LINEA GUIDA
SERVIZIO "CENTRO LAVAGGIO VETRERIA E SOLUZIONI"

SOMMARIO

1. SCOPO 2
2. FONTI E NORME DI RIFERIMENTO 2
3. ACRONIMI E SIGLE 2
4. AMBITI DI RIFERIMENTO DELLA LINEA GUIDA 2
   4.1. AMBIENTE 2
   4.2. RISORSE UMANE E RUOLI 3
   4.3. STRUMENTI 3
   4.4. MATERIALI 5
   4.5. METODI 5
      4.5.1. PREPARAZIONE SOLUZIONI E TERRENI DI CRESCITA 5
      4.5.2. RACCOLTA, LAVAGGIO, ASCIUGATURA E CONFEZIONAMENTO DEL MATERIALE DA TRATTARE 5
      4.5.3. STERILIZZAZIONE 6
         4.5.3.1. SOLUZIONI 6
         4.5.3.2. VETRERIA E PLASTICHERIA 7
      4.5.4. CONSERVAZIONE DEGLI OGGETTI PULITI 7
      4.5.5. RIFIUTI 7
5. MODULISTICA 7
6. SERVIZI INTERNI ED ENTI PUBBLICI A CUI FARE RIFERIMENTO 8
7. AUTORI E REVISORI 8
   7.1. GRUPPO REDATTORE 8
   7.2. COLLABORATORI 8
   7.3. REVISORI 8

Revisioni

Ed.	*Data*	*Descrizione modifica*	*Autore della modifica*	*Approvazione*

0	28.06.2013	EDIZIONE PER PUBBLICAZIONE	Digilio A.[(1)], Lacerra G.[(1)], Barra A.[(1)], Lanati A.[(2)], Liguori G.L.[(1)] *(1) qPMO-LdA1, IGB-CNR* *(2) Consulente VQ*	**qPMO-LdA1, IGB-CNR**
Ed.	*Data*	*Descrizione*	*Gruppo di redazione*	*Approvazione*

1. SCOPO

Di seguito sono riportate le linee guida per fornire al centro lavaggio e soluzioni (CLVS) una guida operativa sulla preparazione di terreni, soluzioni e materiale di laboratorio di ricerca in biologia (pulito e sterile), stilate in base alle indicazioni di opportune fonti, e per permettere ai ricercatori-utenti di interfacciarsi con il servizio in maniera corretta.

2. FONTI E NORME DI RIFERIMENTO

LG: Redazione di linee guida per un laboratorio di ricerca scientifica secondo i principi della qualita'. Lacerra G, Digilio FA, Lanati, A, Liguori GL. Edizione 0 del 11.03.2013

J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Decreto legislativo 12 aprile 2001 n.206

Testo unico Decreto Legislativo 81/08 e successive modifiche

3. ACRONIMI E SIGLE

Acronimo	Significato
CLVS	Centro Lavaggio Vetreria e Soluzioni
LdA1	Linea di attività
LG	Linea Guida
UV	UltraVioletti
qPMO	quality Project Management Open-Lab
VQ	Valore Qualità

4. AMBITI DI RIFERIMENTO DELLA LINEA GUIDA

4.1. AMBIENTE

Il laboratorio del Servizio CLVS deve essere adeguato ad assicurare le corrette operazioni di lavaggio, preparazione, confezionamento, stoccaggio e controllo del materiale.

Organizzazione

E' consigliabile che gli spazi all'interno del servizio siano suddivisi in base alle modalità operative e che ogni area abbia la propria specifica destinazione d'uso:

- locale lavaggio e sterilizzazione, dove sono presenti le macchine per il lavaggio, l'asciugatura e la sterilizzazione, ed un piano di lavoro di materiale inerte, resistente, di facile pulizia e disinfezione;
- locale preparazione soluzioni, dove è presente una cappa chimica corredata di bilancia, pHmetro, agitatore magnetico, ed un piano di lavoro di materiale inerte, resistente, di facile pulizia e disinfezione;
- locale di stoccaggio, dove sono conservate le soluzioni preparate e tutto il materiale in uso al servizio;
- armadi dove riporre la vetreria pulita, dislocati in vari punti in Istituto, sotto la responsabilità del sevizio CLVS, dove l'utenza può accedere liberamente.

Pulizie

La pulizia dei locali del Servizio CLVS deve avvenire regolarmente secondo procedure che garantiscano la massima igiene possibile ed è a carico dell'Istituto.

Le operazioni di pulizia di piani di lavoro e macchine sono a carico del personale operatore del Servizio CLVS.

Per la pulizia, quotidiana o all'occorrenza, dei piani di lavoro e dei lavandini possono essere utilizzati: alcool denaturato, alcool al 70%, candeggina diluita almeno al 10% o detergenti specifici.
Alla fine della propria attività ogni unità di personale è tenuta a lasciare in ordine e puliti i locali.

4.2. RISORSE UMANE E RUOLI

Per la gestione ottimale del servizio CLVS è opportuno individuare figure professionali dedicate alle specifiche mansioni.

Responsabile generale: è il Direttore dell'Istituto. Ha il compito di definire gli obiettivi del Servizio CLVS, assicurare le risorse necessarie per raggiungere e mantenere il livello di qualità stabilito, individuare il coordinatore del servizio e il personale dedicato.

Coordinatore: è designato dal Direttore e ha il compito di coordinare le attività che si svolgono nell'ambito del servizio, coadiuvare il personale dedicato nella gestione degli approvvigionamenti, regolamentare l'utilizzo del servizio da parte degli utenti. Il coordinatore va contattato ogni qual volta si verificano problemi attinenti al servizio e per pianificare la normale funzionalità dello stesso.

Tecnico-operatore: è il personale addetto al servizio. Ha il compito di ritirare, lavare, confezionare e sterilizzare materiale di laboratorio, nonché quello di preparare terreni e soluzioni, programmare e gestire le operazioni di pulizia delle apparecchiature presenti e dei piani di lavoro, gestire e pianificare acquisti in supporto al coordinatore, garantire la manutenzione di apparecchi e attrezzature avvalendosi del servizio tecnico di Istituto. Il tecnico-operatore deve essere adeguatamente formato e addestrato per l'uso delle apparecchiature del servizio e per la preparazione delle soluzioni. La qualità di soluzioni e terreni preparati nel servizio deriva dalla capacità e dalla specifica competenza del lavoratore addetto, il quale, pertanto, va incoraggiato ad approfondire le proprie conoscenze seguendo corsi di aggiornamento e seminari specifici, disponendo di testi scientifici e pubblicazioni tecniche che gli consentano una continua informazione e ricorrendo, se necessario, alla consultazione e al confronto con colleghi già esperti e/o con ricercatori dell'Istituto.

Utenti: ricercatori, tecnici e formandi (studenti, specializzandi, borsisti, dottorandi, ecc) afferenti all'Istituto.

4.3. STRUMENTI

Autoclave, lavavetreria, stufa per asciugare, stufa per sterilizzare

E' opportuno che queste apparecchiature siano utilizzate esclusivamente dal personale tecnico-operatore addetto al servizio CLVS, adeguatamente formato e addestrato.
E' bene assegnare ad ogni autoclave un numero identificativo, e fornirla di un foglio di lavoro (Modulo 1) sul quale il personale utilizzatore è tenuto a registrare ogni ciclo.
I manuali di istruzioni per l'uso delle attrezzature devono essere disponibili con la relativa documentazione di manutenzione e di convalida e archiviati in modo ben identificato.
Pulizia e cura sono a carico del personale tecnico del servizio. I filtri di scarico delle autoclavi e delle macchine lavavetrerie vanno puliti regolarmente a cadenza settimanale e/o quando necessario (Modulo 2). Eventuali pezzi di nastro da autoclave (nastro indicatore di sterilizzazione) che si staccano dalle bottiglie durante il lavaggio e che aderiscono alle pareti delle lavavetreria vanno rimossi dopo ogni utilizzo. È opportuna una pulizia peridodica delle stufe (Modulo 3).

La manutenzione è a carico del servizio tecnico di Istituto che può avvalersi di personale qualificato di ditta esterna, con registrazione dati, data e firma (Modulo 4); è consigliabile una manutenzione generale annuale con sostituzione dei componenti usurabili, con registrazione dati, data e firma, su apposito Modulo fornito dalla ditta.

Piccola strumentazione: bilancia, agitatore, piastra riscaldante con pentola a pressione.

Vanno allocati su banchi opportuni, come suggerito dalle specifiche dello strumento. Se previsto, e previo accordo con il personale tecnico del servizio, possono essere utilizzati da personale esterno al servizio.
Pulizia e cura sono a carico del servizio tecnico del servizio, che utilizzerà detergenti specifici o alcool denaturato. Personale esterno al servizio che utilizza questi strumenti è tenuto a lasciarli puliti.
Gli strumenti di misura devono essere periodicamente e regolarmente controllati e calibrati secondo specifici programmi di uso e di manutenzione (Modulo 4). Sono opportune anche semplici procedure di verifica dello strumento prima di ogni utilizzazione e una calibrazione annuale da parte di ditta esterna con registrazione dati, data e firma, su apposito Modulo fornito dalla ditta.

Cappa chimica

Sotto cappa chimica sono posizionati un pHmetro, una bilancia e un agitatore. Se previsto, può essere utilizzata da personale esterno al servizio CLVS. Ogni utente è tenuto a registrare le proprie operazioni (Modulo 5), a non lasciare proprio materiale sotto cappa e a lasciare pulita e ordinata la postazione a fine attività.
La manutenzione della cappa chimica è a carico del servizio tecnico di Istituto che può avvalersi di personale qualificato di ditta esterna, con registrazione dati, data e firma (Modulo 4). E' consigliabile un controllo semestrale del flusso di aspirazione delle cappe. Gli strumenti di misura devono essere periodicamente e regolarmente controllati e calibrati secondo specifici programmi di uso e di manutenzione (Modulo 4); sono opportune anche semplici procedure di verifica dello strumento prima di ogni utilizzazione e una calibrazione annuale.
Le manutenzioni da parte di ditte esterne con registrazione dati, data e firma, deve essere attestata su apposito Modulo fornito dalle ditte.

Cappa a flusso laminare orizzontale

E' prevista per la preparazione di piastre di batteriologia e per l'apertura in asepsi di soluzioni. Deve essere corredata di opportuno becco Bunsen di sicurezza per microbiologia a fiamma abbassata.
Se previsto, può essere utilizzata da personale esterno al servizio CLVS solo per la preparazione in sterilità di soluzioni, mezzi di crescita e piastre. Ogni utente è tenuto ad attenersi alle regole della manipolazione in asepsi, a registrare le proprie operazioni (Modulo 6), a non lasciare proprio materiale sotto cappa e a lasciare pulita e ordinata la postazione a fine attività.
Per non ostacolare il flusso laminare è opportuno che durante l'utilizzo il materiale tenuto sotto cappa sia il meno possibile.
Le lampade UV possono essere accese su richieste specifiche per un minimo di 30 minuti e solo in assenza del personale del servizio. Si consiglia un'accensione con timer per un paio d'ore durante la notte e in assenza di personale.
Il ripiano va pulito da ogni utilizzatore alla fine del proprio lavoro con alcool al 70%.
La manutenzione è a carico del servizio tecnico di Istituto che si avvale di personale qualificato di ditta esterna, con registrazione dati, data e firma (Modulo 4); è consigliabile un controllo semestrale del filtro e del

flusso di aspirazione delle cappe. La manutenzione da parte di una ditta esterna con registrazione dati, data e firma, deve essere attestata su apposito Modulo fornito dalla ditta.

4.4. MATERIALI

Vetreria, plasticheria e materiali specifici per l'utilizzo delle macchine lavavetreria e per il confezionamento di vetreria e plasticheria, nastro adesivo indicatore sia di ciclo a vapore che di ciclo a secco, materiale necessario alla preparazione di soluzioni e terreni di crescita, puntali in busta che devono essere messi in opportuni contenitori. Sono acquistati dal coordinatore, coadiuvato dall'operatore.
In particolare, si consiglia:

- che il materiale di vetreria e plasticheria sia di proprietà dell'Istituto
- che i prodotti per le soluzioni siano ad uso biochimica o biologia cellulare e molecolare di qualità nota.

Detergenti: alcool denaturato, alcool al 70%, candeggina diluita almeno al 10%, addolcitori d'acqua, detergenti specifici per macchine lavavetreria e per la pulizia di ripiani e apparecchi.

4.5. METODI

4.5.1. PREPARAZIONE SOLUZIONI E TERRENI DI CRESCITA

L'operatore è tenuto alla preparazione, conservazione e consegna all'utenza di soluzioni e terreni di crescita stabilite sulla base di specifiche richieste. Sulla base di accordi di Istituto, il servizio può essere svolto a pagamento.
Per richieste specifiche, l'utenza può interfacciarsi con il servizio CLVS che le soddisferà secondo la propria disponibilità.
L'operatore dispone di opportuni protocolli per la preparazione di soluzioni e terreni di crescita e deve essere opportunamente formato.
Ogni operatore dispone di un proprio logo da apporre sulle soluzioni da lui preparate, insieme alla data della preparazione, per permettere una rintracciabilità del prodotto.
Soluzioni e terreni preparati dal servizio CLVS possono essere venduti all'utenza secondo un tariffario che è stabilito dal coordinatore annualmente sulla base della quotazione dei singoli prodotti.
La vendita è registrata mediante firma su appositi moduli (Modulo 7).

4.5.2. RACCOLTA, LAVAGGIO, ASCIUGATURA E CONFEZIONAMENTO DEL MATERIALE DA TRATTARE

I tecnici-operatori sono tenuti al ritiro della vetreria che troveranno in opportune vaschette nei singoli laboratori.
Gli utenti sono tenuti a sciacquare bene il materiale e mettere a lavare vetreria non contaminata da agenti biologici o chimici. In presenza di sporco, questo deve essere rimosso a mano; un accorgimento che facilita la rimozione dello sporco dalle superfici prevede un ammollo in soluzione liquida.
Per procedere al lavaggio, l'operatore si deve accertare dell'assenza di sporco e materiale organico su ogni pezzo da lavare. Devono essere cancellate eventuali scritte, eliminati nastri adesivi quando possibile prima di procedere alle tecniche di lavaggio. I tappi devono essere privati delle guarnizioni prima di essere lavati.
È cura dell'operatore disporre il materiale in modo adeguato nelle macchine lavavetreria.
Tutto il materiale lavato deve essere asciugato in modo da togliere tutti i residui di acqua. Dopo l'asciugatura ed essendosi accertato che il materiale sia pulito, integro e asciutto, l'operatore procede al confezionamento.
In base alle esigenze, il materiale può essere sterilizzato o direttamente riposto negli armadi.

Vetreria per uso dedicato

Nel caso di specifiche esigenze di Istituto per cui si richiede una vetreria dedicata, questa dovrà essere opportunamente siglata e processata a parte.
Il gruppo che lo richiede deve fornire opportune motivazioni al coordinatore del servizio e si fa carico della consegna della vetreria in vaschette opportunamente identificate e del ritiro delle stesse.

4.5.3. STERILIZZAZIONE

Il processo di sterilizzazione adottato deve essere adeguato per il tipo di prodotto.

4.5.3.1. SOLUZIONI

Autoclave

La sterilizzazione in autoclave viene effettuata solo su terreni e soluzioni che sopportano questo tipo di trattamento.
E' cura dell'operatore disporre adeguatamente il materiale da sterilizzare nell'autoclave, in modo da favorire una distribuzione omogenea della temperatura.
Le soluzioni che per proprie caratteristiche non possono essere sottoposte ad un trattamento di questo tipo, devono essere sterilizzate mediante membrane che trattengono i microrganismi e che hanno pori con un diametro nominale uguale o inferiore a 0,22 µm o a vapore fluente.
Soluzioni e terreni devono essere sterilizzate nei loro contenitori, mediante un'autoclave dedicata. Le condizioni di sterilizzazione sono quelle di riferimento della biologia molecolare (consigliato un ciclo a 121°C per 25 min che preveda un preriscaldamento). Per ogni ciclo di sterilizzazione deve essere disponibile la registrazione delle temperature, delle pressioni e dei tempi (Modulo 1).
I recipienti non devono essere riempiti fino all'orlo, per impedire al liquido di fuoriuscire a causa dell'ebollizione che si raggiunge durante la caduta di pressione. Le bottiglie non devono essere chiuse ermeticamente, in modo che l'aria presente nel liquido possa uscire liberamente.
Per tenere sotto controllo le condizioni di sterilizzazione, è consigliato applicare su ogni pezzo da sterilizzare strisce di apposito nastro da autoclave; può essere opportuno attuare un monitoraggio tramite adeguati marker biologici, tipo il test biologico BIOPACK, che permettono di verificare al meglio l'adeguatezza del processo di sterilizzazione.
Le soluzioni da miscelare dopo sterilizzazione devono essere ripartite asetticamente sotto cappa a flusso laminare orizzontale. Per operazioni in asepsi in apertura e chiusura di provette e recipienti è raccomandato un flambaggio, che si ottiene passando rapidamente sulla fiamma l'orlo dei recipienti che devono essere accuratamente richiusi successivamente. Ai fini della sterilità è importante che i tempi tra la preparazione e la ripartizione siano contenuti.

Vapore Fluente

Il vapore fluente è il vapore acqueo che si forma a pressione atmosferica ordinaria alla temperatura di 100°C. Distrugge germi patogeni ma non le spore per cui questo tipo di sterilizzazione è consigliata solo per prodotti che subiscono alterazioni con temperature superiori a 100°C, come il glucosio che tende a caramellare. Un sistema utilizzato per formare vapore fluente è la pentola a pressione con valvola aperta; al fondo della pentola viene posta dell'acqua, mentre gli oggetti sono poggiati in un cestello di rete metallica sospeso a qualche centimetro dall'acqua. A partire dalla fuoriscita di vapore, occorrono 30-60 minuti di bollitura. Per essere certi della sterilizzazione, è conveniente ripetere il trattamento altre due volte.

4.5.3.2. VETRERIA E PLASTICHERIA

I contenitori in vetro si possono sterilizzare in stufe a secco, mentre i materiali in gomma o in plastica che non sopportano temperature pari o superiori a 160°C, così come le bottiglie complete di tappo, si sterilizzano in autoclave.

Sterilizzazione a secco

La sterilizzazione a secco richiede 2 o più ore ad una temperatura pari o superiore a 160°C. Questa procedura si applica alla vetreria (bottiglie senza tappo, pipette di vetro, pipette Pasteur, tubi di batteriologia, beute con tappo di garza) in apposite stufe a secco.

Sull'apertura delle beute è consigliato confezionare un tappo con un foglietto di garza in cotone che avvolge una pallina di cotone idrofobo. Su questo tappo, così come sull'apertura delle bottiglie viene modellato un foglietto di carta argentata.

Le pipette di vetro vengono chiuse in contenitori di acciaio inox.

Poiché tappi e guarnizioni delle bottiglie mal sopportano le temperature a secco, le bottiglie vanno sterilizzate a secco senza tappo ma chiuse con foglietti di carta argentata.

E' consigliato applicare agli oggetti da sterilizzare pezzi di un apposito nastro adesivo che cambia colore in seguito all'esposizione alle alte temperature. Quello per autoclave non può essere utilizzato nelle stufe a secco, per le quali esiste un prodotto specifico, maggiormente resistente ad alte temperature.

Sterilizzazione in autoclave

Le condizioni di sterilizzazione devono essere quelle di riferimento della biologia molecolare (121°C per 20-25 min in autoclave). Per ogni ciclo di sterilizzazione deve essere disponibile la registrazione delle temperature, delle pressioni e dei tempi (Modulo 1).

E' cura dell'operatore disporre adeguatamente il materiale da sterilizzare nell'autoclave, in modo da evitare che in alcuni punti la temperatura non raggiunga i valori richiesti.

La sterilizzazione delle bottiglie va effettuata lasciando il tappo leggermente svitato per permettere al vapore di entrare nel contenitore. Il tappo delle bottiglie va fasciato in carta alluminio per permettere allo stesso una maggiore durata nel tempo.

I contenitori privi di un proprio tappo vanno chiusi con foglietti di carta di alluminio.

L'avvenuta sterilizzazione può essere verificata con apposito nastro da autoclave, che è consigliato applicare su ogni pezzo da sterilizzare.

4.5.4. CONSERVAZIONE DEGLI OGGETTI PULITI

Il materiale pulito va riposto in opportuni armadi dislocati in vari punti in Istituto, alla portata di tutta l'utenza.

4.5.5. RIFIUTI

Le scatole dei rifiuti solidi e le taniche dei rifiuti liquidi sono fornite dall'Ufficio di Prevenzione e Protezione dell'Istituto. Gli utilizzatori della cappa a flusso sono tenuti a chiudere bene la scatola dei rifiuti solidi, quando questa è piena e, sulla base di una programmazione riportata su opportuno modulo, a riporla fuori il giorno del ritiro dei rifiuti (Modulo 8).

La raccolta dei rifiuti in vetro o taglienti viene effettuata in appositi contenitori forniti dal servizio di fisica sanitaria. Il vetro non deve fuoriuscire dagli stessi e una volta riempiti vanno chiusi e posti nella scatola dei rifiuti solidi.

Vetreria rotta deve essere smaltita in opportune scatole fornite dall'Ufficio di Prevenzione e Protezione.

5. MODULISTICA

Modulo 1 Foglio di lavoro delle autoclavi CLVS

Modulo 2 Pulizia filtri autoclavi e macchine lavavetreria CLVS
Modulo 3 Pulizia apparecchiature CLVS
Modulo 4 Manutenzione apparecchiature CLVS
Modulo 5 Utilizzo cappa chimica CLVS
Modulo 6 Utilizzo cappa a flusso CLVS
Modulo 7 Vendita soluzioni e terreni CLVS
Modulo 8 Rimozione rifiuti CLVS

6. SERVIZI INTERNI ED ENTI PUBBLICI A CUI FARE RIFERIMENTO

Ufficio di Prevenzione e Protezione Responsabile …….. Telefono ……
Per scatole rifiuti solidi, contenitori per rifiuti taglienti, taniche per rifiuti liquidi.

Servizio di Supporto Tecnico Responsabile …….. Telefono ……
E' il personale addetto alla manutenzione degli strumenti presenti nel servizio e dei distillatori di acqua, al controllo del flusso di aspirazione delle cappe nonché al cambio filtri delle cappe, coadiuvato da personale esterno al Servizio. Deve essere contattato in caso di malfunzionamento degli strumenti e ha il compito di intervenire direttamente o di avvalersi di servizi esterni per risolvere il problema.

7. AUTORI E REVISORI

All'edizione per pubblicazione (versione 0) hanno contribuito i seguenti gruppi:

7.1. GRUPPO REDATTORE

qPMO-LdA1, IGB-CNR Napoli
F. Anna Digilio
Giuseppina Lacerra
Giovanna L. Liguori

Consulente VQ
Antonella Lanati

7.2. COLLABORATORI

IGB-CNR, Napoli
Aurora Quattromani, Rosaria Salvia, Danilo Maiello

7.3. REVISORI

qPMO
Marta Di Carlo, Antonella Bongiovanni (IBIM - CNR, Palermo)
Gianni Colotti (IBPM - CNR, Roma)
Annamaria Cirafici, Anna Mascia, Annamaria Kisslinger (IEOS - CNR, Napoli)

REVISORI ESTERNI
Sonia Levi (DiBIT – Ospedale San Raffaele, Milano)