

Progetto formativo aziendale

BIOLOGIA MOLECOLARE: GESTIONE INTEGRATA DI AMBIENTI E PROCEDURE

2° GIORNATA ó Mercoledì 8 maggio 2019

Flussi di lavoro all'interno delle aree comuni e scenari su
come muoversi secondo le norme AFNOR.

Giuseppe Manna



Organizzazione delle aree di prova

premessa

(Norma AFNOR U47-600-1)

Uno dei punti critici della reazione PCR è il **rischio di contaminazione dei campioni da analizzare** per la dispersione di polvere o aerosol che sono vettori di sequenze di acido nucleico, amplificazioni precedenti, campioni ricchi di target, ma anche a causa della manipolazione, accanto a campioni da analizzare, di acidi nucleici altamente concentrati (per esempio materiali di riferimento).



(Norma AFNOR U47-600-1)

Al fine di minimizzare i rischi, **è necessario razionalizzare l'organizzazione** delle diverse fasi di analisi e la gestione delle aree di lavoro dove vengono svolte le attività di PCR, risponde a un pensiero logico a livello di laboratorio (marcia in avanti, flusso d'aria, circuiti di persone, attrezzature, campioni, materiali di consumo, reagenti, rifiuti, ecc.).



(Norma AFNOR U47-600-1)

L'organizzazione del laboratorio deve essere idonea a soddisfare le diverse attività del laboratorio in termini di volume di attività, patogeni trattati, metodi di estrazione, amplificazione e rilevazione, e più in generale, il rischio di contaminazione.



Diagramma dei flussi operativi previsti dalla procedura PG VIR 009

Area Pulita

Area Contaminata

Area Molto
Contaminata

Area Fortemente
Contaminata

Area A - CLEAN LAB

Preparazione di reagenti, primer, miscele di reazione per le PCR e per la restrizione enzimatica, miscele per il sequenziamento.

Non può operarvi personale né essere introdotto alcunché proveniente dalle aree B, C, D.



Area B - ESTRAZIONI

Estrazione e quantificazione acidi nucleici, Allestimento PCR, Restrizione enzimatica, Purificazione dei prodotti di PCR

E' possibile conservare i campioni di DNA, RNA, PCR1 (Nested-PCR1). Non può operarvi personale né essere introdotto alcunché proveniente dalle aree C, D.



Area C - Amplificazione

Protocolli di amplificazione PCR e di Trascrizione inversa

Non può operarvi personale né essere introdotto alcunché proveniente dall'area D.



Area D - Elettroforesi

Esecuzione di corse elettroforetiche e lettura dei gel

E' possibile soltanto: a) introdurre e conservare i prodotti di PCR e i relativi reagenti; b) recuperare da gel i prodotti di PCR.



Diagramma dei flussi operativi previsti dalla Norma AFNOR U47-600-1

Légende

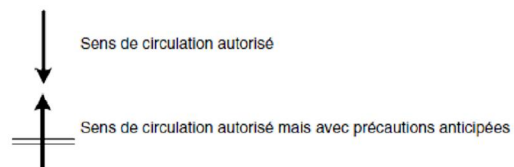
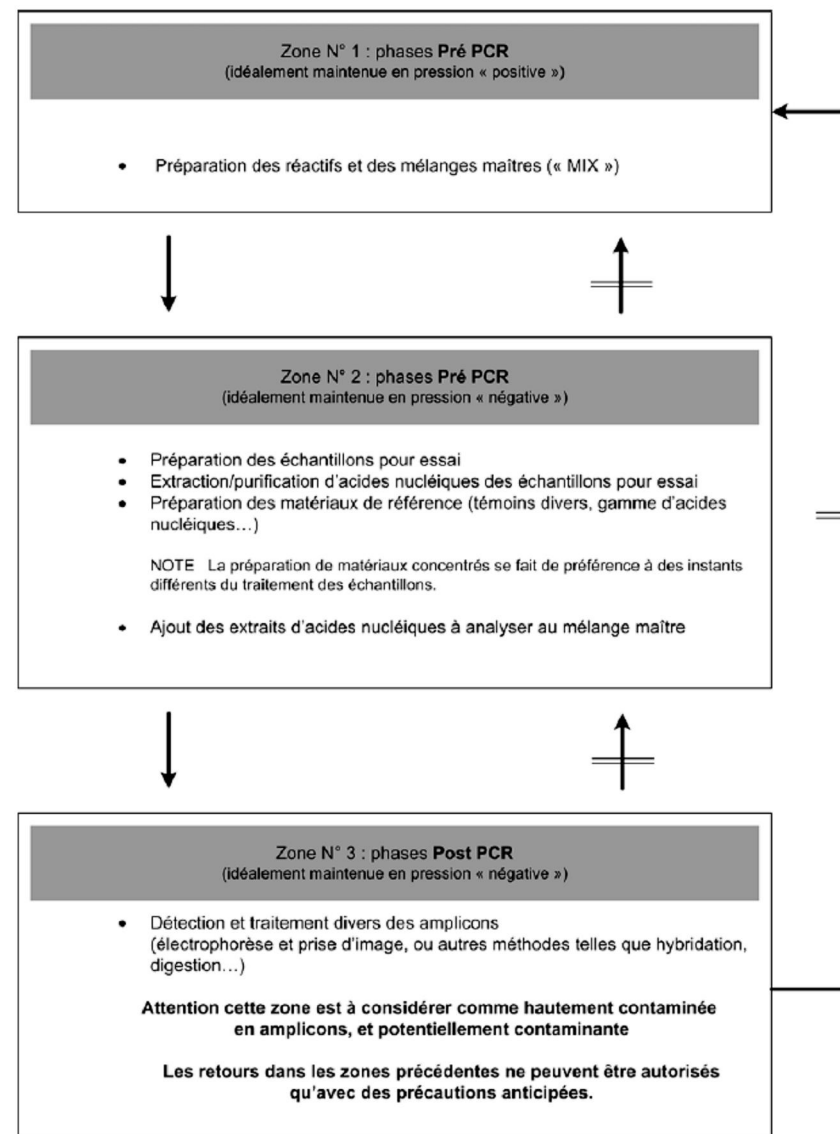


Figure 1 — « Schéma d'organisation recommandé d'utilisation des locaux »



AREA A - CLEAN LAB

Destinata esclusivamente alla preparazione di reagenti, primer, miscele di reazione per le PCR, miscele di restrizione enzimatica (RFLP), miscele di sequenziamento, conservazione dei reagenti.

Nell'area non può operare personale né essere introdotto alcunché proveniente dalle aree B, C, D.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

AREA B - ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI, ALLESTIMENTO REAZIONI DI PCR, REAZIONI DI RESTRIZIONE ENZIMATICA E PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

Area di “pre-PCR” dove si eseguono:

- a) protocolli di estrazione del DNA e dell'RNA;
- b) quantificazione del DNA e dell'RNA.

In questa area è possibile conservare i campioni di DNA, RNA, PCR1 (Nested-PCR1).

Nell'area non può operare personale né essere introdotto alcunché proveniente dalle aree C, D, tranne i prodotti di PCR1 per le Nested-PCR.



AREA C – AMPLIFICAZIONE

Area in cui si eseguono:

- a) i protocolli di amplificazione PCR;
- b) trascrizione inversa (cDNA e RT-PCR);
- c) purificazione dei prodotti di PCR;
- d) reazioni di restrizione enzimatica (RFLP).

Nell'area non può operare personale né essere introdotto alcunché proveniente dall'area D, tranne i prodotti di PCR che devono essere purificati.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

AREA D - ELETTROFORESI

Area di prova “post-PCR”, destinata all’esecuzione di corse elettroforetiche su supporto inerte.

In questa area di prova è possibile soltanto:

- a) introdurre i prodotti di PCR;
- b) recuperare i prodotti di PCR da gel per essere sottoposti a purificazione;
- c) conservare i prodotti di PCR non destinati ad ulteriori amplificazioni.

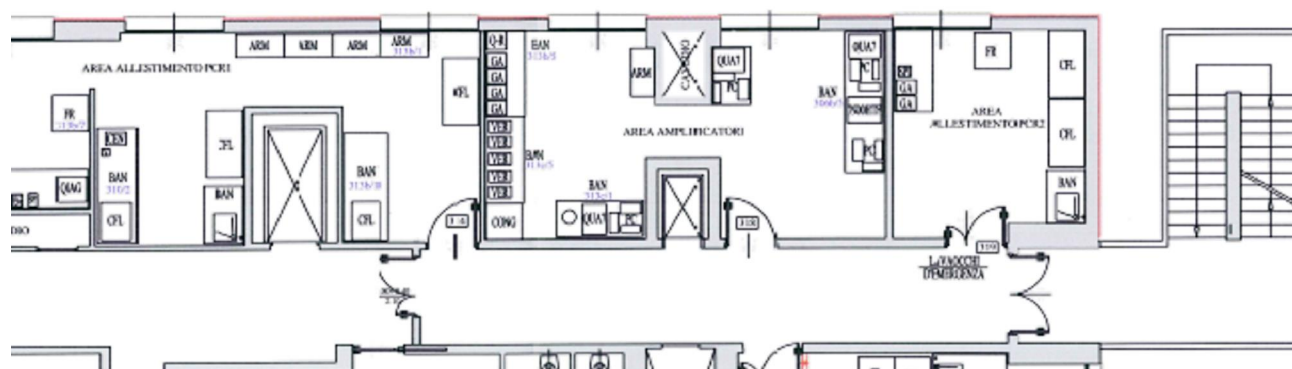
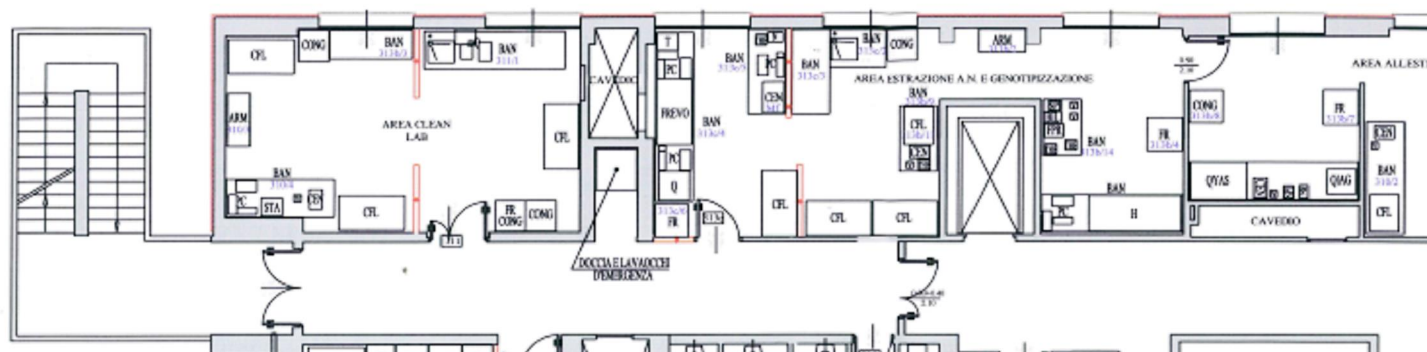






Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Pianta Laboratori Post operam





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie

