



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali

Manuale di Procedure e Biosicurezza



*Ospedale Veterinario
Universitario*



*Centro Zootecnico
Didattico Sperimentale*

Patologia e Diagnostica di Laboratorio



versione web
del capitolo

Il Reparto di Patologia e Diagnostica di Laboratorio comprende una vasta tipologia di servizi diagnostici, tra cui la patologia clinica (ematologia ed ematochimica), la microbiologia (virologia, batteriologia e micologia), la parassitologia (endo- ed ectoparassiti), la diagnostica molecolare e la citofluorimetria.

Il reparto opera principalmente a favore degli utenti interni all'OVU, che richiedono esami per gli animali ricoverati o in visita. Tuttavia, possono essere effettuate analisi anche per conto di medici veterinari liberi professionisti esterni. Inoltre, i servizi sono disponibili per i Dipartimenti dell'Università degli Studi di Milano e per altre istituzioni che necessitano di indagini diagnostiche.

Le presenti procedure prevedono l'indicazione delle modalità corrette per l'accesso del personale autorizzato ai laboratori, per la ricezione dei campioni, nonché per l'allestimento e il campionamento del materiale biologico destinato all'analisi e la relativa refertazione.

L'obiettivo finale del presente documento è quello di definire il corretto flusso nella gestione dei campioni, per evitare la contaminazione ambientale, con conseguente rischio per la salute del personale, e la cross-contaminazione dei campioni, che può influire sull'esito delle analisi.

Personale e modalità di accesso ai laboratori

Il personale con accesso ai laboratori è costituito dal personale strutturato, assegnisti, borsisti, dottorandi, specializzandi, tirocinanti, studenti, personale tecnico e chiunque sia autorizzato ad accedere a tali laboratori dal Responsabile del Reparto. Per ragioni di biosicurezza, l'accesso di personale non afferente ai laboratori deve essere limitato al minimo. Eventuali visitatori occasionali possono accedere ai laboratori solo se accompagnati dal personale del servizio, il quale si prende cura di evitare l'accesso ad aree in cui avviene la manipolazione di materiale biologico.

Possono accedere ai laboratori, per un tempo limitato ed esclusivamente in relazione alle attività da svolgere, i tecnici addetti alla manutenzione ordinaria o straordinaria della strumentazione e i manutentori, previa adeguata identificazione.

Non è consentito l'accesso ai laboratori di clienti esterni per il conferimento dei campioni. In caso di campioni provenienti dall'esterno, chi conferisce il campione (es. veterinari, allevatori) deve presentarsi alla cassa dell'OVU per l'accettazione amministrativa. Il personale di cassa informa il personale dei laboratori, affinché provveda a recuperare i campioni presso la cassa, seguendo le raccomandazioni di seguito riportate.

Indumenti e dispositivi di protezione individuale

Al momento dell'ingresso nei laboratori e durante le attività, gli operatori devono lasciare gli oggetti personali negli armadietti a disposizione, situati negli uffici di appoggio e locali spogliatoio presenti in prossimità dei laboratori stessi (locali 66 e 76).

Il personale incaricato della consegna dei campioni, oppure i docenti e gli studenti che devono svolgere attività didattica all'interno del laboratorio (es. tirocini, tesi, attività esercitativa), devono indossare gli appositi DPI, come specificato di seguito. La specifica vestizione può non essere richiesta al personale che frequenta il laboratorio per la semplice visione di risultati su terminale o di vetrini al microscopio, il cui accesso deve comunque essere limitato al minimo.

I *camici* impiegati in ciascun laboratorio non devono mai essere indossati al di fuori di questi ultimi. I camici sporchi devono essere riposti nei contenitori di plastica disponibili in ogni laboratorio. I contenitori verranno poi portati nel locale dove vengono raccolti gli indumenti da portare in lavanderia.

I *guanti*, che sono sempre monouso, devono essere indossati immediatamente prima di eseguire manipolazioni potenzialmente rischiose. I guanti devono essere rimossi subito dopo aver completato l'operazione. Dopo la manipolazione dei campioni, è fondamentale evitare di toccare superfici o oggetti che potrebbero essere utilizzati da altre persone senza guanti, come a esempio interruttori della luce, microscopi dedicati all'ematologia o alla citologia, penne o pennarelli (eccetto quelli utilizzati esclusivamente per la ricezione e la processazione dei campioni), maniglie delle porte o telefoni.

Maschere e occhiali protettivi devono essere indossati quando è ipotizzabile un contatto delle mucose con sangue e altri liquidi biologici.

Planimetria e locali

Il Reparto di Patologia e diagnostica di laboratorio è costituito da 9 locali contigui presenti al primo piano dell'Edificio n. 51020 (ex Edificio 2). In particolare, soprattutto ai fini della diagnostica molecolare (estrazione acidi nucleici), i laboratori dedicati prevedono una ben definita separazione dei locali, con un *workflow* a senso unico che consenta di lavorare in assenza di contaminazioni. Il *workflow* tiene conto del fatto che l'amplificazione di frammenti di DNA avviene in maniera esponenziale, ponendo rischi di contaminazione che possono inficiare la refertazione.

La separazione dei percorsi e degli ambienti mira a ridurre al minimo il rischio di due tipi di contaminazione: *cross-contaminazione*, con rischio relativo ad analisi ripetute dello stesso tipo di campione/target; *contaminazione da riporto (carryover)*, cioè contaminazione da prodotti di DNA amplificato dovuta alla aerosolizzazione degli ampliconi già ottenuti. In Figura 1G viene rappresentato il corretto *workflow* riferito agli ambienti di diagnostica relativa alle analisi molecolari.

Descrizione dei locali

Il reparto si articola nei locali di seguito descritti, disposti uno dopo l'altro a partire dall'ingresso del reparto e ivi numerati da 1 a 9 (planimetria riportata in Figura 2G). La suddivisione dei locali secondo il sistema a colori descritto nella parte generale del presente manuale viene riportato in Tabella 1G e rappresentato nelle planimetrie.

1. Locale lavaggio (stanza 53)

Questo locale è adibito alla pulizia della vetreria sporca e alla ricezione dei campioni negli orari di chiusura del laboratorio qualora specificatamente richiesto (vedere di seguito la parte inerente alla consegna dei campioni).

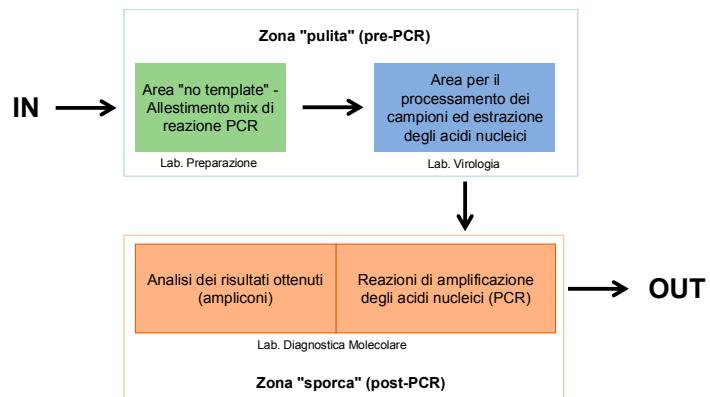


Figura 1G. Corretto workflow dei campioni per l'esecuzione di analisi molecolari.

2. Preparazione (stanza 52)

Questo laboratorio viene utilizzato prevalentemente per la preparazione e sterilizzazione dei terreni di coltura per la batteriologia, per la sterilizzazione di materiale in plastica per i laboratori e per l'allestimento dei reagenti, per l'amplificazione degli acidi nucleici, che rappresenta la prima fase dell'iter diagnostico di PCR e più in particolare si tratta della fase definita "pulita". Per questa fase viene utilizzata la cappa da PCR, che deve essere utilizzata da personale opportunamente formato e istruito per evitare la contaminazione dei reagenti. Il rischio di contaminazione dell'operatore è molto ridotto in quanto non si maneggiano reagenti potenzialmente pericolosi. In questo laboratorio, collocato sotto la cappa chimica, è anche presente il kit per effettuare le colorazioni batteriche. Il camice utilizzato presso questo laboratorio non può essere portato in altri laboratori, né all'esterno del laboratorio stesso.

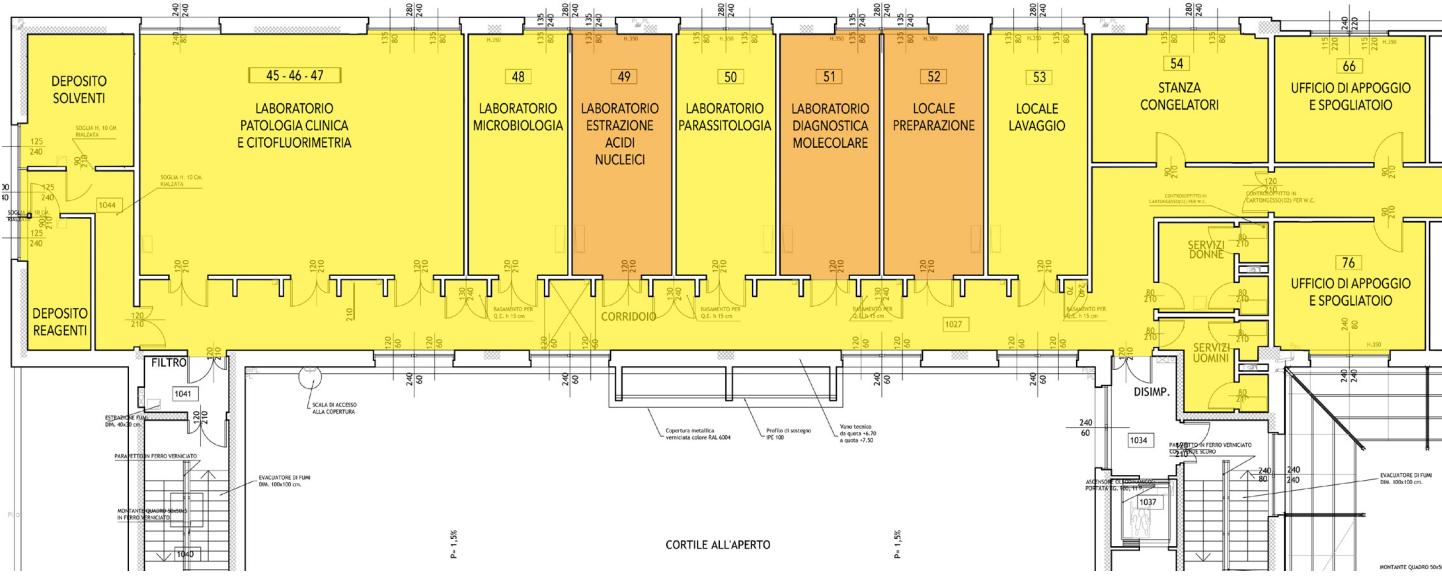


Figura 1G. Planimetrie del Reparto di Patologia e Diagnostica di Laboratorio.

3. Diagnostica molecolare (stanza 51)

In questo laboratorio viene effettuata l'amplificazione degli acidi nucleici presenti nel campione, mediante l'utilizzo dei termociclatori, e vengono eseguite le fasi potenzialmente contaminanti delle analisi di PCR. In questo laboratorio, tutte le procedure devono essere eseguite solamente dopo aver indossato i guanti monouso. Il personale che lavora in questo laboratorio deve evitare che avvenga la contaminazione degli altri laboratori tramite aerosol derivante dagli acidi nucleici amplificati. È altresì importante evitare l'esposizione dell'operatore ad agenti potenzialmente pericolosi come il bromuro di etidio e i raggi UV del transilluminatore (vedasi istruzioni specifiche riportate in seguito nel presente documento). Come indicato nella Parte Generale del presente manuale, il personale che accede a tale laboratorio deve indossare i DPI dedicati esclusivamente al presente laboratorio (camice, guanti monouso, eventuali occhiali per la protezione dai raggi UV) e che devono essere tassativamente rimossi in uscita da esso.

4. Parassitologia (stanza 50)

In questo laboratorio avvengono la preparazione, la processazione e l'analisi di campioni biologici (feci, sangue e tessuti) per le indagini parassitologiche. L'operatore, quando maneggia i campioni, deve effettuare tutte le procedure dopo aver indossato idonei DPI (camice, guanti monouso), soprattutto atti alla protezione nei confronti di patogeni potenzialmente zoonosici.

Le procedure che prevedono l'utilizzo di reagenti chimici potenzialmente tossici vengono eseguite sotto cappa chimica. Il camice utilizzato presso questo laboratorio non può essere portato in altri laboratori, né all'esterno del laboratorio stesso.

5. Estrazione acidi nucleici (stanza 49)

In questo laboratorio viene eseguita l'estrazione degli acidi nucleici dai campioni biologici. I principali rischi per l'operatore sono di natura biologica, poiché si trattano campioni che potrebbero essere contaminati da patogeni, sebbene raramente con potenziale zoonosico. Inoltre, l'utilizzo di reagenti contenenti sostanze irritanti comporta ulteriori rischi chimici. Per minimizzare i rischi di contaminazione del campione e biologici, l'operatore, quando maneggia i campioni, deve lavorare sempre sotto cappa di sicurezza microbiologica (classe II) e indossare i DPI necessari (camice, guanti monouso). Il camice utilizzato presso questo laboratorio non può essere portato in altri laboratori né all'esterno del laboratorio stesso.

6. Microbiologia (stanza 48)

Questo laboratorio è adibito allo svolgimento di indagini batteriologiche eseguite a partire da campioni biologici provenienti dai servizi dell'OVU e da richieste esterne. In questo laboratorio si procede alla semina dei campioni biologici e all'isolamento dei microrganismi eventualmente presenti. L'identificazione di questi ultimi viene effettuata presso il MILab

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

CODICE COLORE	Locali del Reparto di Patologia e Diagnostica di Laboratorio ABBIGLIAMENTO E DPI PRESCRITTI	RISCHIO	TIPOLOGIA DI ACCESSO
ZONA BLU	Nessuno.	BASSO	Accesso libero
ZONA GIALLA	Uffici di appoggio e spogliatoio (locali 66 e 76), stanza congelatori (stanza 54), locale lavaggio (stanza 53), parassitologia (stanza 50), microbiologia (stanza 48), patologia clinica e citofluorimetria (stanze 45,46 e 47), magazzino. Vestiti propri o Dress code Camice e guanti monouso nel momento in cui si maneggiano i campioni da analizzare	BASSO	Accesso condizionato a: Medici veterinari e personale docente Personale tecnico e amministrativo Studenti
ZONA ARANCIONE	Estrazione acidi nucleici (stanza 49), diagnostica molecolare (stanza 51), locale preparazione (stanza 52). Dress code + camice dedicato, guanti monouso, eventuali occhiali per la protezione dai raggi UV	MEDIO	Accesso limitato a: Medici veterinari e personale docente Personale tecnico Studenti
ZONA ROSSA	Nessuno.	ALTO	Accesso vietato

(Laboratorio di Malattie Infettive degli Animali) del DIVAS mediante l'utilizzo del MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Le piastre con i microrganismi da sottoporre a identificazione vengono collocate in appositi sacchetti di plastica, successivamente inseriti in contenitori dedicati dotati di coperchio, e così trasportate presso i laboratori MILab. Al termine delle analisi di identificazione le piastre vengono riportate con la stessa procedura nel laboratorio di Microbiologia per eventuali ulteriori indagini (ad es: antibiogramma).

Per minimizzare i rischi di contaminazione, l'operatore, quando maneggia i campioni, deve lavorare sotto cappa di sicurezza microbiologica e indossare i DPI necessari (camice, guanti monouso). Il camice utilizzato presso questo laboratorio non può essere portato in altri laboratori né all'esterno del laboratorio stesso.

7. Patologia clinica e citofluorimetria (stanza unica 45-46-47)

Questo laboratorio è dedicato alla ricezione e alla pre-processorazione di campioni ematologici, alla preparazione di reagenti per gli strumenti di ematologia e biochimica, alla processazione di campioni di sangue per le prove ematologiche (conte cellulari, citometria e colorazione vetrini) e all'attività di biochimica clinica, inclusi l'elettroforesi sieroproteica e l'analisi di urine, liquido sinoviale, liquido cefalorachidiano e versamenti cavitari. L'operatore, quando maneggia i campioni, deve indossare i DPI necessari (camice, guanti monouso). Una cappa di sicurezza chimica è presente nel locale. Il camice utilizzato presso questo laboratorio non può essere portato in altri laboratori né all'esterno del laboratorio stesso.

8. Stanza congelatori (stanza 54)

Nel punto di passaggio tra il corridoio dei laboratori e quello degli uffici è presente una stanza che contiene i congelatori e i freezer a -80°C.

9. Magazzino

Locale destinato a uso magazzino che contiene diverso materiale di scorta in armadiature dedicate.

Trasporto e conferimento dei campioni

Il conferimento dei campioni è specifico per ciascuna attività del reparto. I campioni devono essere direttamente consegnati al laboratorio di interesse dal personale medico che effettua la richiesta di analisi o da suoi delegati (personale tecnico, studenti, collaboratori), previa richiesta di analisi informatizzata, eseguita utilizzando il software in uso presso l'OVU, con le modalità sotto riportate.

Ulteriori dettagli sulle modalità e sulle tempistiche di consegna dei campioni e sull'accesso ai laboratori sono contenuti in apposite [SOP di Reparto](#) (vesasi qr-code a fine capitolo).

Tutti i campioni diagnostici e i materiali biologici devono essere trattati come potenzialmente infetti e riposti in buste apposite, dotate di un sistema che impedisca perdite durante

il trasporto. I campioni in consegna devono essere chiaramente etichettati, riportando il codice identificativo del soggetto. È fondamentale verificare che non siano presenti tracce di contaminazione esterna sul contenitore o sulla busta utilizzata per il trasporto del campione.

È severamente vietato riporre i campioni in luoghi non appropriati (es. appoggiati sulle maniglie delle porte o depositati in prossimità del laboratorio di interesse). In caso di assenza del personale afferente ai laboratori o di inaccessibilità dei laboratori stessi (es. porte chiuse a chiave, lavori di manutenzione in corso che impediscono l'accesso ai locali), seguire le indicazioni per la consegna dei campioni sotto riportate nella descrizione dei singoli servizi di laboratorio.

Si ricorda che i campioni per i quali non è presente la richiesta sul software non verranno processati fino a che la richiesta non verrà inserita nel gestionale.

I campioni conferiti da strutture esterne all'OVU e al Dipartimento, arrivati per posta o corriere, vengono consegnati presso l'accettazione, ritirati dal personale di cassa solo se integri, e trasferiti in laboratorio direttamente dal personale del laboratorio stesso, che provvederà all'apertura del pacco sotto cappa in modo da minimizzare l'eventuale contaminazione ambientale in caso di rottura dei contenitori di trasporto.

Ai fini della biosicurezza devono inoltre essere osservate le seguenti precauzioni:

- Utilizzare il percorso più breve e diretto per portarsi dalla sede di prelievo ai laboratori.
- Non effettuare soste intermedie (es. spazi comuni, pausa caffè) ma recarsi direttamente presso i laboratori.
- Indossare i guanti monouso durante il trasporto dei campioni.
- Utilizzare sempre contenitori appropriati (es. provette sottovuoto o comunque ben chiuse, contenitori per esame feci o urine) riposti all'interno di appositi sacchetti in plastica. Evitare in particolare il trasporto di materiale biologico contenuto in siringhe, teli chirurgici o altri contenitori che possano generare dispersione di materiale biologico nell'ambiente.
- Per i campioni provenienti dalle aree di isolamento, inserire il sacchetto contenente i contenitori in un secondo sacchetto di plastica.
- In caso di rottura dei contenitori o di dispersione di materiale biologico durante il trasporto, oltre a prendere i provvedimenti individuali relativi al rischio biologico descritti nella Parte Generale di questo Manuale (es. lavaggio di mani o occhi), informare i responsabili delle aree ospedaliere in cui è avvenuto l'incidente.
- Se si proviene dal Reparto Clinica Equini o dal Reparto Clinica Ruminanti e Suini (grandi animali), non accedere al corridoio dei laboratori indossando stivali o indumenti imbrattati da deiezioni.

Laboratorio di Patologia clinica e citofluorimetria

I campioni vanno consegnati direttamente al personale del laboratorio. Nel caso di temporanea assenza del personale i campioni possono essere lasciati nell'apposito contenitore sulla scrivania di accettazione del laboratorio.

I campioni prelevati in ospedale al di fuori degli orari di apertura del laboratorio, se non urgenti, possono essere conservati refrigerati (24-48 ore) presso la sede di prelievo (es., degenze o reparti grandi animali) per essere trasportati in laboratorio dopo la riapertura, o depositati nell'apposito contenitore posto nel frigorifero del Locale lavaggio del corridoio laboratori. Per diminuire il rischio di artefatti, i campioni di siero devono essere centrifugati direttamente in degenza il prima possibile e quelli di plasma da sodio citrato entro un'ora dal prelievo, utilizzando i DPI sopra descritti (camice, guanti monouso).

Laboratorio di Parassitologia

I campioni vanno consegnati direttamente al personale del laboratorio, negli orari di apertura del laboratorio stesso, contenuti nelle apposite buste. In caso di assenza temporanea del personale, i campioni vanno lasciati nel frigorifero del laboratorio di Parassitologia. I campioni prelevati negli orari di chiusura del laboratorio possono essere conservati refrigerati (+4 °C; non congelare) per 24 ore (sangue/siero) o 48 ore (feci/altro materiale) presso la sede di prelievo, per essere trasportati in laboratorio alla riapertura. In alternativa, possono essere depositati nell'apposito contenitore posto nel frigorifero del Locale lavaggio

Laboratorio di Microbiologia

I campioni vanno consegnati direttamente al personale del laboratorio. In caso di assenza temporanea del personale, i campioni vanno lasciati nel frigorifero del laboratorio di Microbiologia. I campioni prelevati negli orari di chiusura del laboratorio possono essere conservati refrigerati (+4 °C; assolutamente non congelati) presso la sede di prelievo, per essere trasportati in laboratorio alla riapertura. In alternativa, possono essere depositati nell'apposito contenitore posto nel frigorifero del Locale lavaggio.

Laboratorio di Diagnostica molecolare

I campioni vanno consegnati direttamente al personale del laboratorio. In caso di assenza temporanea del personale, i campioni vanno lasciati nel frigorifero del laboratorio di Diagnostica Molecolare. I campioni prelevati negli orari di chiusura del laboratorio possono essere conservati refrigerati (+4 °C) presso la sede di prelievo, qualora si preveda la consegna al laboratorio entro le 24 ore. In caso contrario vanno congelati a -20 °C, oppure a -80 °C, se si tratta di campioni per cui è necessario effettuare analisi di patogeni a RNA o in caso di invio al laboratorio in tempi lunghi. In alternativa, possono essere depositati nell'apposito contenitore posto nel frigorifero del Locale lavaggio.

Rischi connessi alle attività di laboratorio

Le attività di laboratorio espongono il personale a una serie di rischi riportati di seguito, per i quali devono essere tenute presenti sia le norme di comportamento descritte nella Parte Generale di questo Manuale sia quelle descritte relativamente ai rischi specifici di ciascun laboratorio. In particolare, si ricorda che le donne in stato di gravidanza devono prestare particolare attenzione alla presenza di rischi biologici e chimici.

Di seguito vengono riportati i principali rischi connessi alle attività di laboratorio.

Rischio biologico

La gran parte delle matrici oggetto di studio sono rappresentate da campioni di origine animale. Tutto il materiale esaminato in laboratorio (es. sangue, fuci, urine, tessuti animali, latte) è da considerarsi, come già accennato, potenzialmente infetto.

In laboratorio devono essere applicate le stesse norme per la gestione dei rifiuti descritte nella Parte Generale del presente Manuale, con particolare riferimento alla gestione di rifiuti a potenziale rischio infettivo.

Rischio chimico

Molti dei reagenti utilizzati nella processazione dei campioni presentano potenziali rischi chimici, dalla tossicità locale (irritazioni, causticazioni) a quella sistemica (irritazione delle mucose, cancerogenicità).

È importante ricordare che un uso corretto delle cappe chimiche e dei guanti limita il rischio generato dal contatto con queste sostanze. In ogni caso, la pericolosità di queste sostanze dipende spesso dalla dose e dal tempo di esposizione, che sono diversi da sostanza a sostanza.

Tali informazioni sono riportate, tramite pittogrammi e codici, sui flaconi o sulle bottiglie in cui vengono commercializzate le sostanze, nonché sulle relative schede di sicurezza. Pertanto, quando si maneggiano per la prima volta determinate sostanze, è fondamentale acquisire tutte le informazioni relative alla loro potenziale pericolosità, leggere attentamente le etichette e seguire scrupolosamente le precauzioni ivi indicate.

Per evitare danni a se stessi e ad altre persone, è importante assicurarsi che i recipienti contenenti le sostanze siano ben chiusi, poiché alcune sostanze sono volatili e possono disperdersi facilmente nell'ambiente. Per questo motivo, quando si lavora o si maneggiano sostanze volatili, è consigliato operare sotto cappe chimiche o a flusso laminare.

Qualora le sostanze utilizzate in laboratorio venissero travasate in altri contenitori diversi da quelli nei quali vengono commercializzate, ogni nuovo recipiente deve essere contraddistinto con un'etichetta che ne indichi chiaramente il contenuto e la data di preparazione.

Non lasciare mai senza controllo reazioni in corso e apparecchi che utilizzando reagenti chimici potenzialmente nocivi.

Manipolazione del bromuro di etidio

La manipolazione del bromuro di etidio (fasi di allestimento di gel durante la diagnostica molecolare), potenzialmente mutageno e cancerogeno, deve essere eseguita sotto cappa a flusso laminare indossando, oltre agli appositi DPI (camiche, guanti monouso), un ulteriore paio di guanti monouso.

Ogni operatore che maneggia bromuro di etidio deve indicare quantità, data e il proprio nominativo nelle schede apposite conservate presso il laboratorio.

Una volta che il gel contenente il bromuro di etidio si solidifica, può essere portato fuori dalla cappa e posizionato sul bancone e successivamente può essere riposto nella vaschetta elettroforetica. Il rischio di contaminazione a questo punto è estremamente ridotto, ma viene comunque sempre tenuto in considerazione. A tal fine, è stata segnalata e delimitata un'area del bancone, nel locale di Diagnostica molecolare, in cui può essere maneggiato il gel. Il contenitore del gel, prima di essere versato, deve essere lavato accuratamente nel lavandino del laboratorio, operazione che deve essere eseguita indossando guanti monouso. Successivamente, i guanti utilizzati devono essere smaltiti e sostituiti con nuovi guanti.

Rischi connessi con le apparecchiature e le strumentazioni

Prima di utilizzare qualsiasi apparecchio, è opportuno leggere il manuale delle procedure operative standard (SOP) relative allo strumento stesso presente presso il laboratorio o chiedere istruzioni al personale deputato all'uso di tali apparecchi. Nel laboratorio di Patologia clinica e citofluorimetria e nei laboratori dove vengono allestite le diverse fasi della PCR sono presenti SOP. In generale, si ricorda di non utilizzare apparecchiature elettriche non a norma e di tenerle il più lontano possibile da fonti di umidità e/o vapori infiammabili.

Non installare e usare prolunghe permanenti.

Non bagnare mai le centrifughe per evitare shock elettrici o malfunzionamenti.

Fare il possibile perché gli apparecchi elettrici non siano urtati o sottoposti a forti vibrazioni che potrebbero alterare il corretto funzionamento dell'impianto.

Prima di lasciare il laboratorio accertarsi che tutti gli apparecchi, eccetto quelli necessari, siano spenti.

Radiazioni UV e transilluminatore

Le lampade con radiazioni a lunghezza d'onda inferiori a 320 nm devono essere schermate e il responsabile di ciascun servizio dei Laboratori di Diagnostica deve informare tutti coloro che accedono al laboratorio della pericolosità della lampada. Utilizzare occhiali protettivi in situazioni di esposizione alla lampada.

La visualizzazione del gel per la diagnostica molecolare viene effettuata con il transilluminatore. Il gel viene trasportato in prossimità del transilluminatore utilizzando un vassoio specifico, viene sollevato il coperchio dello strumento, il gel viene posto

sul ripiano dello strumento e successivamente il coperchio viene richiuso. Solo quando il ripiano del transilluminatore è coperto dall'apparecchio per la registrazione delle immagini, è possibile accendere i raggi UV del transilluminatore.

Dopo aver visualizzato il gel, si può procedere con una fotografia dell'immagine: il personale deve togliersi i guanti per prendere l'apparecchio per scattare la fotografia, evitando assolutamente di toccare lo strumento fotografico con i guanti che sono stati a contatto con il gel. Viene successivamente riposto lo strumento fotografico e si procede con lo spegnimento delle strumentazioni: l'operatore a questo punto deve indossare un paio di guanti nuovi e procedere con l'eliminazione del gel nell'apposito contenitore dei rifiuti speciali.

Apparecchi a ultrasuoni

Tutti coloro che utilizzano apparecchi a ultrasuoni (es. il sonicatore) devono collocarli in locali isolati e utilizzarli in assenza di persone e con la porta chiusa.

Aghi, coltelli, forbici o lame

L'uso di aghi, di siringhe con ago innestato e di lame da bisturi deve essere limitato alle situazioni in cui non esistono altre alternative. L'utilizzo di questi strumenti si rifà alle generali norme di comportamento e di buona prassi. Aghi e oggetti taglienti devono essere eliminati negli appositi contenitori come descritto nella parte generale del presente manuale.

Anse da batteriologia

Le anse monouso hanno il vantaggio di non dover essere sterilizzate. Dopo l'uso, prima di essere eliminate, queste anse vanno immerse nel disinfettante come indicato nelle SOP del laboratorio.

Autoclavi

Le autoclavi devono essere utilizzate solo da personale preventivamente formato e autorizzato.

Cappe a flusso laminare

Le cappe di classe II garantiscono asetticità sul piano di lavoro e protezione per l'operatore, perché il flusso d'aria costituisce una barriera tra l'operatore e l'interno della cappa. In questo tipo di cappe, l'aria entra dall'apertura sul davanti, viene aspirata verso il basso e filtrata dai filtri HEPA, quindi viene reimessa in circolo dall'alto. Essendoci un ricircolo parziale dell'aria, queste cappe possono essere impiegate per la protezione contro i rischi biologici e, in caso si lavori con basse concentrazioni di solventi, materiale radioattivo, prodotti chimici cancerogeni o tossici.

Prima dell'inizio dell'attività lavorativa, verificare che le lampade UV siano spente; il loro utilizzo come germicidi deve essere sempre limitato a una breve azione iniziale. Accendere il motore di aspirazione almeno 10 minuti prima dell'inizio delle attività per stabilizzare il flusso laminare e assicurarsi che le griglie di aspirazione non siano bloccate da materiali, attrezzature e

apparecchiature, al fine di garantire la corretta velocità del flusso d'aria.

Per quanto riguarda la gestione dei campioni destinati alla diagnostica molecolare, il personale deve assicurarsi, prima di iniziare le operazioni di manipolazione del campione sotto cappa, di azionare il dispositivo dei raggi UV per eliminare eventuali tracce di acidi nucleici residue da manipolazioni precedenti. Questo passaggio è fondamentale per evitare la contaminazione crociata e garantire la validità dei risultati delle analisi.

È opportuno ridurre allo stretto indispensabile la presenza sotto cappa di oggetti, contenitori o apparecchiature. Si consiglia di lavorare il più possibile nella zona centrale della cappa.

Le apparecchiature e i contenitori utilizzati, prima di rimuoverli dalla cappa, devono essere disinfezati.

I rifiuti delle lavorazioni devono essere posizionati in idonei contenitori per rifiuti biologici collocati all'interno della cappa. I contenitori possono essere trasferiti all'esterno della cappa solo dopo la verifica della chiusura a tenuta del tappo, dell'esistenza dell'etichetta con il segnale di rischio biologico e dell'assenza di residui sulla superficie esterna.

Al termine delle attività, si deve pulire accuratamente il piano di lavoro della cappa con il materiale disinfezante più idoneo alle matrici o agli agenti biologici potenzialmente presenti nel campione in fase di analisi. Dopo la fine delle operazioni, bisogna lasciare la cappa in funzione per circa 10 minuti.

In caso di versamento di materiale biologico all'interno della cappa, adottare la seguente procedura: non spegnere la cappa; rimuovere immediatamente il materiale sversato dal piano di lavoro, con materiale imbevuto di disinfezante e procedere disinfezionando le pareti, le superfici e gli strumenti presenti.

Centrifughe

Collocare le centrifughe il più lontano possibile dalle postazioni di lavoro, su un piano di lavoro stabile e non soggetto a vibrazioni, e ricordarsi di bilanciare sempre le provette (sia in simmetria sia in peso).

Verificare sempre prima dell'uso il corretto funzionamento delle centrifughe e ispezionare giornalmente i rotori per accertarne l'integrità.

In caso di citocentrifugazione non superare mai la velocità di 500 rpm.

Usare provette con tappo a vite o con chiusura ermetica per evitare di disperdere nella centrifuga il materiale contenuto al loro interno, che può anche formare un aerosol finissimo ad alta velocità, in grado di disperdersi e rimanere in sospensione per molto tempo.

In caso di contaminazione dell'interno o dell'esterno della centrifuga con materiale biologico, rimuovere immediatamente il contaminante con una garza impregnata di disinfezante (in caso di colture batteriche usare candeggina). Ricordarsi di lavare sempre accuratamente l'interno delle centrifughe utilizzate per le analisi delle feci.

Particolari precauzioni devono essere adottate non solo durante la fase di caricamento e prelievo dei campioni, ma an-

che durante la fase operativa, nella pulizia o negli interventi di manutenzione e riparazione. In particolare, se si impiegano organismi patogeni o prodotti biologici potenzialmente infetti, è preferibile utilizzare rotori chiusi e autoclavabili, portaprovette di facile pulizia e resistenti ai comuni disinfettanti, mentre l'operatore è tenuto a indossare i DPI più idonei.

Contenitori da laboratorio

I contenitori da laboratorio (cilindri, becher, beute) possono essere in vetro borosilicato o pyrex e in plastica.

I contenitori in pyrex sono resistenti agli sbalzi di temperatura. I contenitori in borosilicato, al contrario, sono molto sensibili agli sbalzi di temperatura. Quindi, non porre liquidi freddi in contenitori caldi o viceversa.

I contenitori in vetro borosilicato o pyrex, la cui integrità è compromessa, vanno eliminati.

La vetreria deve essere rigorosamente lavata e sciacquata accuratamente con acqua demineralizzata. È buona norma che ci si occupi personalmente di lavare e sciacquare la vetreria e il materiale da laboratorio utilizzato.

Frigoriferi e congelatori

I frigoriferi e i congelatori devono essere caricati in modo da permettere una libera circolazione dell'aria, evitando il sovrappiombamento di materiali, così da mantenere una temperatura interna sempre adeguata e costante.

È opportuno tenere nettamente separato, all'interno dei frigoriferi, il materiale sterile (es., terreni di coltura e reagenti non inoculati) dai campioni da analizzare, dai ceppi di microrganismi e dai terreni inoculati.

Su tutti i contenitori conservati nei frigoriferi deve essere chiaramente apposta un'etichetta con il nome dei materiali contenuti e la data del deposito.

Il personale afferente ai laboratori effettua con cadenza periodica le operazioni che prevedono: rimozione della polvere dalle piastre esterne di aerazione; sbrinamento; pulizia e decontaminazione dell'interno. Durante il lavoro di pulizia si deve indossare una protezione per il viso e guanti di gomma. I materiali non opportunamente identificati verranno eliminati senza preavviso, previo passaggio in autoclave.

Incubatori

Le normali indicazioni d'uso per quanto riguarda gli incubatori prevedono la protezione delle pareti dell'incubatore dalla luce solare. Evitare l'introduzione di grandi quantità di materiale lasciando spazi adeguati al fine di permettere la circolazione dell'aria.

Gli incubatori devono essere sottoposti periodicamente a pulizia, decontaminazione e rimozione della polvere dal sistema di ventilazione. Queste operazioni vengono eseguite dal personale afferente ai laboratori.

Pipette

I sistemi di pipettamento meccanico (propipette, micropipette) devono essere gli unici usati per manipolare in laboratorio tutti i liquidi. Il pipettamento a bocca non deve essere mai eseguito.

Le micropipette devono essere dotate di un elettore del puntale in modo da evitare il contatto diretto dell'operatore con il materiale potenzialmente infetto.

Le propipette devono essere disinseppate accuratamente dopo il loro utilizzo.

Le micropipette devono essere sempre mantenute in posizione verticale e mai adagiate sul banco di lavoro, soprattutto se è inserito il puntale.

I puntali vanno sostituiti dopo ogni operazione. Per le procedure microbiologiche è consigliabile utilizzare puntali dotati di microfiltro interno per ridurre i rischi di contaminazione. Al termine di ogni lavorazione la micropipetta deve essere disinseppata.

Provette

Maneggiare con cura le provette in vetro: possono rompersi e causare ferite. Se possibile evitare di tenerle in mano, ponendole negli appositi portaprovette.

Non inserire liquidi caldi in provette fredde e viceversa, né utilizzare tappi più grandi del dovuto, forzandoli. In tutti questi casi le provette potrebbero rompersi.

Dopo l'uso, le provette sporche devono essere opportunamente pulite secondo le SOP presenti nel laboratorio di riferimento.

Le provette in plastica sono da preferire a quelle in vetro quando si devono usare liquidi a temperature elevate. Non usare provette in plastica per reagenti chimici quali xylene, acido solforico e diossano: tali prodotti, che sono estremamente tossici, sciolgono la plastica delle provette disperdendosi nell'ambiente.

Termociclatori

L'utilizzo dei termociclatori deve essere effettuato sempre da personale opportunamente formato. L'accensione, l'apertura e la chiusura del coperchio, la selezione del programma specifico di amplificazione e l'inserimento dei campioni nello strumento sono momenti in cui deve essere posta particolare attenzione, anche al fine di evitare manomissioni involontarie dello strumento.

Vetrini

Prestare la massima attenzione nel manipolare i vetrini portaprogetto e coprioggetto: i vetrini non molati possono avere margini taglienti e ogni tipo di vetrino può rompersi e causare ferite durante le operazioni di striscio e/o colorazione.

Gettare i vetrini usati negli appositi box per taglienti come descritto nella Parte Generale di questo Manuale.

Pulizia e disinfezione

La pulizia e disinfezione delle strumentazioni e delle superfici nel reparto può essere effettuata seguendo le disposizioni specificamente indicate nella Parte Generale del presente manuale – Scelta dei prodotti.

In generale, in condizioni routinarie e in assenza di specifiche necessità di disinfezione nei confronti di particolari microrganismi e di superfici e strumenti non critici, si consiglia l'uso di:

- ipoclorito di sodio al 10%: un disinseppante efficace contro una vasta gamma di patogeni, utilizzato per la decontaminazione di superfici e attrezzi;
- alcool etilico al 70%: utilizzato per la disinfezione rapida delle superfici e delle strumentazioni, in particolare per eliminare batteri e virus;
- carta a perdere: impiegata per la pulizia e l'asciugatura delle superfici, evitando il rischio di contaminazione da materiale riutilizzabile.

Tuttavia, in base al tipo di materiale biologico sottoposto a manipolazione e ai relativi organismi che potrebbero compromettere la sicurezza dell'ambiente di lavoro e degli operatori, in ciascun laboratorio vengono indicati i disinseppanti più adatti per ogni specifico caso. Ogni laboratorio dispone di linee guida precise che stabiliscono quale disinseppante utilizzare per garantire la decontaminazione corretta e sicura di strumenti, superfici e materiali.

Per i laboratori adibiti alla biologia molecolare, è sconsigliato l'uso di alcool per la pulizia di materiali e superfici, in quanto può favorire l'adesione degli acidi nucleici su queste ultime. Per rimuovere tracce di DNA senza rischiare di fissarle, è preferibile utilizzare disinseppanti che non interagiscono con il DNA, come l'ipoclorito di sodio o altre soluzioni a base di detergenti specifici per la decontaminazione biologica.



collegamento alle
SOP di Reparto