



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali

Manuale di Procedure e Biosicurezza



*Ospedale Veterinario
Universitario*



*Centro Zootecnico
Didattico Sperimentale*

Laboratorio di Riproduzione



versione web
del capitolo

Il Laboratorio di Riproduzione è strutturato e organizzato per l'attività di seminologia e la produzione in vitro di embrioni. La planimetria dei locali è rappresentata in figura 1H. La suddivisione dei locali secondo il sistema a colori descritto nella parte generale del presente manuale viene riportato in Tabella 1H e rappresentato nelle planimetrie.

Seminologia

Questo laboratorio è dotato di una sala monta per ricevere stalloni già addestrati per la donazione del seme, grazie alla presenza di un manichino, o per addestrare stalloni ai fini della donazione del seme. Questa sala, di ampie dimensioni, è dotata di pavimento antisdruciolevole facilmente lavabile, è priva di sporgenze e con una grande porta come via di fuga. Questo locale, anche senza l'ausilio del manichino, può essere usato per ricevere animali di altre specie (ad esempio cani) per effettuare il prelievo di seme.

Ai fini della seminologia, il Laboratorio di Riproduzione è organizzato nei locali che sono di seguito descritti:

- *Sala monta* (Locale T035), dotata di cavallina per raccogliere seme da stalloni equini o per raccogliere seme da altre specie animali senza l'ausilio di manichino.
- *Pre-laboratorio* (Locale T023), al quale si accede tramite finestrella dalla sala monta, per poter accogliere il campione seminale raccolto e portarlo all'adiacente laboratorio 1 in condizioni di massima igiene.
- *Laboratorio 1* (Locale T022), in cui è presente un bancone per effettuare le colorazioni necessarie al campione di seme (colorazione vitale, colorazione morfologica, valutazione del pH) e un microscopio collegato a un sistema computerizzato (CASA) per la valutazione della concentrazione e della motilità del seme. In questo laboratorio sono presenti: una centrifuga per centrifugare processare i campioni raccolti da destinare a eventuali diluizioni con mestrui appropriati ai fini della refrigerazione o del congelamento, una bilancia analitica, un pHmetro e un osmometro per la preparazione dei terreni di diluizione e refrigerazione/crioconservazione, una stufa per conservare a temperatura

di 37,5 °C tutte le strumentazioni che saranno a contatto con il seme, un frigorifero e un congelatore per poter conservare i mestrui diluiti e per poter iniziare ad abbassare gradualmente la temperatura del seme diluito ai fini del congelamento. In questo laboratorio è possibile preparare le paillettes di seme che subiranno, successivamente, il congelamento a -196 °C. È presente anche una cappa a flusso laminare per preparare tutti i terreni/soluzioni in condizioni di sterilità.

– *Locale adiacente alla sala monta* (Locale T019), in cui è presente l'apparecchio di congelamento del seme. Quest'apparecchio è gestito da un sistema computerizzato.

Il passaggio del campione di seme dal locale monta al pre-laboratorio (Locale T023) può avvenire dall'operatore che ha effettuato la raccolta del seme all'operatore che lo analizzerà con il sistema CASA attraverso la finestra che mette in comunicazione i due locali. In questo modo si salvaguarda l'igiene del campione e del laboratorio 1. L'operatore che ha effettuato il prelievo del seme potrà accedere al laboratorio 1 solo passando nello spogliatoio e indossando un camice pulito e calzari ai fini della salvaguardia delle buone pratiche di laboratorio che consentono il mantenimento della pulizia degli ambienti e delle strumentazioni necessarie per le attività di questo laboratorio.

Produzione in vitro di embrioni

Ai fini della produzione di embrioni, il Laboratorio di Riproduzione è organizzato nei locali che sono di seguito descritti:

- *Locale prelievi e pulizia attrezzature* (Locale T031). Questo locale è considerato una zona sporca per l'arrivo di materiale biologico raccolto al macello (ovaie, testicoli, seme) ed è ben separato dai laboratori sterili. Le ovaie, che arrivano dal macello a 30 °C in borse termiche, subiscono un lavaggio in soluzione fisiologica sterile e sono mantenute in un bagnomaria a circa 30 °C per tutto il tempo di lavorazione che consiste nell'isolare sterilmente gli ovociti dai follicoli grazie ad aspirazione con siringhe da 10 mL e aghi da 18 gauge. Il liquido follicolare raccolto è riversato in provette mantenute a 37 °C grazie ad un altro bagnomaria. Al

termine dell'aspirazione del liquido follicolare, le provette sono trasportate nel laboratorio 2 (Locale T021).

- *Spogliatoio* (locale T028). Il trasferimento dei campioni dal locale prelievi al laboratorio sterile 2 avviene attraversando i locali T030 e T024 che portano al locale spogliatoio nel quale gli operatori, che hanno precedentemente lavorato nel locale prelievi, si cambiano il camice e indossano calzari per entrare nel laboratorio T23 e, successivamente, nel laboratorio sterile 2 (T021).

- *Pre-laboratorio* (T023). In questo locale sono presenti un distillatore per la produzione di acqua distillata e acqua sterile, un reagentario contenenti reagenti in polvere o liquidi da mantenere a temperatura ambiente, e un frigorifero per mantenere reagenti a temperatura di +4 °C. Questi reagenti sono necessari per la preparazione di tutte le soluzioni e i terreni necessari per la produzione in vitro degli embrioni. Questa preparazione avviene nel laboratorio 1 (locale T022).

- *Laboratorio 1* (Locale T022) in cui sono presenti tutte le strumentazioni precedentemente elencate per la seminologia: bilancia di precisione, pHmetro, osmometro, pipette, cappa a flusso laminare e centrifughe per la preparazione di tutti i terreni necessari per la maturazione degli ovociti, la fecondazione e la coltura embrionale. In questo locale è lavorato il seme fresco o criconservato necessario per la fecondazione degli ovociti. Il seme è valutato con il sistema CASA per la motilità e vitalità, centrifugato e diluito per la concentrazione necessaria per la fecondazione in vitro.

- *Laboratorio 2* (Locale T021). In questo locale sono presenti stereomicroscopi collocati sotto cappa a flusso laminare per poter isolare sterilmente gli ovociti dal liquido follicolare. Sono anche presenti due incubatori: uno a

38,5 °C con 5% di CO₂ specificatamente impiegato per la maturazione degli ovociti e la fecondazione in vitro, e uno a 38,5 °C con 5% di CO₂ e 5% di O₂ per la coltura embrionale. Grazie agli stereomicroscopi, dotati di tavolinetti riscaldanti, gli ovociti sono selezionati per la loro qualità e messi in terreni di maturazione al termine della quale possono essere fecondati per co-coltura, grazie al seme preparato nel laboratorio 1, o essere fecondati per iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI), grazie al micromanipolatore, collocato nel laboratorio 2. Dopo il periodo di fecondazione, grazie agli stereomicroscopi, i presunti zigoti sono traferiti nell'incubatore specifico con il 5% di O₂ per la coltura embrionale che varia dai 5 agli 8 giorni, a seconda della finalità per la quale si è effettuata la produzione embrionale (didattica, clinica o ricerca).

Al termine della coltura embrionale, gli embrioni sono etichettati e conservati in azoto liquido o a -80 °C, in base a quello che sarà il loro destino.

Documentazione per le attività del laboratorio

Per la seminologia e la produzione in vitro degli embrioni, nel Laboratorio di Riproduzione è mantenuta una specifica documentazione che identifica tutte le informazioni necessarie a risalire all'esecuzione di tutte le attività svolte, dal materiale biologico iniziale al prodotto finale.

La documentazione presente è la seguente:

- 1) schede di tracciabilità del materiale biologico in arrivo (ovaie, seme, apparati genitali);
 - 2) registro che documenta le modalità di esecuzione di tutte le attività del processo, dal processamento, alla gestione delle apparecchiature, alla tracciabilità di tutte le soluzioni e di tutti i prodotti ottenuti in laboratorio fino allo smaltimento dei rifiuti, compreso il nome del personale che ha operato in tutte le fasi;
 - 3) manuali di sicurezza e manuali degli strumenti.

Gli oociti, gli spermatozoi, gli zigoti e gli embrioni sono tracciati dal loro prelievo/produzione fino alla determinazione del loro destino (uso clinico, crioconservazione o scarto). L'accettazione dei campioni è fatta secondo una procedura definita dal laboratorio: in una scheda (per ogni tipo di processamento) sono indicati tutti i passaggi e le lavorazioni che i gameti/embrioni e le cellule subiscono. In particolare, è registrata l'evoluzione di ogni oocita, zigote ed embrione, ed è annotato dove e come i campioni sono conservati e stoccati, il destino (utilizzato, mantenuto, trasferito, conservato, scartato), l'identità dell'operatore che ha eseguito ogni passaggio e, per la produzione embrionale, anche gli orari di maturazione degli ovociti, di fecondazione e di coltura embrionale.

Tutti i contenitori (provetta/piastra/paillette o altro) degli ovociti e/o degli spermatozoi, degli zigoti, degli embrioni ai diversi stadi di sviluppo, sono identificati e registrati per il loro destino.

Le apparecchiature sono periodicamente sottoposte a operazioni di manutenzione e calibrazione.

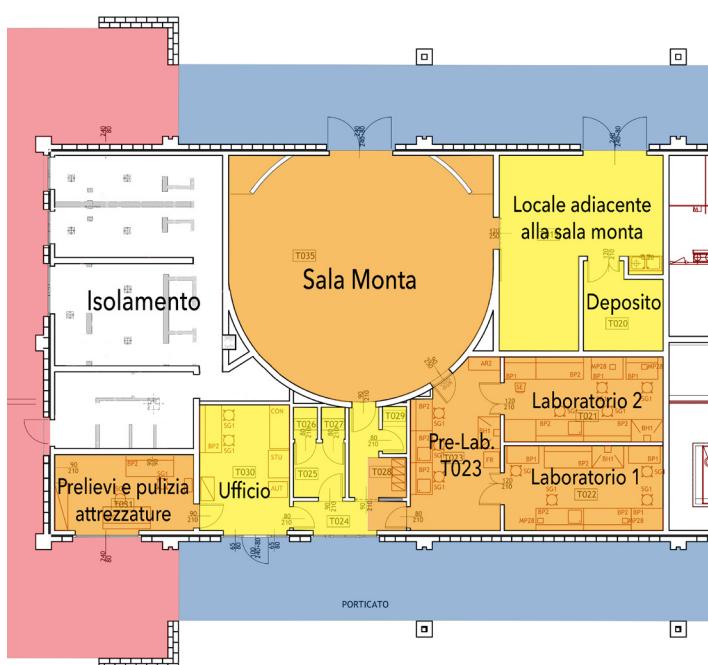


Figura 1H. Planimetria del Laboratorio di Riproduzione.

Utilizzo della sala monta

La sala monta è un ambiente altamente specializzato in cui vengono gestite le attività di monta naturale o di raccolta del seme in modo controllato. In tale contesto, la protezione della salute degli animali e degli operatori, nonché il rispetto di rigorosi protocolli igienico-sanitari, costituiscono requisiti essenziali. La biosicurezza non è solo una misura tecnica, ma un impegno condiviso da tutto il personale coinvolto nella gestione e nella manutenzione della struttura.

La sala monta è progettata in modo da garantire:

- spazi adeguati al movimento sicuro di cavalli stalloni e fattrici, con pavimentazione antiscivolo e facilmente lavabile;
- buona illuminazione, naturale e artificiale, per agevolare il lavoro degli operatori e l'osservazione degli animali;
- sistema di drenaggio efficace, per garantire la rapida rimozione dei liquidi e facilitare la pulizia;
- punti di lavaggio e disinfezione.

Accesso e movimentazione degli animali

Ogni cavallo che accede alla sala monta deve essere identificato in modo univoco mediante microchip e/o passaporto, deve essere in possesso di certificato sanitario aggiornato, che attesti l'assenza di malattie trasmissibili (es. arterite virale equina, metrite contagiosa equina, anemia infettiva) e deve essere sottoposto a controllo clinico all'arrivo per evidenziare eventuali segni clinici sospetti (febbre, scolo genitale, alterazioni del comportamento).

Preparazione dell'animale alla monta o alla raccolta

Gli operatori devono indossare indumenti protettivi puliti, comprensivi di guanti, camice impermeabile, calzature antinfortunistiche e caschetto di protezione. È obbligatorio il lavaggio e la disinfezione delle mani prima e dopo ogni procedura. Gli operatori devono cambiare i guanti dopo ogni procedura. Non è ammesso l'uso di dispositivi elettronici personali durante le fasi operative.

Gli organi genitali esterni dello stallone devono essere accuratamente lavati con soluzione fisiologica prima di ogni raccolta o monta. Le fattrici devono essere sottoposte a lavaggio della vulva e della regione perineale, e a fasciaggio della coda. Durante la monta naturale o il prelievo con l'utilizzo della fattrice, è necessario che questa sia imbastata onde evitare traumatismi allo stallone.

In caso di raccolta seminale su manichino, l'area di raccolta va predisposta con materiali monouso o disinfezati. Ogni strumento (guaine rigide, elastiche, coni collettori e recipienti) deve essere adeguatamente pulito e disinfezato o associato a materiale monouso. Tutto il materiale monouso contaminato (guanti, garze, guaine) va smaltito in contenitori per rifiuti sanitari a rischio infettivo.

Sicurezza del personale

La sicurezza del personale è prioritaria e richiede una formazione specifica per tutti gli addetti alla manipolazione degli stalloni. Durante la monta naturale o il prelievo di seme, occorre la presenza di almeno tre operatori durante ogni procedura: uno

Tabella 1H. Sistema a colori dei locali ospedalieri, applicato al Laboratorio di Riproduzione. In questo reparto non sono previste la zona blu e la zona rossa.

CODICE COLORE	Locali del Laboratorio di Riproduzione ABBIGLIAMENTO E DPI PRESCRITTI	RISCHIO	TIPOLOGIA DI ACCESSO
ZONA BLU	Nessuno.	BASSO	Accesso libero
ZONA GIALLA	Ufficio, spogliatoio, locale adiacente alla sala monta, deposito. Vestiti propri o Dress code	BASSO	Accesso condizionato a: Medici veterinari e personale docente Personale tecnico e amministrativo Studenti
ZONA ARANCIONE	Sala monta. Dress code + calzature antinfortunistiche, caschetto, camice impermeabile e guanti monouso Locale prelievi e pulizia attrezature, Pre-laboratorio, Laboratorio 1, Laboratorio 2. Dress code + copriscarpe o calzature dedicate, camice dedicato, guanti monouso, guanti protezione freddo quando si congelano embrioni e seme	MEDIO	Accesso limitato a: Medici veterinari e personale docente Personale tecnico Studenti
ZONA ROSSA	Nessuno.	ALTO	Accesso vietato

alla conduzione dello stallone, uno alla gestione del prelievo e uno alla supervisione della fattrice, se presente. È obbligatorio l'utilizzo di guanti antistrappo, corde di contenimento con sgancio rapido e casco protettivo. Durante le operazioni di monta occorre evitare comportamenti imprevedibili, urla o movimenti bruschi che possano innervosire gli animali. In caso di pericolo, è previsto un protocollo di emergenza con accesso rapido a vie di fuga sicure e chiamata del personale di primo soccorso.

Pulizia e disinfezione della sala monte

La sala monta e il manichino devono essere puliti dopo l'utilizzo, con rimozione manuale di letame, paglia, fluidi biologici e disinfeccata sempre dopo l'utilizzo con animali differenti. Tutti

gli strumenti devono essere lavati con acqua calda, detergenti e disinfettanti idonei all'uso.

Registro delle attività

Per ogni attività effettuata in sala monta deve essere mantenuto un registro contenente:

- identificazione del cavallo (stallone e fattrice);
- tipo di procedura effettuata (es. monta naturale, raccolta di seme, valutazione andrologica);
- operatori coinvolti;
- eventuali anomalie riscontrate;
- trattamenti sanitari pre- e post- attività.