causa della capacità dei gruppi ossidrilici 2' di agire come nucleofili. La contaminazione da RNasi è ubiquitaria. Inoltre, le RNasi sono resistenti agli agenti chelanti dei metalli e alcune, 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 e possono essere inattivati dall'agente alchilante specifico dell'istidina, dietilpirocarbonato (DEPC).

Le principali fonti di contaminazione da RNasi in un tipico laboratorio includono:

- Soluzioni acquose, reagenti utilizzati negli esperimenti

- Esposizione ambientale (aria, superfici, polveri)
- Contatto pelle e fluidi biologici

È necessario prestare molta attenzione per evitare di introdurre inavvertitamente RNasi nel campione durante le varie fasi del campionamento, trasporto, conservazione ed analisi.

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

- Utilizzare contenitori commerciali RNasi-free o decontaminati con prodotti adeguati.

Usare detergenti specifici per la decontaminazione di eventuali superfici di contatto.

- Indossare sempre guanti monouso durante la manipolazione dei campioni e cambiarli frequentemente.
- Una volta che sono stati decontaminati, tenere chiusi i contenitori dove riporre il campione.

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.

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

5.3 Preparazione del materiale, campionamento conservazione

- Indossare sempre i guanti e la mascherina durante la preparazione e manipolazione del materiale da usare per il campionamento.
- Cambiare i guanti ogni qualvolta si è venuti in contatto con superfici potenzialmente contaminate da RNasi
- Decontaminare da RNasi le superfici prima di iniziare a preparare il materiale, con soluzioni apposite.
- Utilizzare contenitori in plastica monouso privi di RNasi.
- Qualora si utilizzi vetreria, decontaminarla con calore secco (stufa 180°C) per almeno 12 h o immergerla nel DEPC allo 0,1% (v/v) in acqua o etanolo per 1h, e poi sterilizzare in autoclave. La sterilizzazione in autoclave distruggerà qualsiasi residuo di DEPC che potrebbe altrimenti reagire con altre proteine e RNA.

5.4 Trasporto

In riferimento alle modalità di trasporto si riporta quanto segue.

- Il trasporto dei filtri campionati al laboratorio d'analisi deve avvenire, per ogni serie.
- Il campione deve essere trasportato alla temperatura di +4°C e al buio.
- Il contenitore deve essere sterilizzabile e durante il trasporto le pareti devono essere pulite.
- Ogni contenitore deve essere etichettato e munito di un codice identificativo.
- Eventuali schede di campo non devono essere arrotolate attorno al contenitore ma inseriti in un sacchetto a parte.
- I ripetuti scongelamenti compromettono gravemente l'esito dei test biologici e molecolari.
- In laboratorio i filtri campionati devono essere conservati a -20°C; fino al momento dell'analisi.

5.5 In laboratorio

Il campione deve essere tempestivamente consegnato ai laboratori addetti all'esecuzione delle prove. Se si deve eseguire sul medesimo filtro sia la caratterizzazione chimica del particolato che la determinazione degli acidi nucleici è necessario procedere come segue.

- In laboratorio i filtri campionati devono essere conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. I ripetuti scongelamenti compromettono gravemente l'esito dei test biologici e molecolari.
- Assicurarsi che la bilancia dove si effettua la pesata sia stata precedentemente decontaminata prima di aprire la piastra contenete il campione.
- Per effettuare il taglio del filtro, usare bisturi monouso o disinfettati tra un campione e l'altro.
- Prelevare con le pinzette disinfettate le parti del campione destinate alla specifica analisi, avendo cura di riporle in contenitori puliti.
- Assicurarsi che il contenitore sia stato opportunamente chiuso al fine di evitare contaminazione ed inviare il campione al laboratorio di destinazione.

5.6 Smaltimento del materiale

Si deve fare riferimento a quanto riportato nel DPR 254/03 per lo smaltimento di rifiuti ed oggetti utilizzati in campo.

5.7 Sicurezza e Formazione dell'operatore

Tutte queste procedure devono essere eseguite da personale qualificato e che indossa i dispositivi di protezione individuale. Il personale dedicato dovrà essere opportunamente formato al fine di non compromettere le attività delle successive procedure di analisi.