Norme di comportamento e di gestione degli strumenti nei laboratori universitari di Endocrinologia e Medicina presso il Policlinico e presso il Nuovo Ospedale Civile S. Agostino-Estense (NOCSAE)

All'interno dei laboratori universitari di Endocrinologia e Medicina è obbligatorio l'uso dei DPI.
I laboratori sono organizzati in ambienti denominati "Amplicon Area" (Post-PCR) e "Amplicon free" (Pre-PCR). E' buona norma evitare spostamenti dagli ambienti Post-PCR a quelli Pre-PCR durante la sessione di lavoro. Se l'operatore è autorizzato all'utilizzo di strumenti in entrambe le aree, dovrà procurarsi camici, guanti, consumabili e reagenti specifici propri dedicati a ciascuna di esse.
Di seguito sono specificate alcune norme di buon utilizzo delle principali apparecchiature. Si sottolinea che tali norme non sostituiscono in maniera alcuna le indicazioni contenute nei manuali degli strumenti, ma ne costituiscono unicamente il completamento al fine di assicurarne una corretta fruizione.

1. Cappe

1.a Cappe a flusso laminare BioHazard

Operazioni normali di utilizzo

- se la lampada a raggi UV è in funzione, attendere il termine del ciclo di UV prima di iniziare a lavorare sotto cappa;
- ridurre al minimo indispensabile il materiale sul piano di lavoro e non utilizzare la cappa come deposito; eseguire tutte le operazioni posizionandosi al centro o verso il fondo del piano di lavoro; evitare l'utilizzo di fiamme libere, che oltre ad alterare il flusso possono danneggiare il filtro HEPA;
- al termine di ciascuna operazione, rimuovere le sostanze e/o il materiale utilizzato dalla cappa e pulire bene il piano di lavoro e le pareti laterali interne con alcool al 70%; una volta evaporato completamente l'etanolo, avviare un ciclo di UV;
- non utilizzare la cappa come mezzo per lo smaltimento dei reagenti mediante evaporazione forzata.

Operazioni di controllo e manutenzione

Le cappe a flusso laminare sono sottoposte a manutenzione preventiva a cadenza annuale secondo apposito contratto con una ditta esterna.

1.b Cappe chimiche

Operazioni normali di utilizzo

- ridurre al minimo indispensabile il materiale sul piano di lavoro e non utilizzare la cappa come deposito;
- eseguire tutte le operazioni posizionandosi al centro o verso il fondo del piano di lavoro; evitare l'utilizzo di fiamme libere;
- al termine di ciascuna operazione, rimuovere le sostanze e/o il materiale utilizzato dalla cappa e pulire accuratamente il piano di lavoro e le pareti laterali interne con alcool diluito al 70%;
- i contenitori per i rifiuti liquidi e solidi posti all'interno della cappa chimica devono essere prontamente sostituiti quando pieni; non accumulare i contenitori pieni per rifiuti all'interno della cappa, ma conservarli in apposito deposito in attesa dello smaltimento.

Operazioni di controllo e manutenzione

Endolab Unimore

Le cappe chimiche sono sottoposte a manutenzione preventiva a cadenza annuale da parte della struttura che ne detiene il possesso e consiste nella verifica della corretta funzionalità del flusso e nella sostituzione degli eventuali filtri a carbone attivo della cappa chimica a ricircolo, per la cappa chimica con espulsione all'esterno invece, in caso di malfunzionamento, si ricorre alla riparazione/sostituzione della cappa.

1.c Cappa per PCR

Operazioni normali di utilizzo

- la cappa per PCR è ad uso esclusivo per l'allestimento di reazioni di PCR da parte dell'utente;
- se la cappa è dotata di una lampada a raggi UV, attendere il termine del ciclo di UV prima di iniziare a lavorare sotto cappa. Il ciclo di UV è obbligatorio prima dell'utilizzo della cappa stessa;
- ridurre al minimo indispensabile il materiale sul piano di lavoro e non utilizzare la cappa come deposito; eseguire tutte le operazioni posizionandosi al centro o verso il fondo del piano di lavoro; non accendere fiamme e non utilizzare materiali che sprigionano gas tossici o nocivi sotto alla cappa per PCR;
- al termine di ciascuna operazione, rimuovere le sostanze e/o il materiale utilizzato dalla cappa e pulire bene il piano di lavoro e le pareti laterali interne con alcool al 70%;
- non utilizzare la cappa come mezzo per lo smaltimento dei reagenti.

2. Centrifughe

Operazioni normali di utilizzo

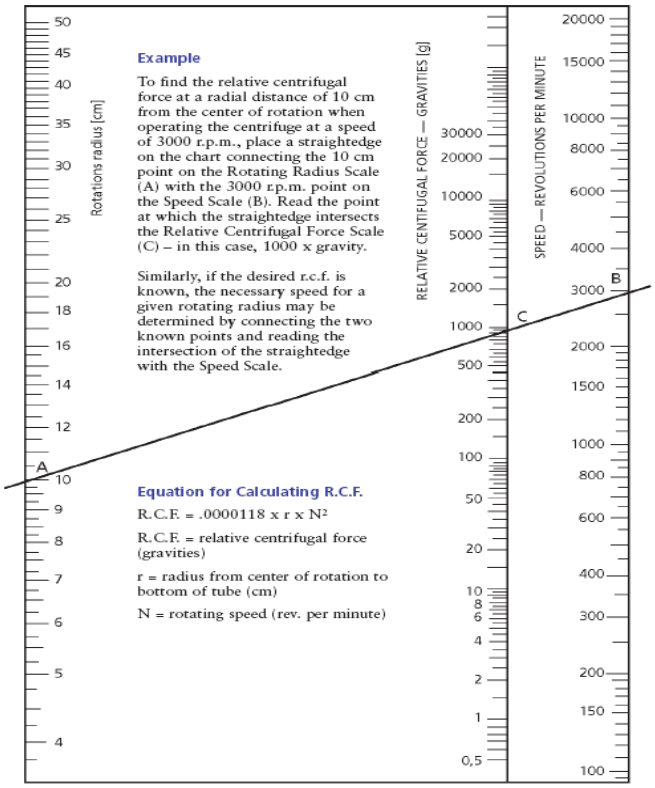
- ispezionare rotori e contenitori per accertare l'assenza di corrosioni e fessure capillari;
- bilanciare i contenitori e gli accessori da centrifuga;
- assicurarsi di aver inserito nella centrifuga il tipo corretto di adattatore per le provette in uso;
- qualora si utilizzino provette di vetro, ispezionarle singolarmente e non usare provette rotte o scheggiate;
- evitare di riempire le provette oltre il limite consigliato;
- decontaminare regolarmente l'interno delle centrifughe, i contenitori e gli accessori con alcool al 70%; una volta all'anno lubrificare con silicone il perno a cui vengono avvitati i rotori e in caso di rotori basculanti ungere con grafite i punti in cui fanno leva le bascule.
- in caso di rottura di provette o di altri contenitori all'interno di centrifughe, fermare il motore e lasciare la centrifuga chiusa per almeno 30 minuti, quindi aprire i rotori o i contenitori a tenuta e recuperare i frammenti di vetro o plastica utilizzando delle pinze e indossando guanti possibilmente di gomma spessa; assorbire il materiale versato con materiale assorbente da eliminare come rifiuti speciali e disinfettare l'interno della centrifuga, gli accessori e il rotore con alcool almeno 70% o ipoclorito allo 0,5%, se non corrosivo per il materiale, quindi lavare con acqua e asciugare. Non usare ipoclorito puro per disinfettare i metalli perché corrosivo.
- solitamente le centrifughe riportano i valori di centrifugazione in rpm: la formula di conversione dei giri in rpm è la seguente:

$$\mathbf{rpm: 1000 \times \sqrt{giri}/\ 1{,}12 \times r}$$

g= RCF (forza centrifuga relativa); r= raggio del rotore espresso in mm

In alternativa si possono utilizzare **normogrammi** come quello riportato di seguito, in cui in colonne affiancate sono indicati il raggio del rotore in cm, i g e gli rpm: tracciando una linea retta tra due colonne si determina la varabile incognita.

Endolab Unimore



Example

To find the relative centrifugal force at a radial distance of 10 cm from the center of rotation when operating the centrifuge at a speed of 3000 r.p.m., place a straightedge on the chart connecting the 10 cm point on the Rotating Radius Scale (A) with the 3000 r.p.m. point on the Speed Scale (B). Read the point at which the straightedge intersects the Relative Centrifugal Force Scale (C) – in this case, 1000 x gravity.

Similarly, if the desired r.c.f. is known, the necessary speed for a given rotating radius may be determined by connecting the two known points and reading the intersection of the straightedge with the Speed Scale.

Equation for Calculating R.C.F.

R.C.F. = .0000118 x r x N^2

R.C.F. = relative centrifugal force (gravities)

r = radius from center of rotation to bottom of tube (cm)

N = rotating speed (rev. per minute)

Endolab Ulmore

3. Frigoriferi/Congelatori

Operazioni normali di utilizzo

- non aprirli frequentemente e inutilmente, e assicurarsi che gli sportelli siano chiusi ermeticamente;
- utilizzare contenitori adatti a sopportare le basse temperature richieste per la conservazione del materiale; etichettare chiaramente tutti i contenitori con informazioni su contenuto, operatore e data;
- eliminare periodicamente materiale non identificabile.

Operazioni di controllo e manutenzione

- PULIZIA E RIMOZIONE DEL GHIACCIO

Qualora ritenuto necessario, pulire e sbrinare i frigoriferi/congelatori, procedendo in questo modo: scollegare la spina dalla presa di corrente, spostare tutto il contenuto del frigorifero/congelatore in un frigorifero/congelatore ausiliario, utilizzando vaschette per il trasporto; aprire lo sportello e disporre vaschette e stracci attorno al frigorifero/congelatore per raccogliere l'acqua di sbrinamento; quando il ghiaccio è completamente disciolto, gettare l'acqua raccolta nelle vaschette, raccogliere l'acqua dalle superfici interne con stracci o carta e passare sulle superfici interne una spugna imbevuta di acqua e detergente idoneo; asciugare con stracci e spolverare esternamente; disinfettare con garza o carta imbevuta di alcool al 70%; ricollegare alla presa elettrica ed attendere che si stabilizzi la temperatura prima di rimettere a posto il materiale precedentemente spostato.

- CONTROLLO DI FUNZIONALITA'

E' previsto un Controllo di funzionalità da parte delle unità operative:

1. settimanalmente con misurazione della temperatura interna e trascrizione della lettura sull'apposito registro;
2. annualmente con sonda tarata SIT (Termometro PT100 mod. temp. 6 XS con sonda PT100 -100+350°C mod. PT56 TFE);
3. al momento dell'uso per i frigoriferi/congelatori di regola spenti quando non utilizzati.

Il controllo settimanale consiste nel verificare, una volta alla settimana, che la temperatura di lavoro rilevabile dal display dello strumento o da un termometro posto all'interno rientri nelle specifiche definite e che non vi siano state variazioni di temperatura oltre i limiti prestabiliti ovvero T°= 4°C +/- 1 e T°= -20°C +/- 1.

Il valore rilevato a ciascun controllo deve essere registrato sulla apposita scheda "Stato della apparecchiatura", insieme a data e firma dell'operatore.

4. Bagni termostatici

Operazioni normali di utilizzo

- riempire il bagno termostatico con acqua distillata, meglio se con l'aggiunta di un antimuffa o un antimicrobico non corrosivo per lo strumento (si può utilizzare Aqua Clean, Wak-Chemie, Germany alla concentrazione di 5 ml in 1 litro di acqua);
- sostituire l'acqua periodicamente in base alla frequenza di utilizzo del bagno termostatico ed ogni volta che appare sporca;
- evitare di immergere nell'acqua le mani nude;
- posizionare bottiglie e provette nel bagno avendo cura che il livello dell'acqua non raggiunga mai l'apertura ed i tappi dei recipienti.

Endolab Unimore

Operazioni di controllo e manutenzione
- PULIZIA
A discrezione delle unità operative, e comunque almeno annualmente, è necessario procedere ad una pulizia approfondita del bagno termostatico, indossando guanti ed utilizzando un idoneo prodotto detergente che non danneggi il rivestimento interno della vasca dell'acqua;
- CONTROLLO DI FUNZIONALITA'
Solo per i bagni termostatici per i quali è necessaria una elevata accuratezza di misurazione della temperatura, è previsto un controllo annuale della corrispondenza tra temperatura impostata e temperatura effettiva dell'acqua mediante l'utilizzo di una sonda tarata SIT.

5. Agitatori magnetici, rotanti, vibranti (vortex)

Prima di utilizzare l'apparecchio per mescolare/agitare un campione verificare che:
- la velocità di rotazione sia adatta a non provocare schizzi o rotture dei contenitori;
- il contenitore del campione sia integro e chiuso ermeticamente;
- in caso sia necessario trattenere con le mani il contenitore o il coperchio, assicurarsi di garantire una buona presa.

6. Micropipette

Operazioni normali di utilizzo
- utilizzare solo puntali monouso adeguati alle micropipette da utilizzare; in caso di rischio di contaminazione della micropipetta con aerosol, utilizzare puntali monouso con filtro oppure pipette a spostamento positivo con puntali dedicati;
- non ruotare o appoggiare la micropipetta sul lato quando il puntale è carico di liquido, per evitare che il contenuto del puntale possa infilarsi nella micropipetta contaminandola;
- conservare sempre le micropipette in posizione sicura al riparo da urti e possibilmente in posizione verticale.

Operazioni di controllo e manutenzione
- PULIZIA
Pulire periodicamente la superficie esterna con etanolo 70%.
- CALIBRAZIONE
Sottoporre le micropipette a calibrazione periodica da parte dell'utente secondo le linee guida oppure a calibrazione e manutenzione periodica almeno una volta all'anno da parte di una Ditta esterna. E' previsto che siano sottoposte a manutenzione straordinaria in caso di rottura accidentale.

7. Termociclatori e termociclatori Real-Time PCR

Operazioni normali di utilizzo
Per evitare malfunzionamenti e contaminazioni crociate tra campioni differenti ciascun operatore deve attenersi alle seguenti disposizioni:

EndoLab Unimore

- assicurarsi che i tappi di ciascuna provetta inserita nello strumento siano ben chiusi per evitare l'evaporazione delle reazioni e la contaminazione del blocco;
- siglare ciascuna provetta con un apposito pennarello indelebile sul tappo e sulla superficie laterale della stessa per consentire l'identificazione univoca del campione nel caso in cui parte della sigla venga cancellata a causa delle alte temperature raggiunte dal blocco;
- controllare la corretta chiusura del coperchio dello strumento prima di avviare la reazione;
- evitare il contatto diretto con il coperchio ed il blocco termostatato quando lo strumento è acceso;
- al termine della reazione attendere il raffreddamento del blocco e spegnere correttamente lo strumento.

Operazioni normali di utilizzo dei termociclatori per Real-Time PCR
- utilizzare solo supporti ottici compatibili con lo strumento e idonei all'applicazione scelta;
- assicurarsi che i tappi di ciascuna provetta inserita nello strumento o i film ottici che sigillano le piastre siano ben chiusi per evitare l'evaporazione delle reazioni e la contaminazione del blocco;
- non siglare piastre e provette in posizioni che possano interferire con la rilevazione dei segnali o che possano sporcare blocco e/o coperchio dello strumento.

Operazioni di controllo e manutenzione
- PULIZIA E DECONTAMINAZIONE DEL BLOCCO
In caso di contaminazione del blocco, e comunque almeno una volta all'anno, effettuare la decontaminazione dei pozzetti con un tampone di cotone imbevuto in ipoclorito di sodio 1%, risciacquando poi con un nuovo tampone imbevuto in acqua.
Annualmente ed ogni qual volta l'operatore lo ritenga opportuno effettuare le operazioni di pulizia ordinaria del blocco dello strumento utilizzando un tampone di cotone imbevuto in isopropanolo al 1%.
In entrambi i casi assicurarsi di effettuare le operazioni di decontaminazione e pulizia a strumento spento solo quando il coperchio ed il blocco sono a temperatura ambiente.
- CONTROLLO DEL CORRETTO FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO
Ciascun termociclatore non specifico per Real-Time PCR è sottoposto ad un controllo operativo interno a cadenza annuale ed ogni qual volta ci sia il sospetto di un malfunzionamento dello strumento.
Il controllo strumentale interno prevede l'allestimento di una reazione di PCR standard su DNA controllo: si amplifica un frammento di 686 bp del gene BRCA1 utilizzando i seguenti primers: **11-21** 5'-ggttctgatgactcacatgatgg-3'
11-22 5'-cgcatgaatatgcctggtagaag-3'
La reazione di amplificazione deve essere eseguita in un volume finale di 50μl:

2μl	[≅0,1μg]	DNA genomico
1μl	[1mM finale ciascuno]	dNTP
5μl	[1x finale]	Buffer
1μl	[50 pmoli di ognuno dei due]	PRIMERS
0,5μl	[2,62 U/campione]	TAQ"EXPAND™"
a volume		H_2O

Biolab Unimore

Utilizzare il seguente programma di amplificazione:
-5 minuti a 95°C
-(40 secondi a 95°C, 40 secondi a 59°C, 3 minuti a 68°C)→29 volte

Operazioni di controllo e manutenzione sullo strumento per Real-Time PCR CFX96 BioRad

- CALIBRAZIONE

Ogni sei mesi, o quando ritenuto necessario dall'operatore, effettuare una calibrazione dello strumento al fine di garantirne la taratura, attuando una lettura di un campione standard dall'esito noto.La preparazione avverrà come segue, utilizzando i reagenti del fornitore:

- Allestire una piastra di calibrazione in questo modo: preparare una soluzione con Sso Fast Eva Green Supermix (1200 µl), Melt Calibration DNA standard (120 µl), Melt calibration primers (14,4 µl), Nuclease-free water (1065,6 µl), e caricarne 20 µl nei pozzetti della piastra di lettura.
- Attuare la lettura della piastra da parte dello strumento utilizzando il seguente programma "Melt calibration PCR protocol", impostato tramite il software CFX Manager":

Melt Calibration PCR protocol			
Cycling Step	**Temperature**	**Time**	**# of Cycles**
Enzyme activation	98°C	2 min	1
Denaturation	98°C	5 sec	40
Annealing/Extension	55°C	10 sec	
	95°C	1 min	1
	70°C	1 min	1
Melt curve	70-95°C (in 0.2°C inc.)	10 sec/step	1

- A lettura completa, il software CFX manager apre una schermata con il risultato ottenuto.
- A questo punto, lanciare il software "Precision Melt Analysis".
- Cliccare l'opzione "Tools", poi "Import melt calibration" dalla barra del menu.
- Scegliere ed aprire il nome del file di analisi appropriato.
- Confermare, premendo su "OK", l'avvenuta calibrazione effettuata con successo.

8. Strumenti per elettroforesi capillare per l'analisi di qualità e quantità di acidi nucleici e proteine

Operazioni normali di utilizzo

- La procedura prevede, nel seguente ordine: pulizia iniziale degli elettrodi - preparazione dei reagenti - preparazione del campione - priming del chip - caricamento dei campioni e corsa - analisi dei campioni - pulizia finale degli elettrodi.
- Le soluzioni di lavaggio devono essere conservate a temperatura ambiente; i reagenti sono conservati a +4C° ed equilibrati a temperatura ambiente almeno 15 minuti prima dell'utilizzo.
- Il ladder deve essere conservato a -80C° dopo averne fatto aliquote da 2µl.

Endolab Urinore

Operazioni di controllo e manutenzione sullo strumento Experion Automated Electrophoresis Station Biorad

- PULIZIA DEGLI ELETTRODI

Prima di ogni corsa, pipettare 800µl di soluzione Electrode Cleaner nel Cleaning chip e inserirlo nella stazione di lavoro, chiudere e aspettare 2 minuti, quindi rimuovere il chip e tamponarlo su carta; riempire il secondo Cleaning chip con 800µl di acqua DEPC e inserirlo; chiudere e lasciare inserito 5 minuti; sostituire l'acqua nel chip e ripetere l'operazione, questa volta per 2 minuti; rimuovere il chip e lasciare asciugare all'aria il coperchio aperto per 30-60 secondi.

Al termine di ogni corsa, inserire nella stazione di lavoro il Cleaning chip con 800µL di acqua DEPC, chiudere il coperchio e aspettare 60 secondi, aprirlo e lasciare che gli elettrodi si asciughino per circa 30 secondi; rimuovere il Cleaning chip e tamponarlo su carta per asciugarlo prima di riporlo per la conservazione.

- PROVA DI FUNZIONALITA'

A cadenza annuale verificare il corretto funzionamento dello strumento confrontando un campione noto con uno standard di peso molecolare opportunamente conservati. Nel caso in cui si dovessero rilevare discrepanze tra il risultato atteso e quello ottenuto, procedere chiamando la ditta fornitrice per concordare una operazione di manutenzione straordinaria.

9. Strumenti di quantificazione spettrofotometrica

Operazioni normali di utilizzo dello spettrofotometro

- utilizzare cuvette al quarzo per la lettura del campione; prima della lettura, assicurarsi che le cuvette non siano sporche o segnate effettuando la misurazione dell'assorbanza di un campione noto (es. acqua), ed effettuare la taratura dello strumento;
- rimuovere le cuvette al termine della sessione di lavoro;
- assicurarsi che non siano presenti gocce di campione all'interno della camera di contenimento delle cuvette;
- lavare accuratamente l'interno delle cuvette con alcool 70°, poi con acqua;
- assicurarsi che la superficie esterna delle cuvette non sia sporca; eventualmente, asciugarla delicatamente con l'apposito panno facendo attenzione a non segnarla;
- spegnere lo strumento al termine della sessione di lavoro.

10. Sequenziatori Sanger a 4 capillari

Operazioni di controllo e manutenzione

– non utilizzare mai prodotti contenenti fluorocromi;
– controllare quotidianamente il livello del POP posto nella siringa da 5 ml, che non deve essere mai inferiore ad 1 ml;
– ogni 2 giorni cambiare acqua e buffer di corsa 1X con EDTA, fornito dalla ditta Life Technologies/Applied Biosystems, nelle apposite vaschette;
– ogni 20 giorni smontare i blocchi interni di plexiglass e le due siringhe di vetro e lavare accuratamente il tutto con acqua distillata;
– ogni 2 mesi sostituire il set di capillari;
– ogni anno o qualvolta si verifichi un anomalia viene effettuata la pulizia completa dell'ottica dello strumento da parte della ditta Life Technologies/Applied Biosystems.

Endolab Unimore

11. Camere elettroforetiche

Operazioni normali di utilizzo

– posizionare la camera elettroforetica su un ripiano solido e perfettamente orizzontale;
– disconnettere sempre la camera dal gruppo di alimentazione prima di rimuovere il coperchio, spostare l'unità o aggiungere tampone di corsa;
– non riempire la camera del tampone di corsa al di sopra del limite massimo di riempimento;
– se non si utilizzano gel "precasted", preparare il gel di agarosio secondo protocollo, versarlo nell'appropriato vassoio del gel e lasciarlo solidificare, lavorando sotto cappa chimica nel caso in cui sia stato aggiunto bromuro di etidio;
– verificare il corretto funzionamento della camera elettroforetica controllando la comparsa di bolle in prossimità degli elettrodi;
– se la camera elettroforetica non possiede un supporto di corsa che funge anche da transilluminatore (come avviene nel sistema Flash Gel System), utilizzare un transilluminatore per controllare i gel.

Operazioni di controllo e manutenzione

– ogni tre giorni svuotare la camera. Depositare il gel in un apposito contenitore da smaltire come residuo di filtrazione e assorbenti esauriti, alogenati (CER 06070109);
– lavare la camera in ogni sua parte, prima con acqua corrente e poi con acqua distillata; non utilizzare per la pulizia solventi organici.

12. Scanner per l'acquisizione di immagini da gel

Versa Doc Imaging System 4000, è formato da una struttura dotata di carrello estraibile con lampade UV e da una camera fotografica posta sulla sommità dello strumento.

Operazioni normali di utilizzo

– accendere lo strumento schiacciando l'interruttore posto sul retro, accendere il PC, cliccare sull'icona del software di gestione Quantity One e selezionare Versa Doc; aprire il carrello, inserire il gel e chiudere il carrello; accendere gli UV, impostare apertura del diaframma, zoom e fuoco; acquisire e memorizzare l'immagine cliccando "freeze", e lavorare su questa immagine cliccando " analyze"; salvare e/o stampare l'immagine.

Operazioni di controllo e manutenzione

– ogni 6 mesi pulire i filtri della camera fotografica con carta imbevuta di alcool al 70%;
– è prevista una manutenzione annuale da parte della ditta Bio-Rad.

13. Fotocamera digitale Canon Power Shot A590 IS

La fotocamera digitale è utilizzata come strumento di acquisizione alternativo agli scanner (Versa Doc Imaging System 4000), dove possibile.

Ecolab Unimore

Operazioni normali di utilizzo

- accendere la fotocamera digitale e posizionarla sul gel di corsa del DNA, premere il tasto di acquisizione dell'immagine e collegare la fotocamera digitale al computer mediante cavo USB per scaricare l'immagine
- assicurarsi che l'obiettivo della fotocamera sia pulito, prima di ogni utilizzo;
- sostituire le pile quando necessario.

Endolab Unimore