



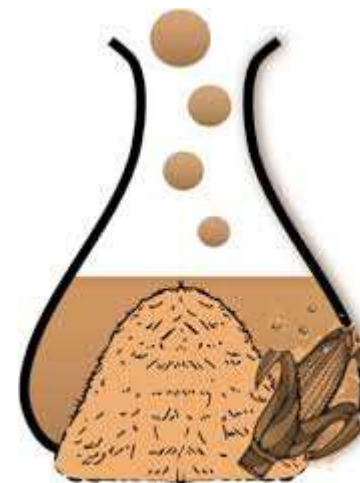
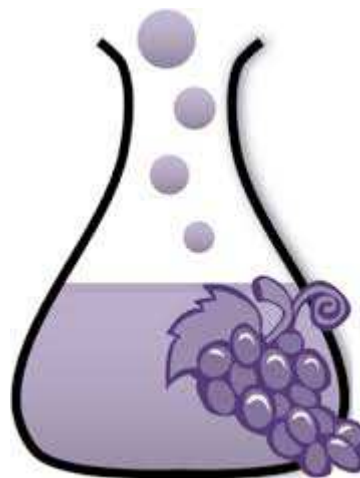
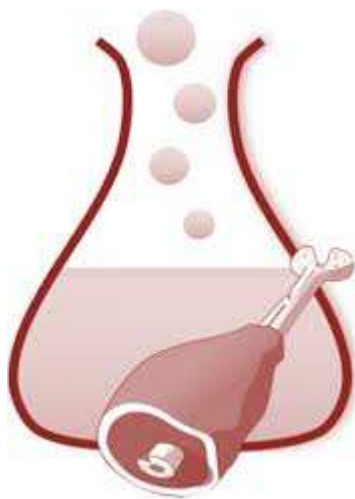
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

TRATTAMENTO MATRICI

ISTRUZIONI DI LAVORO

PREPARAZIONE/DECONTAMINAZIONE DI CAMPIONI

BIOLOGICI





Pretrattamento campioni e rischio biologico

Nell'area comune di diagnostica molecolare possono essere trasferiti solo
CAMPIONI DECONTAMINATI

Il pretrattamento/decontaminazione del campione biologico dovrà essere
eseguito presso le **strutture di provenienza del campione**

Le strutture dovranno

- adottare tutte le misure di **biosafety** e **biosecurity** necessarie
- gestire il **rischio biologico** per proteggere l'integrità del campione, la salute dei lavoratori e dell'ambiente dal momento in cui il campione originale viene ricevuto fino alla distruzione finale del materiale e/o al suo eventuale stoccaggio.





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

Campioni biologici e Agenti biologici (D.L. 9 aprile 2008 n.81)

Campione biologico

Qualsiasi matrice potenzialmente contaminata con un agente biologico

Agente biologico

Qualsiasi microrganismo (anche modificato geneticamente), coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie, intossicazioni

Gli agenti biologici sono classificati in 4 classi di pericolo sulla base delle seguenti caratteristiche

Trasmissibilità	capacità di essere trasmesso da infetto a suscettibile
Infettività	capacità di penetrare e moltiplicarsi nell'ospite
Patogenicità	capacità di produrre malattia a seguito di infezione
Neutralizzabilità	disponibilità di misure profilattiche e/o terapeutiche



Classi di pericolo degli agenti biologici (art 268 allegato XLVI D.L. 9 aprile 2008 n.81)

- **Agente biologico di classe 1:** un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani.
- **Agente biologico di classe 2:** un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.
- **Agente biologico di classe 3:** un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.
- **Agente biologico di classe 4:** un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.





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

Biosafety and Biosecurity

(OIE manual chapter 1,1,4 A: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratories and animal facilities)

Biosafety

descrive i principi e le pratiche per la prevenzione del rilascio accidentale o dell'esposizione accidentale ad agenti biologici e tossine

Biosecurity

descrive il controllo fisico di agenti biologici e tossine all'interno dei laboratori, al fine di prevenire la loro perdita, furto, uso improprio, accesso non autorizzato o rilascio intenzionale non autorizzato.



Rischio biologico

(OIE manual chapter 1,1,4 B: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratories and animal facilities)

Rischio

Combinazione della possibilità (probabilità) del verificarsi di un evento e della gravità del danno prodotto (o delle sue conseguenze).

Rischio biologico

Il termine rischio biologico è usato quando la fonte del danno è un agente biologico o una tossina





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

PG SPP 003

Applicazione dei principi di biosicurezza e autovalutazione del rischio biologico

Misure generali di biosicurezza da adottare presso l'IZSLT

- Classi di pericolo degli agenti biologici
- Documenti: Manuale biosicurezza IZSLT e PG/POS di struttura (PG DIG006, PG DMV004, PG ACC004, PG ACC001, PG ACC002, PG ACC003, PG ACC009, PG QUA008)
- Paragrafo 4.1 Agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 2
- Paragrafo 4.2 Agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 3
- Paragrafo 4.2.2 Matrici potenzialmente contaminate da agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 3 o 2 che richiedono particolari precauzioni per la manipolazione.

Autovalutazione del rischio biologico





PG SPP 003

Par 4.1 Misure generali di biosicurezza da adottare per gli agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 2

- Buone pratiche di laboratorio
- Manuale della biosicurezza IZSLT
- D.L. 81/2008: classificazione agenti biologici
- PG SPP 002: utilizzo dei DPI
- Procedure eliminazione dei campioni
- PG/POS di struttura qualora più specifiche e restrittive





PG SPP 003

Par 4.2 Misure generali di biosicurezza da adottare per gli agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 3

- Buone pratiche di laboratorio
- Manuale della biosicurezza IZSLT
- D.L. 81/2008: classificazione agenti biologici
- PG SPP 002: utilizzo dei DPI
- PG/POS di struttura qualora più specifiche e restrittive
- Elenco personale abilitato e aree di prova utilizzabili (PG SPP 003/1 e PG SPP 003/2)
- Elenco agenti biologici di classe 3 presenti nella struttura (PG SPP 003/6)
- Modulo prove in corso (PG SPP 003/3) – nel caso di manipolazione deliberata
- Registro attività (PG SPP 003/4) – nel caso di manipolazione deliberata



PG SPP 003

Par 4.2.2 Matrici potenzialmente contaminate da agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 3 o 2 che richiedono particolari precauzioni per la manipolazione

- Carcasse e campioni di primati non umani possibili serbatoi e portatori di agenti biologici di classe 3
- Campioni di primati umani con anamnesi riconducibili ad infezione da agenti biologici di classe 3
- Carcasse e campioni da animali provenienti da paesi a rischio per la presenza di agenti biologici di classe 3
- Carcasse e campioni sospetti o con anamnesi riconducibile a infezioni da agenti batterici di classe 3 (*Brucella spp.*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium TBC* etc) o agenti virali quali *Virus influenza aviaria* (sottotipi ad alta patogenicità), *virus West Nile*, *virus della rabbia*.
- Carcasse e campioni di specie di uccelli o mammiferi che possono generare aerosol e potrebbero esporre ad agenti trasmissibili per via aerogena (per gli uccelli: *Chlamydia psittaci*, *Cryptococcus neoformans*. Per i mammiferi *Histoplasma spp.*)
- Carcasse e campioni sospetti o con anamnesi riconducibile a TSE
- Feci di animali con anamnesi di infezione riconducibile a *Toxoplasma gondii*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*
- Campioni per la ricerca di tossine botuliniche



PG SPP 003

Par 4.2.2 Matrici potenzialmente contaminate da agenti biologici classificati nel gruppo di pericolo 3 o 2 che richiedono particolari precauzioni per la manipolazione

- Indicazione della possibile presenza di uno specifico agente biologico di classe 3 o indicazione di pericolo
- Aree di prova dedicate
- Permanenza nelle aree di prova ridotta al minimo
- Utilizzo cappa a flusso laminare di classe II
- Utilizzo di DPI (camice, doppi guanti, mascherina filtrante FFP3 e occhiali di protezione)
- Comunicazione del pericolo in caso di positività
- Gestione per il trasferimento del materiale
- Inattivazione materiale prima dello smaltimento
- PG/POS di struttura qualora più specifiche e ristrette





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

PG SPP 003

Autovalutazione del rischio biologico

Autovalutazione del rischio biologico

L'autovalutazione del rischio biologico comporta i seguenti step:

- 1) Identificazione delle attività/processi che espongono al rischio biologico.
- 2) Determinazione della probabilità di esposizione ad un rischio biologico.
- 3) Attribuzione della fascia e del livello di rischio per processo/attività.





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

PG SPP 003

Autovalutazione del rischio biologico.

1) Identificazione delle attività/processi che espongono al rischio biologico



- Lavorazione e gestione di matrici biologiche potenzialmente contaminate da agenti biologici comprese le matrici indicate nella PG SPP 003 par 4.2.2



- Manipolazione deliberata di agenti biologici classificati nel gruppo di rischio 2 o 3





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

PG SPP 003

Autovalutazione del rischio biologico.

2) Determinazione della probabilità di esposizione ad un rischio biologico

$$P = C \times (F1 + F2 + F3 + F4 + F5 + F6 + 1) / 7$$

C: livello categorizzato di contaminazione
(considerando il livello massimo di contaminazione) per le varie categorie e tipologie di possibili fonti di esposizione (PG SPP 003/8, colonna codificata con lettera C)

Fattori F 1-6: fattori/fasi legate all'organizzazione del lavoro

F1 fattore quantità

F2 frequenza di contatto

F3 caratteristiche strutturali degli ambienti di lavoro

F4 buone pratiche di laboratorio e norme di igiene

F5 formazione all'uso dei DPI e loro disponibilità

F6 formazione sul rischio biologico dei lavoratori esposti



Autovalutazione del rischio biologico

3) Attribuzione della fascia e del livello di rischio per processo/attività

$$R = P \times D$$

P: probabilità di esposizione al rischio biologico

D: livello di gravità del possibile evento dannoso

I valori di D (modulo PG SPP 003/8, colonna codificata con lettera D), sono stati attribuiti per ognuna delle categorie e tipologie di fonti di esposizione, considerando gli agenti biologici a cui la categoria espone in funzione della classe di pericolo secondo la classificazione del rischio infettivo di cui all'allegato XLVI del D. Lgs. n.81/2008

La gestione del rischio va modulata in funzione del livello di rischio ottenuto

Valore R	Fascia di rischio	Livello di rischio
$0 < R \leq 1$	E	Non rilevante
$1 < R \leq 3$	D	Basso
$3 < R \leq 6$	C	Medio
$6 < R \leq 9$	B	Alto
$9 < R \leq 16$	A	Elevato





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

Pretrattamento campioni e rischio biologico

Aree di lavoro

Livelli di biosicurezza dei laboratori

(Manuale di biosicurezza nei laboratori ISPSEL III edizione)

L'assegnazione del livello di Biosicurezza tiene conto delle caratteristiche strutturali del laboratorio, delle capacità di contenimento, delle attrezzature disponibili, delle attività svolte e delle procedure operative ritenute necessarie per lavorare con agenti appartenenti ai vari gruppi di rischio.

L'assegnazione del livello di Biosicurezza per un particolare lavoro deve derivare da un giudizio professionale basato su una valutazione del rischio, piuttosto che essere fatta automaticamente in base al gruppo di rischio cui l'agente patogeno che si intende usare appartiene





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

Pretrattamento campioni e rischio biologico

Aree di lavoro

Livelli di biosicurezza dei laboratori

(Manuale di biosicurezza nei laboratori ISPSEL III edizione)

Livello di Biosicurezza	Tipo di Laboratorio	Pratiche	Attrezzature
Base Livello 1	Insegnamento di base, ricerca	Buona pratica di laboratorio	Nessuna, banco da lavoro
Base Livello 2	Diagnostica di base, ricerca	Buona pratica di laboratorio più Dispositivi di protezione Individuali (DPI) e segnale di pericolo	Banco da lavoro più Cappe di sicurezza per le procedure che producono aerosol
Contenimento Livello 3	Diagnostica specialistica, ricerca	Come Livello 2 più DPI speciali, accesso controllato, ventilazione senza ricircolo	Cappe di sicurezza per tutte le procedure
Massimo contenimento Livello 4	Patogeni pericolosi	Come Livello 3 più ingresso autorizzato, doccia di decontaminazione, adeguato sistema di smaltimento dei materiali monouso come rifiuti	Cappe di sicurezza di classe III (glove-box) o Tute pressurizzate con Cappe di classe II, più autoclave passante e sistema di ventilazione con filtri assoluti



Pretrattamento campioni e rischio biologico

Aree di lavoro

art 275 D.L. 9 aprile 2008 n.81

Nei laboratori che trattano materiali con sospetta contaminazione da agenti biologici patogeni (sangue, fluidi corporei, tessuti) per l'uomo e nei locali destinati ad animali da esperimento possibili portatori di tali agenti debbono essere adottate misure corrispondenti ad almeno il secondo livello di contenimento

PG SPP 003

Nelle attività gestite presso l'IZSLT, non essendo presente un laboratorio BSL3 le manipolazioni deliberate di agenti biologici classificati nei gruppi di pericolo 3 si riferiscono sempre a piccole quantità di agente biologico, strettamente necessarie per gestire una specifica attività di laboratorio e non si tratta mai di produzioni su larga scala (es. produzioni considerevoli di vaccini, di reagenti e di tossine di agenti biologici, ecc.)

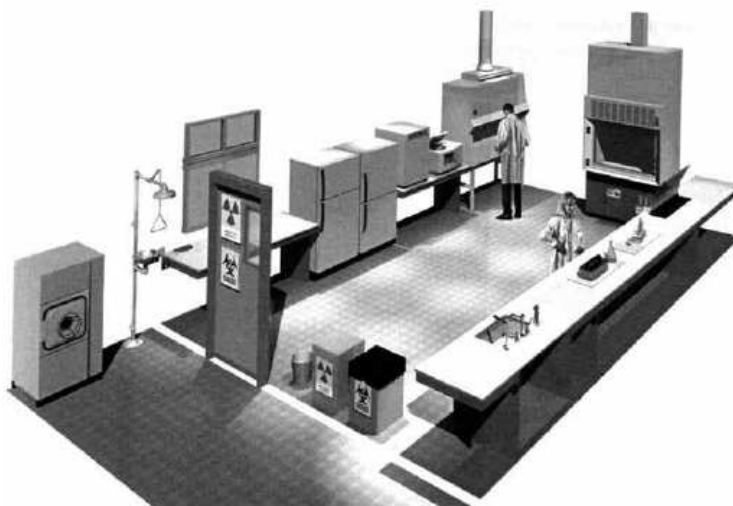


Laboratorio di biosicurezza di livello 2 (BSL 2) (Manuale di biosicurezza nei laboratori ISPSEL III edizione)

Tutte le operazioni di pretrattamento/decontaminazione del campione andranno eseguite in un laboratorio BSL2, nelle aree di lavoro dedicate all'attività di estrazione e sotto cappa a flusso laminare di classe II.

Figura 3. Un laboratorio di Biosicurezza di livello 2

(figure gentilmente fornite da CUH2A, Princeton, NJ, USA). Le procedure che comportano aerosol vengono effettuate sotto cappa di sicurezza biologica. Porte sono tenute chiuse ed è apposta l'indicazione di rischio biologico. Rifiuti potenzialmente contaminati sono separati dagli altri rifiuti.



Pretrattamento campioni a rischio biologico

Estrazione degli acidi nucleici



La prima fase di un protocollo di biologia molecolare è l'estrazione degli acidi nucleici dal campione biologico.

L'estrazione degli acidi nucleici rappresenta un momento delicato del processo

- da essa dipende la buona riuscita delle fasi successive di indagine
- comporta la gestione di campioni a rischio biologico



Decontaminazione e pretrattamento campioni

Due facce della stessa medaglia

- Pretrattamento

Pretrattare il campione per migliorare la resa nel processo di estrazione degli acidi nucleici soprattutto per matrici biologiche complesse, per batteri/ parassiti intracellulari o presenti a basse concentrazioni

- Decontaminazione

Neutralizzare l'infettività del microrganismo in modo da poterlo trasferire nell'area comune di diagnostica molecolare.



IL pretrattamento/decontaminazione campioni biologici

Le IL per la preparazione/decontaminazione dei campioni biologici sono state redatte con la collaborazione di tutte le strutture afferenti all'area comune di diagnostica molecolare

Saranno adottati protocolli di pretrattamento/decontaminazione diversi a seconda

- della tipologia del campione biologico di partenza
- dell'agente biologico ricercato o potenzialmente presente.

I protocolli di pretrattamento saranno maggiormente incidenti

- per matrici particolarmente complesse
- in caso di ricerca di microrganismi intracellulari





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Campioni biologici

Ceppi batterici isolati e brodocolture

Organi e tessuti animali

Fluidi biologici e tamponi da fluidi biologici

Feci e contenuto intestinale

Latte panna sedimento matrici casearie

Sangue/buffy coat

Flebotomi e zanzare

Zecche

Ape e Detriti fondo arnia

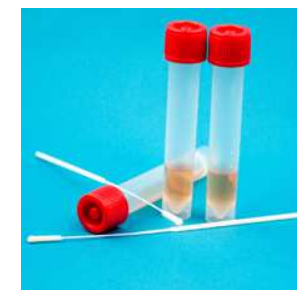
Zucchero a velo

Larva coleottero di *Aethina tumida*

Favo con e senza miele

Terra

Pesci



IL pretrattamento/decontaminazione matrici

Qualunque sia il campione di partenza, i protocolli di pretrattamento/decontaminazione prevedono due fasi principali e comuni

- 1) omogenizzazione del campione
- 2) digestione con la proteinasi K in adeguati buffer di reazione

Il risultato del processo sarà un campione omogeneo e non infettivo che potrà essere trasferito nell'area comune di diagnostica molecolare e che verrà utilizzato nelle fasi successive di estrazione degli acidi nucleici



1) Omogenizzazione del campione

Manuale

Pestello e mortaio in ceramica



Meccanico a sistema aperto

Stomacher

Meccanico a sistema chiuso

Tyssuelyser II (Qiagen)

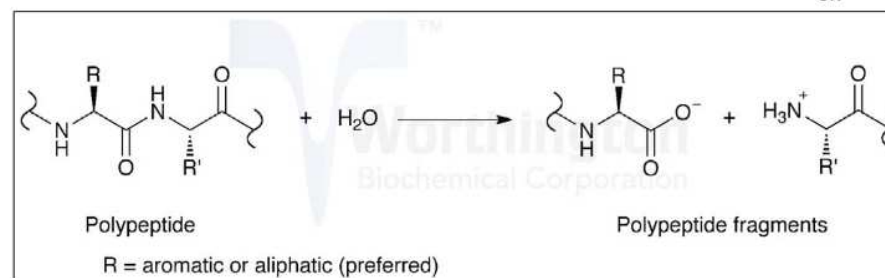
Fast Prep



2) Digestione del campione

Proteinasi K

Serin proteasi ad ampio spettro



- Taglia il legame adiacente ad un residuo alifatico o aromatico
- Digerisce in maniera aspecifica le proteine contaminanti presenti nel campione
- Inattiva le nucleasi DNAsi e RNAsi preservando gli acidi nucleici.
- E' stabile in un ampio intervallo di valori di PH (4,5- 12)
- Agisce da 25°C a 65°C (di solito utilizzata a 56°C)
- Non viene inibita da i reagenti comunemente utilizzati durante l'estrazione degli acidi nucleici



Strumentazione

Tutta la strumentazione necessaria al pretrattamento del campione dovrà essere dedicata a tale attività.

Omogenizzazione del campione

Bilancia

Stomacher

Tissue Lyzer II (Qiagen)

Fast Prep

Cappa a flusso laminare di classe 2

Digestione con proteinasi K

Thermomixer con thermoblocco da 1,5ml e da 2 ml

Centrifuga refrigerata da banco

Micropipette a volume variabile

Vortex/ Spinner



Materiali di consumo e Reagenti

Materiali di consumo

Buste presto chiuse

Provette di polipropilene a fondo conico da 1,5 ml e 2 ml a scatto o a vite

Tubo bead beating (Lysing matrix A, Lysing matrix D)

Puntali con filtro per micropipette a volume variabile

Sfere in acciaio

Pinzette, forbici, pinze, setaccio e cucchiaio in acciaio autoclavabili

Piastre per batteriologia



Reagenti

Proteinasi K (concentrazione 200 µg/ml)

Buffer di reazione

H₂O nucleasi free /DEPC

Soluzione fisiologica /PBS





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

IL trattamento matrici

UOC D.O. Diagnostica generale

- Estrazione del DNA da matrici animali (polmone, milza, encefalo, linfonodi, placenta, utero, cuore, fegato)
- Estrazione del DNA da fluidi biologici (contenuto del IV stomaco, essudati, liquido articolare)
- Estrazione del DNA da feci e contenuto intestinale
- Estrazione del DNA da tampone di fluidi biologici
- Estrazione del DNA da latte, panna e sedimento per ricerca *Brucella spp.*
- Estrazione del DNA da brodocolture batteriche
- Estrazione del DNA da colture batteriche





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

IL trattamento matrici

UOS Igiene delle Produzioni del Latte

- Estrazione del DNA da latte
- Estrazione del DNA da matrici casearie (solide e liquide)
- Estrazione del DNA da brodocolture batteriche (e da tamponi ambientali)
- Estrazione del DNA da colture batteriche



IL trattamento matrici

UOC D.O. Virologia e UOC D.O. Sierologia

- Estrazione del DNA/RNA da sangue/buffy coat utilizzando il QIAcube e il Qiasymphony (campione diluito 1:2)
- Estrazione del DNA/RNA da sangue/buffy coat utilizzando il QIAxtractor (QIAcube HT) (campione diluito 1:4)
- Estrazione del DNA/RNA da tessuti
- Estrazione dell'RNA da organi in caso di preparazioni particolari
- Estrazione del DNA da matrice organo in caso di preparazioni particolari
- Estrazione del DNA da tamponi biologici
- Estrazione del DNA da matrice feci
- Estrazione del DNA/RNA da flebotomi e zanzare
- Estrazione del DNA da zecche





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

IL trattamento matrici

UOC D.O. Virologia e UOC D.O. Sierologia

settore Apicoltura

- Estrazione dell'RNA da matrice api
- Estrazione del DNA da matrice api
- Estrazione del DNA Nosema spp. Da matrice api
- Estrazione dell'RNA da matrice detriti fondo arnia
- Estrazione del DNA da matrice detriti fondo arnia
- Estrazione dell'RNA da matrice zucchero a velo
- Estrazione del DNA da matrice zucchero a velo
- Estrazione del DNA da matrice larva/coleottero di *Aethina tumida*
- Estrazione del DNA/RNA da matrice favo con o senza miele per la ricerca di patogeni (insetti, protozoi, virus, batteri, funghi)
- Estrazione del DNA da terra per la ricerca di coleotteri patogeni delle api





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

IL trattamento matrici

UOC D.O. Virologia e UOC D.O. Sierologia settore Ittiopatologia

- Estrazione del DNA da matrice organi per trota
- Estrazione dell'RNA da matrice organi per carassi (*Cyprinus carpio* e suoi ibridi quali *Cyprinus carpio* x *Carassius auratus*) per la ricerca dell'Herpesvirus della carpa coi
- Estrazione dell'RNA da matrice tamponi di branchie per carassi (*Cyprinus carpio* e suoi ibridi quali *Cyprinus carpio* x *Carassius auratus*) per la ricerca dell'Herpesvirus della carpa coi





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

IL trattamento matrici

UOC D.O. Virologia e UOC D.O. Sierologia

settore matrici biologiche

- Estrazione del DNA da matrice colostro
- Estrazione del DNA da organi/tessuti mantenuti in formalina





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

THAT'S ALL FOLKS



Grazie per l'attenzione

