



Organizzazione *UOC Laboratorio di microbiologia, banca biologica*

IOS 3.1 A PROCEDURE STANDARD PER LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Sommario

1	SCOPO	2
2	CAMPO DI APPLICAZIONE.....	2
3	RESPONSABILITÀ.....	2
4	MODALITÀ ESECUTIVE.....	2
4.1	Separazione siero o plasma	2
4.2	Separazione PBMC e congelamento	2
4.3	Congelamento biopsie e frammenti d'organo	3
4.4	Aliquotazione del sangue con anticoagulante	3
4.5	Aliquotazione Urine, BAL, Liquor o altri liquidi biologici	4
4.6	Ceppoteca microbiologica.....	4



Organizzazione *UOC Laboratorio di microbiologia, banca biologica*

IOS 3.1 A PROCEDURE STANDARD PER LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1 SCOPO

In questo documento vengono descritte le procedure standard di preparazione dei campioni biologici. Quanto descritto va considerato come integrazione delle procedure generali.

2 CAMPO DI APPLICAZIONE

Banca Biologica

3 RESPONSABILITÀ

Operatore tecnico: Esecuzione delle procedure secondo quanto descritto nella presente IOS.

Dirigente: Verifica la corretta esecuzione delle procedure. E' responsabile delle modifiche e degli aggiornamenti. Può in casi di emergenza eseguire egli stesso le procedure.

4 MODALITÀ ESECUTIVE

4.1 Separazione siero o plasma

1. Centrifugare il sangue EDTA a 1500 rpm per 10 min. Siero tappo giallo 2800/3000 rpm
2. Raccogliere il siero o il plasma e distribuirlo in aliquote da 1.8 ml. Se ci sono aliquote di volume inferiore allo standard, verrà annotato sulle note dell'accettazione.

4.2 Separazione PBMC e congelamento

1. Dopo aver centrifugato il sangue per ottenere il plasma, e dopo aver raccolto ed aliquotato il plasma (vedi sezione 4.1), aggiungere alla parte corpuscolata rimasta nella provetta originale un egual volume di RPMI, in modo da diluire la restante parte di sangue 1:2
2. Mescolare delicatamente per uniformare la sospensione e prelevarla con una pipetta, dopo di che stratificarla delicatamente su uno strato di Ficoll contenuto nelle provette con filtro (1 parte di Ficoll e 2 parte di sospensione).
3. Centrifugare 10 minuti a 2000 rpm **senza utilizzare il freno**
4. Raccogliere con una pipetta l'anello che si dispone all'interfaccia tra Ficoll e plasma-RPMI, contenente i PBMC, e trasferirlo in una nuova provetta. Fare attenzione a non prendere Ficoll, altrimenti i PBMC non sedimentano nelle fasi seguenti. Aggiungere RPMI fino a circa 10 ml finali



Organizzazione UOC Laboratorio di microbiologia, banca biologica

IOS 3.1 A PROCEDURE STANDARD PER LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

5. La sospensione di PBMC va centrifugata (da ora in poi si può utilizzare il freno) per circa 10 min a 1600 rpm.
6. Dopo il lavaggio eliminare il supernatante e risospendere il pellet ottenuto in RPMI, nel volume di sangue iniziale
7. Contare le cellule ottenute (per la conta preparare il colorante **Turk**, prendere 20 µl di campione e 20 µl di colorante e contare su vetrino (diluizione 1:2). Perché la conta sia attendibile devono essere contate almeno 100 cellule per campo (9 quadrati). In caso di un numero di cellule inferiore a 100 per campo, è necessario contare un secondo campo (distante dal primo), e calcolare la media matematica delle due letture.
8. La concentrazione di cellule per ml si calcola con la seguente formula: **n° di cellule su 1 campo** (o media matematica di 2 campi) **x diluizione** (2 nel nostro caso) **x 10.000** (fattore di moltiplicazione fisso della camera).
9. Abitualmente la concentrazione di PBMC risulta intorno a 1-1,2 milioni/ml
10. Risospendere le cellule a circa 6 milioni/ml o secondo richieste specifiche, in terreno di congelamento (siero fetale freddo contenente il 10% di DMSO), tenendo il tutto in ghiaccio.
11. Congelare i PBMC mediante apposito criocontenitore contenente isopropanolo. Il contenitore al momento dell'utilizzo deve avere una temperatura vicina a 0°C (normalmente +4°C). Una volta posizionate le provette nel contenitore, quest'ultimo viene posizionato in un congelatore -80°C e lasciato overnight.
12. Al termine del processo di congelamento mettere le provette nel criocontenitore in azoto.
13. Se è richiesto il pellet di PBMC anziché la sospensione vitale, dopo la conta la sospensione viene trasferita nelle criovial a fondo conico trasparenti, e centrifugata 2 minuti a 11000 rpm in microcentrifuga da tavolo.
14. Scartare il supernatante e congelare direttamente a -80 °C in posizione definitiva.

4.3 Congelamento biopsie e frammenti d'organo

Le biopsie epatiche arrivano in soluzione fisiologica a freddo in contenitore sterile basso. Essa viene pescata con l'aiuto di un puntale di micropipetta sterile, e trasferita a secco nella criovial. La provetta viene direttamente trasferita a -80°C in posizione definitiva.

Le biopsie più voluminose, epatiche o di altri organi (cuore, milza, linfonodi, rene), e i frammenti d'organo prelevati durante interventi chirurgici o autopsie, giungono in contenitori sterili mantenuti a freddo. I campioni vengono sezionati in due o più parti (a seconda delle dimensioni), utilizzando procedure asettiche e evitando per quanto possibile l'uso di bisturi, sostituendo questi ultimi con forbici sterili mono-uso. Le aliquote così ottenute vengono poste in criovial per la conservazione a -80°C.

4.4 Aliquotazione del sangue con anticoagulante

1. Fare aliquote da 1.8 ml di sangue prestando attenzione a mescolare il sangue subito prima dell'aliquotazione.
2. Riporre preferibilmente a -80°C



Organizzazione *UOC Laboratorio di microbiologia, banca biologica*

IOS 3.1 A PROCEDURE STANDARD PER LA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

4.5 Aliquotazione Urine, BAL, Liquor o altri liquidi biologici

3. Fare aliquote da 1.8 ml
4. Riporre a -80°C

4.6 Ceppoteca Microbiologica

1. Per crioconservare un ceppo batterico è necessario partire da una coltura ottenuta da una colonia singola cresciuta in piastra.
2. Etichettare un criotubo con il nome del ceppo batterico e il codice univoco del paziente.
3. Operando sotto cappa biologica a flusso laminare, utilizzando un'ansa sterile monouso selezionare una colonia singola del ceppo batterico di interesse da una piastra di coltura solida.
4. Stemperare accuratamente la colonia nel criotubo contenente crioprotettore (es. glicerolo al 15-25%).
5. Chiudere il criotubo e mescolare delicatamente per inversione 5-6 volte per garantire un'adeguata distribuzione del crioprotettore.
6. Conservare il criotubo a -80°C per la crioconservazione a lungo termine.