



Procedure Operative Standard (SOP) per i Laboratori di Diagnostica Veterinaria

del Campus di Medicina Veterinaria (Valenzano)
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI



Prefazione

Le procedure operative standard (SOP) sono una componente essenziale nella buona pratica di laboratorio. Le SOP dovrebbero consentire a tutti coloro che lavorano in laboratorio di poter effettuare le varie procedure per garantire l'uniformità delle prestazioni che vengono erogate, la qualità dei risultati e la sicurezza dei lavoratori coinvolti, e di risolvere problemi quando i risultati ottenuti non soddisfano gli standard di qualità attesi.

Le SOP devono essere preparate per ogni test analitico che viene effettuato e per tutte le attività significative relative alla pratica del laboratorio comprese la ricezione e gestione dei campioni, la refertazione e l'archiviazione dei risultati, e devono essere sufficientemente semplici e di facile comprensione. Ogni eventuale modifica ad una SOP deve essere autenticata e autorizzata in modo che sia sempre rispettata una sola procedura. Le SOP, inoltre, devono essere accessibili e consultabili in qualsiasi momento.

Ogni laboratorio, inoltre, deve avere i documenti tecnici e i manuali d'uso degli strumenti, l'elenco dettagliato dei reagenti e delle sostanze chimiche con le relative schede tecniche, con data di scadenza e collocazione all'interno del laboratorio, e una piccola raccolta bibliografica (libri e pubblicazioni relative alla diagnostica di laboratorio).

Le SOP che seguono sono state elaborate secondo le linee guida indicate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità.

ELENCO DELLE SOP

NOME della SOP	Data di attuazione	TITOLO della SOP	Data di revisione
CM_LDV_01.01	01/01/2023	Sicurezza nei laboratori	01/01/ 2026
CM_LDV_02.01	01/01/2023	Monitoraggio delle temperature di frigoriferi e congelatori	01/01/ 2026
CM_LDV_03.01	01/01/2023	Approvvigionamento, stoccaggio e gestione delle sostanze chimiche e reagenti	01/01/ 2026
CM_LDV_04.01	01/01/2023	Ricezione e gestione dei campioni biologici	01/01/ 2026
CM_LDV_05.01	01/01/2023	Stoccaggio e tracciabilità dei campioni	01/01/ 2026
CM_LDV_06.01	01/01/2023	Determinazione del microematocrito	01/01/ 2026
CM_LDV_07.01	01/01/2023	Allestimento strisci ematici da sangue intero e da buffy coat	01/01/ 2026
CM_LDV_08.01	01/01/2023	Colorazioni	01/01/ 2026
CM_LDV_09.01	01/01/2023	Lettura dello striscio	01/01/ 2026
CM_LDV_10.01	01/01/2023	Esame emocromocitometrico con analizzatore	01/01/ 2026
CM_LDV_11.01	01/01/2023	Diagnosi di microscopica di dirofilariosi	01/01/ 2026
CM_LDV_12.01	01/01/2023	Versamenti	01/01/ 2026
CM_LDV_13.01	01/01/2023	Uso del rifrattometro per la determinazione delle proteine sieriche	01/01/ 2026
CM_LDV_14.01	01/01/2023	Esame delle urine	01/01/ 2026
CM_LDV_15.01	01/01/2023	Biochimica clinica	01/01/ 2026
CM_LDV_16.01	01/01/2023	Elettroforesi delle sieroproteine	01/01/ 2026
CM_LDV_17.01	01/01/2023	Esame delle feci	01/01/ 2026
CM_LDV_18.01	01/01/2023	Ricerca di acari responsabili di rogna	01/01/ 2026



SICUREZZA NEI LABORATORI

Nome della SOP:	CM_LDV_01.01	Pagine 8
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO Sicurezza nei laboratori		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavallera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_01.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Tutti i campioni ricevuti in laboratorio di diagnostica veterinaria devono essere considerati potenzialmente pericolosi. Scopo della presente procedura operativa standard (SOP) è descrivere le modalità con cui operare nei Laboratori di diagnostica della Sezione di Clinica Medica (Vedi Allegato 1 - Planimetria) nel rispetto delle norme di biosicurezza a tutela di coloro che entrano in un laboratorio con rischio biologico.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte in questa SOP si eseguono in tutti i laboratori di diagnostica della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Si considera responsabile della corretta applicazione delle procedure descritte nella presente SOP tutto il personale strutturato, assegnisti, borsisti, dottorandi, tirocinanti, studenti, personale tecnico e chiunque entri in uno dei laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

4. MISURE DI SICUREZZA

Non applicabile

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Non applicabile

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

6.1 Dispositivi di protezione individuale

- Guanti in lattice non sterili di varie misure
- Camici di laboratorio personali in cotone bianco
- Camici monouso

6.2 Dispositivi di protezione collettiva

- Cappa chimica
- Armadio di sicurezza per sostanze infiammabili e/o cancerogene
- Lavaocchi

6.3 Dispositivi per la disinfezione e sanificazione

- Ipoclorito di sodio al 10%
- Alcool
- Carta asciugamani
- Spugnette e panni in microfibra
- Vaschette per sanificazione di spugne e panni in microfibra
- Vaschetta per pulizia e asciugatura della vetreria.

6.4 SPILL CONTROL KIT

In ogni laboratorio è disponibile un kit di rimozione di sversamenti in caso di spandimenti accidentali (SPILL CONTROL KIT) posto strategicamente in prossimità di zone di lavoro in modo da essere facilmente accessibile in caso di emergenza:

- Laboratorio 1 _ Ematologia e Citologia: Lato destro bancone centrale.
- Laboratorio 2 _ Chimica clinica: Lato sinistro bancone centrale.
- Laboratorio 3 _ Diagnosi parassitologica: Lato sinistro cappa chimica.

Lo SPILL CONTROL KIT contiene i Dispositivi di Protezione Individuale di seguito indicati e materiali adsorbenti opportunamente scelti per gestire lo spandimento di 1 litro di liquidi o 1 kg di prodotti chimici secchi:

DPI:

- occhiali e visiera di protezione;

- guanti neoprene pesante o nitrile;
- tuta usa e getta;
- calzari/soprascarpe di vinile/plastica;
- mascherina antipolvere FFP2 da usare in caso di spandimento di sostanze solide in polvere o granuli.

MATERIALI ADSORBENTI:

- assorbenti inerti universali per spandimento solventi: sabbia, argilla e betonite;
- neutralizzatore spandimento sostanze acide: bicarbonato di sodio;
- neutralizzatore spandimento sostanze basiche: tiosolfato di sodio;

MATERIALE PER IL CLEAN UP:

- Scopa e paletta
- spatola monouso per la raccolta dei rifiuti
- pinze per la raccolta dei vetri;
- panni assorbenti o garze;
- sacchetti di plastica,
- secchio di plastica (polietilene 5 litri) con coperchio;

6.5 Dispositivi per lo smaltimento dei rifiuti

- Contenitore per rifiuti speciali solidi a rischio biologico
- Tanica per rifiuti speciali liquidi a rischio biologico
- Tanica per rifiuti speciali chimici
- Contenitore per rifiuti speciali taglienti e/o pungenti a rischio biologico

7. PROCEDURE

7.1 Istruzioni di base

- Indossare sempre il camice da laboratorio, correttamente abbottonato sul davanti.
- Evitare il più possibile che gli indumenti personali sporgano oltre le maniche del camice da laboratorio.
- Indossare guanti monouso quando si maneggiano campioni.
- Rimuovere i guanti quando si utilizza il telefono o la fotocopiatrice.
- Tagli o escoriazioni, specie sulle mani, vanno ricoperti con cerotto impermeabile prima di iniziare il lavoro.
- Non portare mai in laboratorio oggetti personali come capi di abbigliamento o borse.
- Non portare mai cibo, bevande o sigarette in laboratorio.
- Non eseguire mai alcuna azione che potrebbe favorire il contatto del campione le mani, viso, occhi o bocca, come mangiare, fumare o toccare le lenti a contatto.
- Mantenere i banchi di lavoro liberi dal disordine.
- Rimuovere camice e guanti e lavarsi le mani prima di lasciare il laboratorio.
- Avvisare il Responsabile di laboratorio o i tecnici, quando un contenitore per campioni perde o si rompe.
- Per evitare rischi meccanici, non indossare gioielli in laboratorio. Assicurarsi che i capelli lunghi siano sempre legati.

7.2 Precauzioni durante la manipolazione dei campioni

- È vietato il pipettaggio orale.
- È indicato indossare visiera o occhiali in caso di rischio di schizzi o aerosol, per esempio con centrifughe e cytospin.
- Pulire immediatamente i banchi di lavoro da liquidi biologici derivanti da rotture o sversamenti, utilizzando ipoclorito di sodio al 10%.
- Alla fine di ogni giornata tutte le superfici devono essere tamponate con ipoclorito all'1% ed alcool.

7.3 Procedure in caso di caso di incidente che coinvolga sostanze chimiche

- Offrire le prime cure, e chiamare, se necessario, soccorsi esterni.
- Togliere gli indumenti e gli eventuali DPI contaminati, usando le necessarie precauzioni.
- Decontaminare la cute eventualmente interessata utilizzando acqua corrente.
- Se sono stati interessati gli occhi, fare ricorso a fontanelle viso oculari, liquidi lava occhi o soluzione fisiologica contenuta nel kit di pronto soccorso.
- Pulire immediatamente gli spandimenti; se il quantitativo e/o la natura del prodotto versato lo permettono facendo ricorso agli appositi materiali assorbenti di cui il laboratorio è dotato.
- Se sono presenti gas, vapori o polveri aero disperse, realizzare la massima ventilazione del locale, aprendo le finestre ed utilizzando tutti i mezzi disponibili di aerazione meccanica (cappe, ventilatori a parete, ecc.).
- In caso di esposizione non prevedibile ad agenti chimici pericolosi, abbandonare immediatamente l'area interessata, isolandola fino all'avvenuta decontaminazione da parte degli addetti alla gestione dell'emergenza.
- Avvisare immediatamente il Responsabile di Sezione dando tutte le informazioni necessarie a gestire l'emergenza (dinamica degli eventi, informazioni sul composto versato, ecc.).

7.4 Procedura generale da mettere in atto in caso di spandimento di prodotti liquidi

- Consultare sempre la scheda di sicurezza del prodotto coinvolto.
- Evacuare la zona facendo allontanare le persone.
- Chiudere le porte e arieggiare aprendo le finestre.
- Indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale presenti nel kit.
- Versare la sostanza assorbente partendo dalla periferia dello spandimento per arrivare all'interno.
- Attendere il solidificarsi della sostanza.
- Asportare il prodotto assorbito con paletta e spatola.
- In caso di frammenti di vetro, raccogliergli con la apposita paletta e/o pinza.
- Eventualmente lavare con acqua o altro liquido se indicato dalla scheda di sicurezza.
- Asciugare e verificare che le superfici non presentino della scivolosità residua.
- Stoccare adeguatamente e smaltire i prodotti utilizzati nel contenitore per rifiuti.

7.5 Procedura generale in caso di spandimento di prodotti in polvere o granuli

- Consultare sempre la scheda di sicurezza del prodotto coinvolto.
- Evacuare la zona facendo allontanare le persone.
- Chiudere porte e finestre evitando di creare correnti d'aria.
- Evitare operazioni che possano sviluppare o sollevare polveri.
- Indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale presenti nel kit.
- Circoscrivere lo spandimento al fine di evitare contaminazioni ambientali.
- Se previsto dalla scheda di sicurezza inumidire le polveri.
- Raccogliere le polveri con panni inumiditi.
- Asportare il prodotto assorbito con paletta e spatola.
- In caso di frammenti di vetro, raccogliergli con la apposita paletta e/o pinza.
- Eventualmente lavare con acqua o altro liquido se indicato dalla scheda di sicurezza.
- Asciugare e verificare che le superfici non presentino della scivolosità residua.
- Stoccare adeguatamente e smaltire i prodotti utilizzati nel contenitore per rifiuti.

7.6 Procedura in caso di rottura in una centrifuga:

- Raccogliere tutti i detriti di vetro con una pinza.

- Smaltirli nel contenitore per i rifiuti speciali taglienti.
- Disinfettare l'interno della centrifuga con ipoclorito al 10%.
- Tamponarla nuovamente dopo 30 minuti.
- Lavare con acqua.
- Asciugare.

7.7 Smaltimento di campioni, materiali e reagenti

- Smaltire il vetro monouso in un contenitore speciale per lo smaltimento dei taglienti senza ulteriore manipolazione.
- Smaltire tutti i campioni biologici e i materiali venuti a contatto con sostanze biologiche in robusto sacco di plastica posto all'interno di apposito contenitore contrassegnato con simbolo "rifiuti speciali a rischio biologico".
- Una volta riempito il sacco deve essere sigillato.
- Chiudere il contenitore per i rifiuti speciali.
- Avvisare il personale tecnico preposto al ritiro dei rifiuti speciali di predisporre il ritiro dal laboratorio.
- Smaltire tutti i liquidi a rischio biologico in apposita tanica in plastica con chiusura a tenuta e contrassegnata con simbolo "rifiuti speciali a rischio biologico".
- Tutte le sostanze chimiche conosciute o sospette di essere tossiche o dannose per l'ambiente devono essere smaltite seguendo le procedure di smaltimento dei rifiuti pericolosi.
- Raccogliere in appositi contenitori, contrassegnati con etichette, i composti chimici e i solventi usati, che devono essere eliminati come rifiuti pericolosi.
- Nessuna sostanza chimica tossico-nociva per l'ambiente può essere eliminata attraverso le fognature;
- Ove possibile, si devono adottare metodiche in grado di ridurre la presenza di concentrazioni pericolose di sostanze infiammabili e chimicamente instabili.

7.8 Il Personale tecnico preposto deve:

- Provvedere allo stoccaggio in area dedicata ai rifiuti speciali;
- Numerare e pesare i contenitori per i rifiuti speciali a rischio biologico;
- Suddividere i contenitori per categorie (solidi, liquidi, taglienti/pungenti);
- Contattare la Ditta autorizzata al ritiro e smaltimento dei rifiuti speciali a rischio biologico;
- Consegnare i contenitori all'operatore della Ditta;
- Conservare bolla di ritiro.

N.B. Un membro specializzato del personale tecnico del Dipartimento deve essere nominato come Responsabile della Sicurezza che deve ispezionare i laboratori a intervalli regolari per assicurarne l'adeguatezza affinché tutte le misure di sicurezza siano garantite. Il Responsabile della Sicurezza deve mantenere un registro degli eventuali incidenti e inconvenienti e deve riferirli al Responsabile di laboratorio. Deve assicurarsi che eventuali modifiche alle procedure standard vengano implementate. A seguito di un incidente verificatosi in laboratorio l'addetto alla sicurezza deve assicurarsi che l'eventuale infortunato sia visitato prontamente da un medico.

8. PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITA'

Non applicabile

9. MANUTENZIONE

Non applicabile

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

Non applicabile

11. REFERENZE

- DECRETO LEGISLATIVO 9 APRILE 2008, n. 81.
- DECRETO 5 Agosto 1998, n. 363.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61.
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS).
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI

- Allegato 1 – Planimetria
- Allegato 2 – Regole per l'uso delle cappe chimiche



Allegato 1 – PLANIMETRIA

IDENTIFICATIVO VANI

PP.Nv.DU PP_numerazione piano
Nv_numerazione vano
Du_destinazione d'uso

Per PP si seguirà tale codifica:

- ...
 - I2 = Secondo interrato
 - I1 = Primo interrato
 - S = Seminterrato
 - 0 = Piano terra
 - 1 = Primo piano
 - 2 = Secondo piano
 - ...

Per Nv si intende il numero progressivo del vano al piano

Per Du si seguirà tale codifica:

- A - Aula
- B - Ufficio
- C - Studio
- D - Biblioteca o museo
- E - Laboratorio
- F - Bagni
- FU - Bagno uomini
- FD - Bagno donne
- FH - Bagno disabili
- FS - Bagno studenti
- G - Deposito e/o ripostiglio
- H - Corridoio | distributivo
- I - Corridoio | ad uso esclusivo
- L - Ascensore e scale
- M - Locale tecnico
- Q - Balcone, terrazza e/o simili
- P - Casa custode
 - 1 - Bagno
 - 2 - Cucina
 - 3 - Letto
 - 4 - Deposito
 - 5 - Corridoio



Allegato 2

REGOLE PER L'USO DELLE CAPPE CHIMICHE


Le cappe chimiche sono tra i più importanti dispositivi di protezione collettiva presenti in laboratorio. Esse devono essere utilizzate sempre in caso di manipolazione delle sostanze chimiche pericolose o potenzialmente pericolose, nonché per le reazioni giudicate a rischio e per il travaso di solventi. **Le cappe chimiche sono da considerarsi zone di potenziale pericolo.** All'interno di esse possono svilupparsi atmosfere anche estremamente infiammabili, esplosive o tossiche. Per tale motivo **la cappa deve essere utilizzata correttamente e mantenuta sempre in perfetta efficienza.**

SI PRESCRIVE QUANTO SEGUE:

- Prima di iniziare le attività accertarsi che la cappa sia in funzione.
- Controllare periodicamente la presenza di cartellino riportante la data della manutenzione periodica.
- Controllare il funzionamento con l'apposita strumentazione, se esistente, altrimenti verificare che l'aspirazione funzioni con metodi empirici (ad esempio con un foglio di carta).
- Verificare che il frontale scorra senza particolari resistenze. Se ci sono dubbi sul funzionamento o sulla effettuazione delle verifiche, segnalarlo al Preposto e al Responsabile di Sezione.
- Evitare di creare delle correnti d'aria in prossimità di una cappa in funzione (apertura di porte o finestre, transito frequente di persone), per non comprometterne la capacità di aspirazione.
- Le fonti di emissione devono essere tenute almeno 15-20 cm all'interno della cappa.
- Durante le attività mantenere il frontale abbassato il più possibile per limitare gli effetti delle correnti d'aria nella stanza sulla capacità di aspirazione della cappa: durante il lavoro l'apertura massima del frontale deve essere di 40 cm.
- Non introdurre la testa all'interno della cappa.
- Tenere sotto cappa solo il materiale strettamente necessario all'attività.
- Non utilizzare la cappa come deposito di agenti o composti chimici e biologici.
- Non utilizzare la cappa come mezzo per lo smaltimento dei reagenti mediante evaporazione forzata.
- Qualora si utilizzino all'interno della cappa apparecchiature elettriche, queste ultime devono avere un "impianto elettrico a sicurezza". Ogni connessione alla rete elettrica deve essere esterna alla cappa.
- Mantenere pulito ed ordinato il piano di lavoro dopo ogni operazione. Alla fine di ogni utilizzo della cappa pulirla usando prodotti specifici in modo da evitare rischi impropri per chi userà la cappa in tempi successivi.
- Quando la cappa non è in uso spegnere l'aspirazione e chiudere il frontale.

MONITORAGGIO TEMPERATURE DI FRIGORIFERI E CONGELATORI

Nome della SOP:	CM_LDV_02.01	Pagine 5
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO	Monitoraggio temperature di frigoriferi e congelatori	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_02.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa SOP descrive le buone prassi per il monitoraggio delle temperature nei frigoriferi e nei congelatori utilizzati per il raffreddamento e la conservazione dei campioni biologici.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

La seguente procedura si esegue su tutti i frigoriferi ed i congelatori presenti nei laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria dotati di sistema di rilevazione della temperatura direttamente tracciabile. L'intervallo applicabile del termometro digitale utilizzato in questa procedura va da 4 °C a -20 °C.

3. RESPONSABILITA'

Si considera responsabile della corretta applicazione delle procedure descritte nella presente SOP tutto il personale strutturato, assegnisti, borsisti, dottorandi, tirocinanti, e chiunque prelevi o depositi materiale dai frigoriferi e/o congelatori presenti in uno dei laboratori della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Medicina Veterinaria.

I responsabili di laboratorio, il personale tecnico ed il referente di UO sono tenuti a vigilare affinché tali disposizioni vengano rigorosamente rispettate.

4. MISURE DI SICUREZZA

È fatto obbligo di

- Non aprire frequentemente i frigoriferi e/o i congelatori;
- Controllarne sempre la corretta chiusura;
- Non riporre cibi o bevande all'interno dei frigoriferi e/o congelatori;
- Indicare all'esterno di ogni singolo congelatore:
 - Norme di sicurezza
 - Simbolo di rischio biologico
 - Elenco aggiornato dei campioni stoccati

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Non applicabile

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- Frigorifero Mod BOSCH economic cooler;
- Freezer 1 Mod Bosch economic;
- Freezer 2 Mod Bosch economic.
- Freezer Whirpool class A;
- Frigorifero Mod Rex tropic system superluxe;
- Frigorifero Bosch automatic;
- Termometro digitale LCD Monitoraggio della temperatura con sonda esterna;
- Camice da laboratorio;
- Doppi guanti o guanti criogenici;
- Calzature per antiinfortunistica;

7. Procedure

Un termometro digitale elettronico con funzione di allarme di alta/bassa temperatura viene utilizzato per monitorare continuamente le temperature di frigoriferi e congelatori in cui i campioni vengono raffreddati o conservati. Un allarme suona se le temperature del frigorifero/congelatore si discostano dagli intervalli di temperatura stabilità.

- La temperatura di ciascun frigorifero e congelatore deve essere registrata giornalmente nei giorni lavorativi, in modo leggibile e con inchiostro indelebile, sull'apposito modulo di Registrazione della Temperatura del frigorifero o del congelatore (Allegato 1) posto all'esterno del frigorifero/congelatore.

8. CONTROLLO QUALITA'

Il personale tecnico preposto è tenuto a controllare e segnalare tempestivamente:

- Anomalie della temperatura;
- Presenza di brina o ghiaccio in eccesso all'interno degli apparecchi;
- Presenza di condensa o muffe sulla parete interna degli apparecchi.

In tutti questi casi devono essere intraprese le opportune azioni correttive.

Se il problema non può essere determinato o risolto, deve essere chiamato un tecnico dell'assistenza per valutare la situazione e avviare l'assistenza sull'apparecchiatura.

Il numero di telefono della ditta è riportato sull'apposito modulo di registrazione della temperatura del frigorifero o del congelatore (Allegato 1) posto all'esterno del frigorifero/congelatore.

9. MANUTENZIONE

Tutti gli apparecchi devono essere sottoposti a:

- Pulizia della guarnizione della porta una volta al mese con un panno umido;
- Lubrificazione delle cerniere della porta ogni 12 mesi con olio per uso generale;
- Pulizia della griglia e del filtro dell'aria di aspirazione regolarmente ogni tre mesi utilizzando una spazzola morbida per mantenerli liberi da polvere e detriti;

N.B Il filtro può essere lavato con acqua tiepida e sapone e lasciato asciugare.

- I congelatori devono essere sbrinati e puliti ogni 12 mesi, se possibile, o sempre se necessario. In particolare, se si osservano le seguenti condizioni:
 - Se lo spessore del ghiaccio sulle pareti interne del congelatore raggiunge dai 5 ai 6 mm di spessore;
 - In caso di fuoriuscita di materiali biologici sulle superfici interne del congelatore;
 - Se gli scomparti del congelatore sono troppo pieni e non sicuri.

9.1 Procedure per la sbrinatura e pulizia dei congelatori

- Indossare per tutto il tempo delle operazioni i DPI (vedi punto 6);
- Spegner il congelatore;
- Rimuovere il contenuto del congelatore e trasferirlo in un congelatore funzionante analogo;
- Informare il responsabile di laboratorio e/o di progetto del provvisorio posizionamento dei campioni;
- Se i campioni richiedono lo smaltimento, usare l'apposito bidone per rifiuti speciali a rischio biologico.

N.B. I campioni non devono essere smaltiti senza il previo consenso del responsabile di laboratorio.

- Posizionare abbondante carta assorbente sul pavimento davanti all'apparecchio;
- Rimuovere quanto più ghiaccio possibile, utilizzando un panno usa e getta e acqua calda.

N.B. Il ghiaccio può contenere materiale contaminato se si è verificata una perdita. Sostituire la carta assorbente con frequenza e smaltirla negli appositi contenitori per rifiuti a rischio biologico.

- Per strati di ghiaccio spessi, è possibile posizionare una ciotola di acqua calda all'interno dell'apparecchio.
- Quando l'apparecchio è completamente sbrinato, smaltire la carta assorbente nei contenitori per rifiuti speciali a rischio biologico.
- Pulire l'area con il 2% di detergente seguito dall'10% di ipoclorito di sodio. Non utilizzare detergenti abrasivi o solventi;
- Smaltire carta assorbente e guanti usati nel contenitore per materiali a rischio biologico;
- Riaccendere l'apparecchio e riattivare eventuali allarmi;
- Una volta che la temperatura ha raggiunto la sua specifica riportare i campioni nella loro posizione originale (a meno che una riorganizzazione differente non sia stata concordata con il Responsabile e il Responsabile del Laboratorio);

- Informare i responsabili/personale dello studio e il responsabile del laboratorio.
N.B. Dopo aver chiuso la porta, potrebbe crearsi un vuoto. Prima che la porta possa essere aperta, potrebbe essere necessario attendere qualche minuto. **NON** forzare la porta.

9.2 Malfunzionamento dell'apparecchiatura

- In caso di guasto o malfunzionamento di qualsiasi parte dell'apparecchiatura, il tecnico preposto deve contattare il Responsabile di Laboratorio.
- Deve essere affisso sul congelatore un avviso con scritto "Non utilizzare"
- Deve essere immediatamente contattato il tecnico specializzato della Ditta esterna per valutare la situazione e avviare l'assistenza sull'apparecchiatura.
- Il numero di telefono della ditta deve essere riportato sull'apposito modulo di registrazione di uso del congelatore (Allegato 1) posto all'esterno del congelatore.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

Non applicabile

11. REFERENZE

- DECRETO LEGISLATIVO 9 APRILE 2008, n. 81
- DECRETO 5 agosto 1998, n. 363

12. ALLEGATI

Allegato 1 – Modulo di registrazione della temperatura

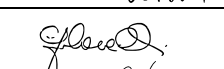
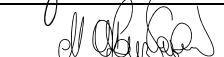
Allegato 1 - Modulo di registrazione della temperatura

FRIGORIFERO/CONGELATORE Mod. _____ N° _____					
RANGE DI TEMPERATURA _____ Laboratorio _____					
Data	Ora	Temperatura rilevata	Interventi necessari	Manutenzione e note	Firma operatore

Technical assistance company: FrigoClima srl di Giuseppe Romano
Tel: +39 0803434292/0803430773 0803441040

APPROVVIGIONAMENTO, STOCCAGGIO E GESTIONE DEI REAGENTI

Nome SOP:	CM_LDV_03.01	Pagine 8
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori di Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note
TITOLO	Approvvigionamento, stoccaggio e gestione dei reagenti	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_03.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

La presente SOP ha lo scopo di divulgare le norme utili per l'approvvigionamento, lo stoccaggio, la corretta gestione del reagentario, l'uso delle sostanze pericolose e minimizzare il rischio per i lavoratori e per i terzi. È utilizzata ogni volta che si adoperano sostanze chimiche per eseguire i diversi tipi di attività diagnostica e/o di ricerca e didattica.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano in tutti i laboratori di diagnostica della Sezione di Clinica Medica.

3. RESPONSABILITÀ

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza. I singoli lavoratori sono responsabili dell'applicazione corretta delle procedure d'uso dei reagenti. Un membro specializzato del personale tecnico è nominato, dal responsabile del laboratorio, come addetto all'approvvigionamento, stoccaggio e gestione dei reagenti.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Non applicabile

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Armadi di sicurezza per sostanze infiammabili e/o cancerogene, locati in Lab.1 – Ematologia e citologia e Laboratorio 3 Diagnostica Parassitologica;
- Cappa chimica locata in Laboratorio 3 – Diagnostica parassitologica;
- Frigorifero Bosch economic cooler, locato in Lab.3 – Diagnostica Parassitologica;
- PC di laboratorio, locato in Lab.3 – Diagnostica Parassitologica;
- Reagentario in formato informatico caricato su PC di laboratorio locato in Lab.3 – Diagnostica Parassitologica;
- Reagentario in formato cartaceo apposto su anta esterna degli armadi di sicurezza;
- Schede di sicurezza di ogni singola sostanza e/o reagente in formato digitale su pc di laboratorio;
- Schede di sicurezza in formato cartaceo in raccoglitore dedicato, disponibile in ogni laboratorio;
- Contenitori per rifiuti speciali taglienti a rischio biologico;
- Contenitori per rifiuti speciali a rischio chimico;
- Contenitori per rifiuti speciali solidi a rischio biologico;

7. PROCEDURE

7.1 Gestione degli acquisti

La quantità di reagenti stoccati in laboratorio e, in particolare, di reagenti pericolosi deve essere minimizzata. Procedere all'acquisto seguendo le seguenti modalità:

- Verificare nel reagentario che il reagente non sia già disponibile in stock;
- Consultare le schede di sicurezza e verificarne la pericolosità;
- Se il composto è cancerogeno valutare la possibilità di sostituire il reagente con uno non cancerogeno;
- Se il reagente non è disponibile in stock procedere alla compilazione della richiesta d'autorizzazione alla spesa.

Al ricevimento del materiale controllare accuratamente che:

- La confezione sia integra;
- Il contenuto corrisponda con la bolla d'accompagnamento;

- Che la scheda di sicurezza sia stata trasmessa insieme al reagente, in caso contrario richiederla immediatamente;
- Stoccare il reagente nelle condizioni opportune (Vedi punto 7.2);
- Inserire il reagente nel reagentario;

7.2 Organizzazione del reagentario

I prodotti chimici vanno stoccati, in funzione delle loro caratteristiche chimiche, della loro reattività e pericolosità, nell'armadio per reagenti, che deve presentare a vista l'elenco dei composti in esso contenuti. Tutti i prodotti chimici devono essere registrati nel reagentario in formato digitale e cartaceo.

L'elenco dei reagenti deve riportare:

- il numero progressivo;
- il nome d'ogni singolo prodotto;
- la quantità presente nella confezione originale;
- le indicazioni sulla pericolosità (scheda di sicurezza);
- la posizione del singolo reagente.

L'elenco dei reagenti deve essere aggiornato:

- all'acquisto d'ogni nuovo reagente;
- all'esaurimento della confezione;
- una volta l'anno per valutare le quantità residue dei diversi reagenti e smaltire quelli più vecchi o non più in uso.

7.3 Norme per lo stoccaggio dei reagenti:

I reagenti chimici devono essere stoccati in condizioni opportune per evitare rischi per i lavoratori e per i terzi.

- È sempre consigliabile consultare la scheda di sicurezza per acquisire tutte le informazioni utili;
- Acidi e basi, con caratteristiche caustiche, devono essere stoccati in laboratorio nella quantità minima indispensabile, in due siti diversi;
- Stoccare le quantità in eccesso nell'armadio di sicurezza per basi o acidi locato nel lab. 1 – Ematologia e citologia;
- L'armadio deve essere sempre tenuto chiuso;
- Eventuali versamenti devono essere trattati come descritto nella seguente procedura;
- Le quantità di liquidi infiammabili in laboratorio devono essere minimizzate;
- Stoccare le quantità in eccesso nell'apposito armadio di sicurezza;
- Consultare l'Allegato 1 per la manipolazione di liquidi infiammabili;

Le sostanze tossiche, mutagene o cancerogene devono essere conservate:

- In apposito armadio di sicurezza chiuso a chiave;
- Adeguatamente compartimentati;
- Adeguatamente segnalati;
- Se devono essere stoccate in frigorifero o in congelatore devono essere adeguatamente compartimentate e segnalate;
- Consultare l'allegato per le procedure generali di manipolazione delle sostanze tossiche e fare riferimento alle schede di sicurezza per le procedure specifiche per ciascuna sostanza;
- assicurarsi di essere in possesso dei dispositivi di protezione individuale o collettiva appropriati prima di iniziare la manipolazione di qualsiasi sostanza tossica.

7.4. Norme per il corretto uso dei reagenti:

- L'uso dei reagenti è consentito al solo personale autorizzato dal Responsabile dell'attività didattica e di ricerca in laboratorio;

- L'uso di qualsiasi reagente o prodotto chimico deve sempre avvenire secondo quanto riportato nelle schede di sicurezza;
- L'uso di qualsiasi reagente o prodotto chimico deve sempre avvenire utilizzando gli opportuni DP individuali e collettivi e sotto supervisione del Responsabile dell'attività didattica e del laboratorio e/o personale formato ed autorizzato;
- Gli operatori possono utilizzare sostanze cancerogene e mutagene solo se espressamente autorizzati dal Responsabile dell'attività didattica e di ricerca in laboratorio.

7.5 Norme generali in caso di spandimento di sostanze pericolose

Spandimento di liquidi

- Consultare sempre la scheda di sicurezza del prodotto coinvolto;
- Evacuare la zona facendo allontanare ordinatamente le persone;
- Chiudere le porte e arieggiare aprendo le finestre (se presenti);
- Indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale;
- Il liquido può essere assorbito usando carta assorbente, in caso di grandi quantità usare la sabbia o altra polvere assorbente che è disponibile nel laboratorio all'interno dello SPILL KIT, versare la sostanza partendo dalla periferia dello spandimento per arrivare all'interno.
- Attendere il solidificarsi della polvere, rimuoverla utilizzando scopa e paletta e raccoglierla in un sacchetto;
- In caso di frammenti di vetro, raccoglierli con una paletta;
- Eventualmente lavare con acqua o altro liquido se indicato dalla scheda di sicurezza;
- Asciugare e verificare che le superfici non presentino della scivolosità residua;
- Stoccare adeguatamente e smaltire i prodotti utilizzati secondo la procedura di smaltimento del Dipartimento.

Spandimento di polveri o granuli

- Consultare sempre la scheda di sicurezza del prodotto coinvolto;
- La maggior parte dei materiali solidi può essere asportata meccanicamente e raccolta in accordo alla pericolosità del prodotto (identificare la natura del versamento e controllare le frasi H (ex frasi R) e consigli P (ex frasi S));
- Evacuare la zona facendo allontanare ordinatamente le persone;
- Chiudere porte e finestre evitando di creare correnti d'aria;
- Evitare operazioni che possano sviluppare o sollevare polveri;
- Indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale;
- Circoscrivere lo spandimento al fine di evitare contaminazioni ambientali;
- Se previsto dalla scheda di sicurezza inumidire le polveri;
- Raccogliere le polveri con panni inumiditi;
- Asportare il prodotto assorbito con paletta e spatola;
- In caso di frammenti di vetro, raccoglierli con una paletta;
- Eventualmente lavare con acqua o altro liquido se indicato dalla scheda di sicurezza;
- Asciugare e verificare che le superfici non presentino della scivolosità residua;
- Stoccare adeguatamente e smaltire i prodotti utilizzati secondo la procedura di smaltimento del Dipartimento.

7.6 In caso di infortunio:

- Non perdere la calma;
- Evitare azioni inconsulte e dannose;
- Allontanare le persone non indispensabili;
- Prodigare le prime cure se si è in grado di farlo;

Esame dell'infortunato:

- Controllare immediatamente le funzioni vitali;
- Fare un'ispezione accurata del soggetto;
- Valutare la dinamica dell'incidente;
- Rassicurare l'infortunato se è cosciente (soccorso psicologico);
- Evitare commenti sul suo stato anche se pare incosciente;
- Chiamare il pronto intervento (118) qualora si ritenga necessario, specificando chiaramente l'indirizzo e le modalità di accesso alla struttura.

8. PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITA'

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica **annualmente**

- le quantità residue dei diversi reagenti;
- il corretto smaltimento dei reagenti scaduti o non più in uso;
- l'aggiornamento delle schede di sicurezza.

mensilmente

- la pulizia e l'ordine all'interno dell'armadio di sicurezza.

quotidianamente

- il corretto funzionamento del frigorifero all'interno del quale sono stoccati i reagenti (Vedi **SOP CM_LDV_02** – Monitoraggio temperature frigoriferi e congelatori).

9. MANUTENZIONE

(Vedi **SOP CM_LDV_02** – Monitoraggio temperature frigoriferi e congelatori).

10 CAMPIONE DOPO IL TEST

Non applicabile.

11 REFERENZE

- DECRETO LEGISLATIVO 9 APRILE 2008, n. 81;
- DECRETO 5 Agosto 1998, n. 363;
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);

12 ALLEGATI

- **Allegato 1** – Norme di sicurezza per i liquidi infiammabili
- **Allegato 2** - Norme di sicurezza per agenti cancerogeni o mutageni

Allegato 1

Norme di sicurezza per liquidi infiammabili

I liquidi infiammabili, come carburanti e solventi, costituiscono un serio pericolo poiché i vapori sono tossici e potrebbero essere esplosivi.

1. La quantità di materiali infiammabili (in particolare dei solventi) all'interno dei laboratori deve essere limitata allo stretto necessario.
2. Nell'uso e nella manipolazione delle sostanze infiammabili lavorare sotto cappa d'aspirazione. Se si è fuori cappa ricordarsi che i vapori dei liquidi infiammabili sono più pesanti dell'aria e si stratificano verso il basso.
3. Nelle zone in cui sono usati o immagazzinati i liquidi infiammabili, eliminare le sorgenti d'innesco, quali fiamme libere, superfici calde, elettricità statica.
4. Quando si manipolano sostanze infiammabili sotto cappa e vi è la necessità di utilizzare anche apparecchiature elettriche, le stesse devono avere la marcatura specifica di protezione dalle esplosioni.
5. Usare camice, guanti, occhiali di sicurezza ed eventualmente la maschera con filtro, quando richiesto dalle norme scritte sull'etichetta del reagente.
6. Rimuovere il vestiario se esso è stato sporcato da schizzi o versamenti.
7. Utilizzare, tutte le volte che è possibile, piccoli contenitori.
8. Assicurarsi che le aree in cui sono utilizzati o conservati i liquidi infiammabili siano dotate di estintori.
9. Ispezionare regolarmente i contenitori per verificare eventuali danni.
10. Gli armadi di stoccaggio devono recare una chiara e adeguata segnaletica.















Allegato 2

Norme di sicurezza per agenti cancerogeni o mutageni

Con riferimento specifico al Titolo IX del D.Lgs. 81/08 capo II art 233 e successive modificazioni, riguardante le attività lavorative in cui i lavoratori possono essere esposti ad agenti cancerogeni o mutageni, è necessario che il Responsabile di laboratorio si attenga a quanto segue:

1. Tutte le lavorazioni che comportino l'impiego di sostanze o preparati recanti la dicitura H350 ex R45 può provocare il cancro”, H350i ex R49 può provocare il cancro per inalazione, H351ex R40 può provocare effetti irreversibili” oppure H340 ex R46 può provocare alterazioni genetiche ereditarie”, devono essere evitate sostituendo, se possibile, detti prodotti, con altri meno nocivi per la salute.

Direttiva 67/548/CEE	CLP
 Carc. Cat. 1; R45 o R49 T/T+	 Carc. 1A; H350 o H350i Pericolo!
 Carc. Cat. 2; R45 o R49 T/T+	 Carc. 1B; H350 o H350i Pericolo!
 Carc. Cat. 3; R40 Xn	 Carc. 2; H351 Attenzione!
 Muta. Cat. 1; R46 T/T+	 Muta 1A; H340 Pericolo!
 Muta. Cat. 2; R46 T/T+	 Muta 1B; H340 Pericolo!
 Muta. Cat. 3; R68 Xn	 Muta 2; H341 Attenzione!

2. Se non è tecnicamente possibile sostituire gli agenti cancerogeni e/o mutageni, il responsabile di laboratorio motiva le ragioni che ne impediscono la sostituzione tramite una relazione che, controfirmata dal direttore del dipartimento, dovrà essere trasmessa al servizio prevenzione e protezione di Ateneo.

I lavoratori che utilizzano agenti cancerogeni e/o mutageni compilano obbligatoriamente la scheda di esposizione al rischio per consentire al servizio prevenzione e protezione di Ateneo di valutare l'esposizione dei lavoratori a rischio secondo quanto stabilito dal D. L. 81/2008.

- 3.** Il responsabile di laboratorio assicura che l'utilizzo di agenti cancerogeni e/o mutageni avvenga in un sistema confinato. Le attività devono essere svolte di norma in locali separati e dedicati; ove ciò non sia possibile devono essere istituite all'interno del laboratorio zone di utilizzo degli agenti cancerogeni e/o mutageni provviste di adeguati segnali di avvertimento e di sicurezza. Le lavorazioni devono avvenire in ogni caso in ambienti chiusi all'interno di cappa chimica a norma
- 4.** Il responsabile di laboratorio adotta procedure tali che il livello di esposizione dei lavoratori sia ridotto al più basso valore tecnicamente possibile.
- 5.** È fatto divieto di utilizzo e di esposizione ad agenti cancerogeni e/o mutageni agli studenti tesisti e alle lavoratrici in gravidanza e puerperio.
- 6.** Gli agenti cancerogeni e/o mutageni devono essere utilizzati nei quantitativi minimi necessari.
- 7.** Devono essere conservati sottochiave in armadi di sicurezza e devono essere presenti in laboratorio nei quantitativi minimi necessari all'attività quotidiana.
- 8.** Lo smaltimento dei rifiuti prodotti avviene secondo le procedure di dipartimento individuate per questa tipologia di sostanze.
- 9.** Il responsabile di laboratorio, sulla base delle conoscenze disponibili, assicura ai lavoratori adeguata informazione, formazione e istruzione sulle procedure di manipolazione delle sostanze cancerogene e/o mutagene prima dell'inizio delle attività, nonché sulle misure di emergenza in caso di incidente e di ogni esposizione accidentale non prevedibile.
- 10.** Il responsabile di laboratorio assicura che i lavoratori dispongano di dispositivi di protezione individuali adeguati alla manipolazione di agenti cancerogeni e/o mutageni.

RICEZIONE E GESTIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI

Nome SOP:	CM_LDV_04.01	Pagine 19
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori di Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note
TITOLO	Ricezione e gestione dei campioni biologici	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_04.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) fornisce indicazioni sulle modalità di gestione dei campioni biologici al momento del loro arrivo presso i laboratori di Diagnostica Veterinaria della Sezione di Clinica Medica Veterinaria, al fine di garantire la sicurezza degli addetti coinvolti nelle operazioni di ricezione, identificazione e stoccaggio dei campioni da sottoporre ad analisi ed assicurarne la tracciabilità. Illustra inoltre i parametri utili agli operatori per verificarne l'idoneità in termini di qualità e condizioni di trasporto a garanzia dell'attendibilità del risultato diagnostico.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

La procedura operativa descritta si esegue nel Laboratorio 3 (Diagnostica Parassitologica) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza. Il personale strutturato presente all'arrivo dei campioni biologici è responsabile della ricezione e gestione degli stessi presso i Laboratori di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria e dell'applicazione corretta delle procedure descritte in questa SOP. Un membro specializzato del personale tecnico è nominato addetto al controllo e manutenzione (vedi punto 9) dal responsabile del laboratorio,

4. MISURE DI SICUREZZA

Trattare tutti i campioni come potenzialmente pericolosi a rischio infettivo:

- Usare i DPI in ogni fase della loro manipolazione (Vedi **SOP CM_LDV_01.01**);
- Non poggiare i campioni privi di contenitore secondario su banconi od altre superfici non opportunamente rivestite con carta da banco usa e getta;
- Non accettare campioni privi di dati di identificazione e foglio di richiesta analisi (vedi punti 5.1 e 5.2);
- Non accettare campioni non idonei (vedi punto 5).

5. REQUISITI DEI CAMPIONI

Per campioni biologici si intendono tutti i materiali derivanti da animali che possono essere soggetti ad indagini di laboratorio a fini diagnostici. Nello specifico:

- Sangue periferico;
- Siero;
- Versamenti;
- Liquido articolare;
- Liquido cefalo-rachidiano;
- Lavaggio broncoalveolare-tracheobronchiale;
- Campioni citologici da vari organi;
- Tamponi (auricolari, cutanei, congiuntivali, nasali, vaginali...);
- Feci;
- Urine;
- Campioni allestiti su vetrino per indagini citologiche;
- Campioni bioptici.

5.1 Ogni campione deve essere connotato con le seguenti informazioni:

- Data del prelievo;
- Identificazione del paziente (nome, specie animale, età e sesso);
- Identificazione del proprietario (nome, cognome).
- Se utile indicare la sede di prelievo (es. orecchio dx, popliteo sx, ecc.);



N.B. In caso di prelievi multipli differenziati deve essere riportato il numero arabo identificativo del campione, corrispondente a quanto riportato sulla richiesta.

5.2 Ogni campione (o campioni multipli dello stesso paziente) deve essere accompagnato dall'apposita richiesta di esame diagnostico contenente le seguenti informazioni:

- Data del prelievo;
- Identificazione del paziente (nome, specie animale, sesso, età);
- Identificazione del proprietario (nome, cognome);
- Identificazione del richiedente (unità operativa, nome, cognome e firma del richiedente);
- Identificazione del materiale biologico, specificando data del prelievo, tipo di prelievo, localizzazione topografica e, eventualmente, lateralità del prelievo;
- In caso di prelievi multipli differenziati deve essere riportato il numero arabo identificativo del campione, corrispondente a quanto riportato sulla richiesta.

5.3 Requisiti dei contenitori in funzione del campione:

- Provette contenenti liquidi (es. sangue, siero, versamenti, ecc..) devono riportare i dati identificativi scritti in maniera leggibile con pennarello indelebile nero o blu;
- I campioni per cui è richiesto l'esame emocromocitometrico devono essere in provetta con K3 EDTA e deve essere rispettato il rapporto sangue/anticoagulante;
- I campioni per cui è richiesto esame biochimico e/o elettroforesi delle sieroproteine devono essere in provette senza anticoagulante;
- Contenitori con urine, feci o materiale biologico di diversa natura, devono riportare i dati identificativi scritti su etichetta laterale (non sul tappo) scritti in modo leggibile con pennarello indelebile nero o blu;
- Contenitori con tessuti in formalina (rapporto tessuto formalina di 1:10) devono riportare i dati identificativi scritti su etichetta laterale (non sul tappo) scritti in modo leggibile con pennarello indelebile nero o blu;

N.B. Evitare la contaminazione con vapori di formalina da campioni di tessuto fissati nella stessa, imballando i vetrini in un contenitore separato. La formalina, infatti, fissa parzialmente le cellule e crea artefatti che possono rendere il vetrino non diagnostico.

- Tamponi (auricolari, cutanei, congiuntivali, nasali, vaginali) devono riportare i dati identificativi, scritti in maniera leggibile con pennarello indelebile nero o blu, e la sede di prelievo;
- Vetrini allestiti con materiale biologico da colorare per valutazione citologica devono riportare i dati identificativi scritti in maniera leggibile con la matita e la sede di prelievo e devono essere trasportati negli appositi portavetrini. Per l'idoneità del preparato vedi **SOP CM_LDV_0701** – Allestimento striscio ematico e da buffy coat; vedi Allegato 3.
- I contenitori devono essere posti in una busta a chiusura sigillata con la richiesta all'esterno.

5.4 Requisiti dei contenitori provenienti dall'area di isolamento (infettivi o sospetti infettivi):

Le specifiche per l'identificazione sono analoghe a quelle previste per i campioni provenienti da pazienti non infettivi con la sola eccezione relativa alla modalità di etichettatura.

N.B. Queste operazioni devono essere state condotte nella zona filtro prima che i campioni vengano portati al di fuori della zona di isolamento.

- L'etichetta laterale con i dati identificativi deve essere stata ricoperta con nastro adesivo trasparente e deve essere stata disinfettata;
- La superficie degli appositi contenitori specifici per i diversi campioni deve essere stata disinfettata;
- I contenitori devono essere stati posti in una busta sigillata e contrassegnata con bollino rosso;



- La superficie esterna della busta deve essere stata disinfettata;
- Il modulo di richiesta, preventivamente compilato, deve essere stato inserito in busta a tenuta ermetica e disinfettato esternamente.

N.B. Nel caso vengano raccolte più tipologie di campioni si raccomanda di utilizzare contenitori ermetici separati.

5.5 Rifiuto di campioni

Un campione ritenuto non idoneo può essere rifiutato. I principali motivi che giustificano il rifiuto sono:

5.5.1 Campioni non etichettati o etichettati in modo errato

- Avvisare immediatamente il medico che ha richiesto il test;
- Se il medico è sicuro che il campione possa essere correttamente identificato:
 - Etichettare correttamente la provetta;
 - Registrare il campione su apposito registro (vedi Punto 7.1);
 - Procedere con l'analisi.
- Se il medico ha dubbi sulla corretta identità del campione:
 - Eliminare il campione.

5.5.2 Campioni che perdono

- Se un volume notevole di materiale biologico è fuoriuscito dalla provetta o dal contenitore, il campione deve essere scartato in quanto i risultati risulterebbero alterati:
 - Avvisare immediatamente il medico che ha richiesto il test;
 - Richiedere l'invio di un nuovo campione.
- Se il modulo di richiesta è contaminato:
 - Compilare un nuovo modulo;
 - Eliminare il modulo originale.

5.5.3 Campioni obsoleti

- Il campione di sangue deve essere testato entro 6h dal prelievo o deve essere refrigerato per non più di 24h.
- L'urina deve essere esaminata il prima possibile dopo la raccolta o deve essere refrigerata.
- I campioni fecali conservati a temperatura ambiente devono essere analizzati entro 24h. Se conservati in frigorifero (4°C) possono essere analizzati dopo 2-3 giorni (in caso di esami che richiedono campionamenti successivi). Campioni di feci conservati in una soluzione di formalina al 10% a temperatura ambiente possono essere esaminati anche dopo 7gg.
 - Richiedere l'invio di un nuovo campione.
 - Se non è possibile ottenere un campione fresco, valutare con il mittente quali test potrebbero ancora essere eseguiti sul vecchio campione senza compromettere l'affidabilità dell'analisi.

5.5.4 Campioni non idonei

- Se il campione viene dispensato in una provetta non idonea:
 - Informare immediatamente il medico che ha richiesto il/i test;
 - Richiedere l'invio di un nuovo campione in idonea provetta;
 - Eliminare il campione.

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Frigorifero Bosch economic cooler, locato in Lab.3 – Diagnostica Parassitologica;
- Centrifuga ([Thermo scientific Medifuge](#));



- PC di laboratorio, locato in Lab.3 – Diagnostica Parassitologica. L'accesso al sistema di gestione avviene tramite un ID e una password nota al solo personale tecnico, al responsabile di laboratorio ed al responsabile di Sezione;
- Registro dei protocolli in formato informatico caricato su PC di laboratorio;
- Registro dei protocolli in formato cartaceo;
- Portaprovette;
- Portaependorf;
- Bustine per trasporto campioni biologici;
- Contenitori terziari per trasporto campioni biologici;
- Siberini;
- Moduli di richiesta analisi;
- Contenitori per rifiuti speciali taglienti a rischio biologico;
- Contenitori per rifiuti speciali solidi a rischio biologico.

7. PROCEDURE

7.1 Ricezione dei campioni

- Orario di accettazione: dalle ore 9:00 alle ore 13:00;
- L'accettazione e lo smistamento dei campioni viene svolta nel laboratorio di Diagnostica Parassitologica.
- I campioni devono essere portati in laboratorio individualmente in sacchetti di plastica accompagnati da modulo di richiesta esami (Allegato 1);
- Se provenienti dai reparti di isolamento infettivi, devono essere stati collocati in sacchetti di plastica contrassegnati da bollino rosso e disinfettati esternamente. Tali sacchetti devono essere stati inseriti in appositi contenitori a tenuta ermetica contenenti il modulo di richiesta;
- Verificata la congruità con le richieste di analisi (vedi punto 4) e l'idoneità dei campioni, gli stessi devono essere registrati e smistati nei diversi laboratori della Sezione di Clinica Medica Veterinaria:
 - LABORATORIO 1 - Ematologia e citologia;
 - LABORATORIO 2 - Chimica Clinica;
 - LABORATORIO 3 – Diagnostica Parassitologica.
- Aprire il file "Registro protocolli" disponibile sul Computer di laboratorio ed inserire:
 - Data di ricezione campione/campioni;
 - Dati del paziente;
 - Dati del proprietario;
 - Nome del Medico Richiedente e /o Sezione di afferenza;
 - Esami richiesti;
 - Un numero di protocollo di laboratorio univoco;
 - Nome dell'operatore che ha effettuato la registrazione del campione.
- Riportare il numero di protocollo ed i dettagli nel registro protocolli cartaceo;
- Riportare lo stesso numero sulla provetta/contenitore del campione;
- Riportare lo stesso numero sul modulo di richiesta e firmarlo;
- Riconsegnare il modulo di richiesta analisi al vettore del campione perché lo inserisca nella cartella clinica del paziente.
-

7.2 Ricezione di campioni per test d'urgenza

Questi possono provenire da una clinica ambulatoriale, da casi di incidente e di emergenza, dai reparti di clinica medica, ostetricia o chirurgia.

- Orario di accettazione: dalle ore 9:00 alle ore 13:00;
- L'elaborazione dei test urgenti ha la priorità rispetto ad altri campioni;



- Il personale di laboratorio deve essere sempre pronto al loro ricezione;
- All'arrivo devono essere immediatamente inseriti nel Registro protocolli (vedi punto 7.1 "Ricezione del campione");
- Fare una nota speciale relativa al numero di telefono, mail o altro metodo di contatto con il mittente.
- Contrassegnare chiaramente la provetta del campione e il modulo di richiesta (ad es. un'etichetta rossa o inchiostro rosso);
- Portare immediatamente nel laboratorio di competenza;
- Il test deve essere eseguito senza indugio;
- I risultati provvisori (microematocrito, emocromocitometrico, stima piastrinica, proteine totali e chimica urinaria) devono poter essere comunicati entro 30' dall'orario di ricezione del campione.

7.3 Invio dei campioni a laboratori esterni convenzionati

La procedura standard prevede l'utilizzo di un sistema a più involucri:

- **Recipiente primario** contenente il campione (provette, tubi, piastre);
- Deve essere di materiale impermeabile, a tenuta stagna o chiusura ermetica, etichettato;
- Se il campione è contenuto in una piastra, questa deve essere sigillata con parafilm;
- I campioni di siero devono essere inviati in provette tipo eppendorf etichettate sigillate con parafilm.
- **Recipiente secondario**: buste di plastica monouso a doppio scomparto, uno con chiusura ermetica e l'altro no;
- Inserire nel 2° scomparto (senza chiusura) della busta di plastica apposito modulo di richiesta analisi fornito dal laboratorio.

I contenitori (provette o altro) contenenti liquidi biologici o tessuti in liquido fissativo devono essere:

- Trasportati in posizione verticale;
- Inseriti all'interno di opportune rastrelliere poggiate sul fondo del recipiente esterno a contatto con adeguata quantità di carta assorbente;
- Le rastrelliere devono essere posizionate in modo tale che non sia possibile il rovesciamento accidentale, a seguito di scossoni;
- In caso di utilizzo di siberini come sostanze refrigeranti, questi NON devono essere posti a contatto diretto con il campione.

Procedere alla prenotazione telefonica per il ritiro e collocare temporaneamente i campioni nell'apposito frigorifero fino al momento del ritiro.

7.4 Invio campioni a laboratori esterni

In questo caso la procedura prevede anche un contenitore terziario

Recipiente terziario esterno, quello con cui fisicamente gli addetti al trasporto del materiale biologico vengono a contatto:

- Può contenere uno o più recipienti secondari. Il suo scopo è proteggere gli altri recipienti da fattori esterni, come acqua o altri agenti fisici, urti e intemperie;
- Può essere di plastica rigida, legno o altri materiali particolarmente resistenti;
- Se il contenuto del recipiente primario supera i 50 ml, tra il recipiente secondario e quello esterno è necessario inserire materiale assorbente;
- Deve essere trasportato in posizione verticale;
- I documenti di accompagnamento dei campioni devono essere allegati all'esterno del contenitore e comunque devono essere fisicamente isolati dal materiale biologico per ripararli da spandimenti accidentali;



- Non usare arcelle, vassoi, scatole di cartone o qualunque altro contenitore sprovvisto di chiusura ermetica;
- Apporre un'etichetta autoadesiva sul contenitore per il trasporto che ne identifichi il contenuto (es.: "materiali biologici").

N.B. Per documentazione di trasporto seguire le indicazioni specifiche fornite dal corriere.

7.5 Procedure per lo smaltimento dei campioni non idonei

Tutti i campioni biologici devono essere considerati potenzialmente infetti.

- È fatto obbligo dell'uso dei DPI durante tutte le attività di eliminazione dei campioni (vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- I campioni valutati come non idonei devono essere smaltiti nel laboratorio di ricevimento (Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica) e non essere portati in altri laboratori;
- Contenitori primari e secondari contaminati da campione sversato o fuoriuscito non devono essere aperti ma eliminati direttamente nel contenitore dei rifiuti speciali solidi a rischio biologico secondo precisa procedura (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Documenti di trasporto contaminati da campioni biologici non devono essere rimossi dal contenitore secondario e smaltiti con lo stesso nel contenitore per rifiuti speciali a rischio biologico;
- DPI e materiale monouso entrato in contatto con il campione devono essere smaltiti nel contenitore dei rifiuti speciali a rischio biologico;
- Prima di essere eliminati i campioni fecali devono essere chiusi in contenitori a tenuta o in buste sigillate;
- Il contenitore per lo smaltimento dei campioni biologici deve essere sempre chiuso con il suo coperchio ermetico.

8. CONTROLLO QUALITA'

- Il personale di laboratorio è tenuto a seguire le procedure descritte nella presente SOP;
- L'accesso al sistema di gestione avviene tramite un ID e una password nota al solo personale tecnico, al responsabile di laboratorio ed al responsabile di Sezione;
- Il Responsabile di laboratorio vigila affinché tutte le procedure descritte vengano correttamente applicate.

9. MANUTENZIONE

- Il Computer di Laboratorio è sottoposto a procedure di backup annuali.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

Non applicabile.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61.
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.



12. ALLEGATI

Allegato 1 - Modulo richiesta analisi.

Allegato 2 - Linee guida per la raccolta e la manipolazione dei campioni di siero e plasma.

Allegato 3 – Linee guida per la raccolta e preparazione dei campioni citologici.



Allegato 1

RICHIESTA ANALISI DI LABORATORIO

Data _____

Medico Veterinario Richiedente _____

SEZIONE DI _____

Proprietario Sig. _____ dell'animale da compagnia _____

Specie: Cane Gatto; razza: _____

Sesso e stato riproduttivo: M F int. cast.; età: _____ (anni) _____ (mesi)

NOTE _____

TEST RICHIESTI

EMATOLOGIA

- Emocromo completo
- Emocromo + Reticolociti
- Test di Knott qualitativo
- Ves

ELETTROFORESI

- Elettroforesi sierica

ESAMI COPROLOGICI

- Flottazione
- Tecnica di Baermann
- Ricerca di Giardia spp.

CHIMICA CLINICA

- Biochimico Completo°
- Pannello Epatico°°
- Pannello Renale°°°

ESAME URINE

- Esame Urine Completo* (metodo di prelievo _____)

TEST DERMATOLOGICI

- Raschiato cutaneo
- Impronta cutanea
- Scotch test
- Tampone auricolare

CITOLOGIA

- Aspirato linfonodale
- Liquidi di versamenti

*Esame Urine Completo: chimico-fisico + esame del sedimento

°Biochimico Completo: CK, AST, ALT, ALP, GGT, BIL, GLU, COLE, TRIG, UREA, CREA, AMY, LIPASI DGGR, LDH, PROT, ALB, GLOB, A/G, Ca, P, Na, K, Cl, Mg, Fe, PCR

°°Pannello Epatico: AST, ALT, ALP, BIL, ALB

°°°Pannello Renale: UREA, CREA, FOSFORO

N.B. I campioni, accompagnati dal modulo di richiesta, dovranno riportare nome del proprietario, nome e specie dell'animale e data del prelievo. La mancanza del modulo e/o delle informazioni succitate non consentirà di effettuare le analisi richieste. I campioni non idonei (ad esempio per volume insufficiente, provetta non idonea, presenza di coaguli) non saranno processati. Accettazione campioni: dal lunedì al venerdì dalle ore 9:00 alle ore 13:00

Compilazione campi a cura del personale di Laboratorio

Protocollo n° _____

Registrato da _____



Allegato 2

Linee guida per la raccolta e la manipolazione dei campioni di siero e plasma

I test chimici e sierologici vengono solitamente eseguiti su campioni di siero o plasma. Per ottimizzare i risultati dei test, il siero o il plasma devono essere separati dalle cellule il prima possibile dopo la raccolta per ridurre al minimo gli artefatti che si verificano con la conservazione. A seconda degli esami richiesti si devono utilizzare idonee provette di raccolta del campione ematico:

1. Provette per siero

1.1 Provette per siero senza gel separatore

Tappo: rosso.

Contenuto: nessuno.

Usi: il siero è preferito al plasma per l'elettroforesi e i test di tutti gli analiti chimici, ad eccezione del potassio, che è più alto nel siero che nel plasma a causa del rilascio di potassio dalle cellule durante la coagulazione.

Procedura:

- Raccogliere il sangue nella provetta;
- Consentire la coagulazione del sangue lasciandolo a temperatura ambiente per 15-30 minuti;
- Centrifugare a 1.000-2.000 x g per 10 minuti in centrifuga [Thermo Scientific Medifuge](#);
- Trasferire il siero immediatamente in una eppendorf utilizzando una pipetta monouso
- Se il siero non viene analizzato immediatamente può essere conservato per alcuni giorni in frigorifero. Per conservazioni più lunghe a una temperatura pari o inferiore a -20°C. È importante evitare cicli multipli di congelamento-scongelo perché dannoso per molti componenti del siero.
- I campioni emolitici, itterici o lipemici possono invalidare alcuni test.

1.2 Provette per siero con gel separatore

Tappo: giallo.

Contenuto: gel separatore e attivatore della coagulazione.

Usi: vedi punto 1

Procedura: vedi punto 1

N.B. Miscelare delicatamente il campione subito dopo il prelievo mediante inversione delle stesse per 6-8 volte. La mancata o l'inefficiente miscelazione determina un'incompleta attivazione con conseguente rischio di emolisi o formazione di frustoli di fibrina che possono interferire con gli esami:

L'agitazione eccessiva può causare emolisi in vitro o formazione di schiuma.

2. Provette per plasma

2.1 Provette per plasma eparinizzato

Tappo: verde.

Contenuto: litio eparina.

Usi: può essere usato per tutti i test biochimici.

Procedura:

- Raccogliere il sangue nella provetta;
- Miscelare il campione subito dopo il prelievo mediante delicata inversione delle stesse per 6-8 volte



N.B. La mancata o l'inefficiente miscelazione determina nei campioni un'incompleta anticoagulazione con conseguente formazione di coaguli.

Centrifugare per 10 minuti a 1.000-2.000 x g utilizzando una centrifuga [Thermo Scientific Medifuge](#)

- Dopo la centrifugazione immediatamente trasferire il plasma in una eppendorf utilizzando una pipetta monouso;
- Se il plasma non viene analizzato immediatamente può essere conservato per alcuni giorni in frigorifero. Per conservazioni più lunghe a una temperatura pari o inferiore a -20°C. È importante evitare cicli multipli di congelamento-scongelo perché dannoso per molti componenti del plasma.
- I campioni emolitici, itterici o lipemici possono invalidare alcuni test.

2.2 Provette per plasma con EDTA

Tappo: viola.

Contiene: acido etilendiamminico tetracetico.

Usi: può essere utilizzato per testare la maggior parte degli analiti, ad eccezione di molti enzimi, elettroliti (potassio), test del ferro (ferro, TIBC, % di saturazione) e minerali (calcio e magnesio). Molti enzimi richiedono per la loro funzione cationi bivalenti, come il calcio, che viene chelato dall'EDTA. Il plasma EDTA viene utilizzato principalmente per la misurazione del glucosio.

Procedure: Vedi punto 2.1.

2.3. Provette per plasma con citrato

Tappo: blu.

Contenuto: sodio citrato.

Uso: il sodio citrato viene utilizzato solo per i test della coagulazione.

Allegato 3

Linee guida per la raccolta e preparazione dei campioni citologici

La citologia è uno strumento diagnostico estremamente utile in medicina veterinaria ed ha molti vantaggi rispetto all'istopatologia:

- I campioni citologici possono essere facilmente ottenuti prima di un intervento, spesso senza anestesia generale e talvolta anche senza sedazione, e possono essere utilizzati per lo screening dei pazienti per una diagnosi più completa.
- La citologia per aspirazione con ago sottile è meno costosa della biopsia chirurgica sia nella raccolta dei campioni che nelle analisi di laboratorio.
- È meno probabile che la procedura di aspirazione con ago sottile provochi effetti avversi rispetto alla biopsia tissutale.
- Poiché è richiesta una minore elaborazione del campione, i risultati citologici sono disponibili prima dei risultati istopatologici.
- Consente un controllo "rapido" per la recidiva di tumori maligni locali o metastasi linfonodali regionali.
- Microrganismi patologici coinvolti in infezioni microbiche di vari organi diagnosticati inizialmente dalla citologia hanno maggiori probabilità di essere coltivati con successo.
- L'aspirazione citologica di organi particolarmente "difficili da raggiungere" può essere campionata con successo con l'uso di tecniche ecoguidate.

Tuttavia, anche la citologia ha i suoi limiti. Poiché le cellule/materiale in fase di valutazione sono "al di fuori" del loro ambiente normale, per cui una valutazione dell'organizzazione, della disposizione o dell'architettura cellulare spesso non è possibile con la citologia. Pertanto, un'adeguata raccolta del campione e la sua preparazione sono di notevole importanza quando si tratta di interpretazione citologica, in quanto fornirà al patologo tante informazioni su cui basare possibili diagnosi.

Di seguito sono descritte le modalità con cui effettuare correttamente delle indagini citologiche, dal prelievo del campione e dall'allestimento del vetrino, fino alla valutazione microscopica con l'obiettivo di ottenere un'elevata qualità del campione e di conseguenza una maggiore accuratezza diagnostica.

ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi SOP CM_LDV_01.01 – Sicurezza di laboratorio);
- Lame di bisturi (n°. 10 o 15)
- Vetrini portaoggetto con banda sabbata;
- Matita;
- Piastre petri;
- Siringhe da 2,5 - 5,0 – 10 - 20 ml
- Aghi con calibro che va da 22G a 25G.
- Tamponi a secco;
- Tosatrice;
- Pinzette anatomiche e "a dente di topo".

PRELIEVI DI CAMPIONI DA LESIONI CUTANEE

Le tecniche di prelievo per i campioni provenienti da lesioni cutanee si differiscono in base al tipo di lesione. Le principali metodiche di cui ci si avvale comprendono:

Apposizione (Metodo usato per campionare cellule da lesioni superficiali quali erosioni, papule e pustole).

Tecnica:



- Scrivere con la matita sull'area smerigliata:
 - nome del paziente;
 - specie;
 - nome del proprietario;
 - tipologia di campione;
 - area di raccolta del campione;
 - data di campionamento.
- Apporre delicatamente il vetrino sulla lesione;
- Fare asciugare il materiale raccolto rapidamente all'aria.

Calco di Tzanck (Per campionare cellule da pustole integre)

Tecnica:

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Rompere alla base la pustola con un ago sottile;
- Raccogliere il pus apponendo un vetrino sull'essudato esposto.

N.B In presenza di pustole di piccole dimensioni, risulta difficile eseguire il prelievo mediante calco di Tzanck, pertanto è consigliabile rompere la pustola esercitando con il margine di un vetrino una leggera pressione laterale che consentirà al pus di depositarsi su di esso.

Impronta dalla superficie inferiore delle croste.

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Rimuovere la crosta con l'ausilio di una pinzetta a "dente di topo";
- Appoggiare la superficie inferiore della crosta sul un vetrino;

in alternativa

- Apporre il vetrino direttamente sulla cute esposta dopo la rimozione della crosta.

Raschiato cutaneo (Tecnica traumatica utilizzata per prelevare una grande quantità di cellule da lesioni ulcerate).

NB. Il numero di cellule raccolte è solitamente maggiore rispetto a quello ottenuto mediante apposizione, anche se i campioni sono inevitabilmente maggiormente emocontaminati e le cellule possono più facilmente subire danneggiamenti.

Tecnica

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Raschiare delicatamente la lesione usando il dorso (bordo smussato) di una lama di bisturi (n.10) o il bordo di un vetrino portaoggetto;
- Tenere la lama o il vetrino con un angolo compreso tra 45 e 90 gradi rispetto alla superficie della pelle;
- Utilizzare una pressione moderata;
- Raschiare la pelle nella direzione della crescita dei peli;
- Usare colpi brevi e veloci, raschiare la pelle usando la mano dominante;
- Tenere la pelle tesa con l'ausilio di una pinzetta anatomica o con il pollice e l'indice della mano opposta per evitare che la pelle si arricci sotto la lama;
- La pelle deve apparire rosa, con i capillari che trasudano piccole quantità di sangue;

N.B Il materiale presente sulla superficie della lesione è solitamente ricco di detriti necrotici, sangue e, di conseguenza, raramente diagnostico.

- Rimuovere il materiale più superficiale con un primo raschiato;
- Campionare quello subito al di sotto mediante una seconda delicatissima scarificazione;
- Raccogliere il materiale sulla lama (o sul vetrino);
- Porlo sul vetrino strisciando delicatamente la lama sul vetrino avendo cura di non applicare un'eccessiva pressione che potrebbe danneggiare la morfologia delle cellule.

Scotch test (tecnica atraumatica utile in caso di lesioni desquamative “secche”, in cui l’apposizione del vetrino non consentirebbe alle cellule di aderire. E’ anche il miglior metodo per prelevare cellule da lesioni interdigitali o da pieghe cutanee, sulle quali non è possibile posizionare direttamente il vetrino)

Tecnica

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Far aderire il lato adesivo di un pezzo di nastro trasparente sopra la lesione così che le cellule presenti sulla cute rimangano attaccate al collante;
- Far aderire il nastro adesivo al vetrino portaoggetto precedentemente allestito.

Biopsia con ago aspirato/biopsia con ago infissione

Sono metodi migliori e più comunemente utilizzati per il campionamento dei linfonodi di lesioni proliferative e masse. Queste tecniche consentono la raccolta di cellule dalla profondità della lesione ed evitano la contaminazione superficiale con cellule infiammatorie e microrganismi.

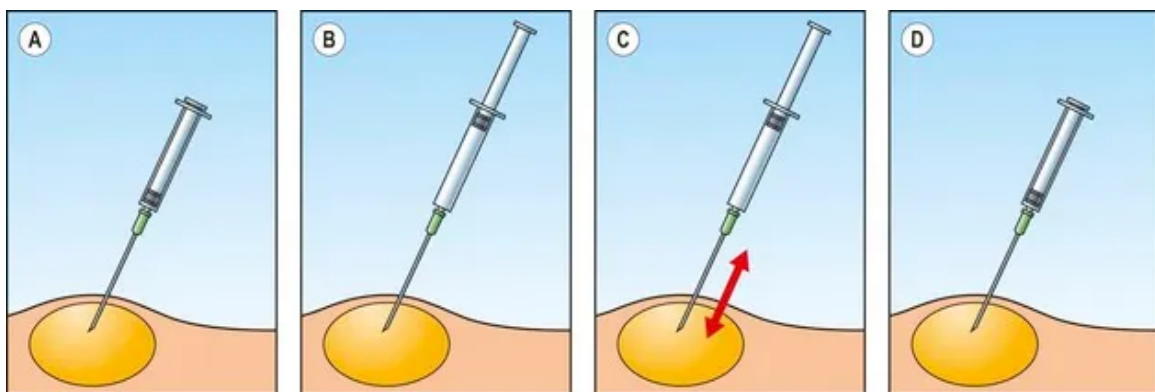
N.B. Scelta della siringa e dell’ago

- Possono essere utilizzati aghi con calibro che va da 22G a 25G e siringhe da 2,5-20 ml;
- Più il tessuto è morbido e più sono piccoli l’ago e la siringa utilizzati;
- Gli aghi più grandi tendono a causare una maggiore contaminazione di sangue;
- Una eccezione alla regola dell’utilizzo dell’ago sottile è rappresentata da alcuni tumori mesenchimali molto solidi, in cui le cellule sono racchiuse in una densa matrice extracellulare. Se le prime aspirazioni risultano essere inefficaci, sarà necessario utilizzare aghi di diametro maggiore, da 17G a 21G.

Biopsia con ago aspirato

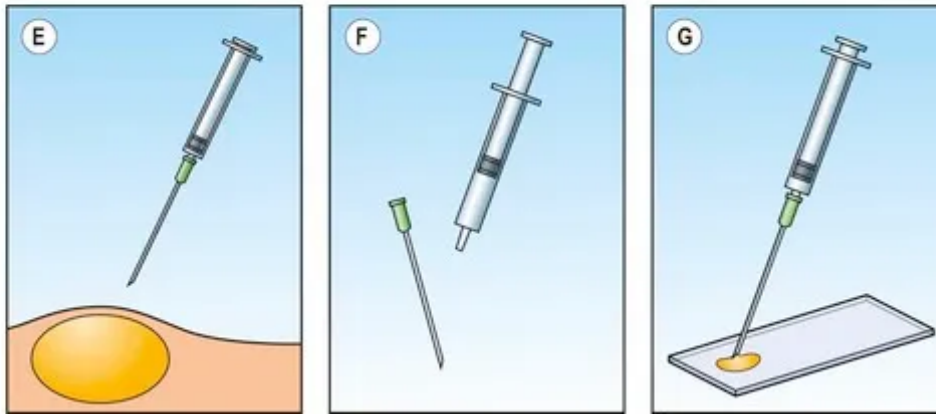
Tecnica

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Tenere saldamente la massa con una mano;
- Inserire l’ago nella massa con la siringa collegata (A);
- Tirare indietro lo stantuffo e mantenere una leggera pressione negativa (B).
- Reindirizzare l’ago nella massa più volte mantenendo una pressione negativa nella siringa (C);
- Quando il materiale appare nel collo dell’ago, rilasciare lo stantuffo e rimuovere l’ago dalla massa (D-E);



- Scollegare l’ago dalla siringa e tirare indietro lo stantuffo (F);

- Ricollegare l'ago alla siringa e premere lo stantuffo per espellere il materiale aspirato su un vetrino pulito (G).



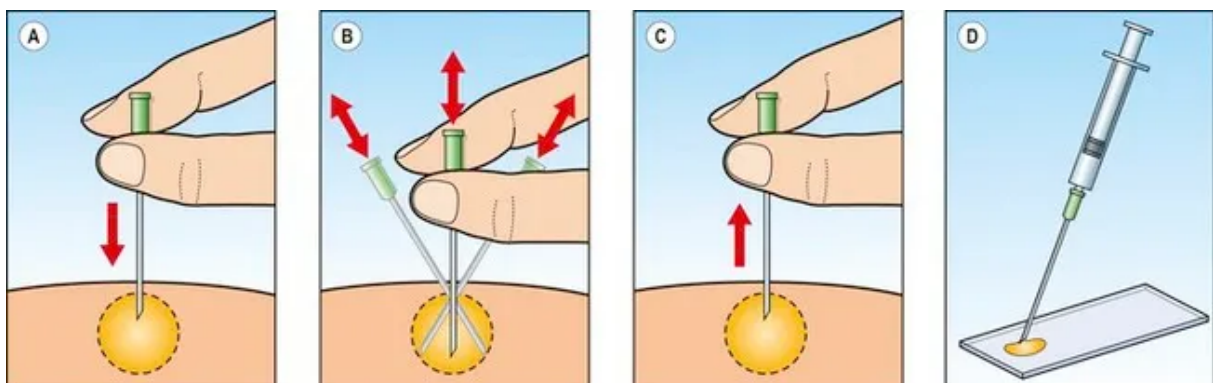
Biopsia con ago infissione

Tecnica

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Tenere saldamente la massa con una mano;
- Inserire l'ago, non collegato alla siringa, nella massa (A);
- Fare dei movimenti rotatori oppure spingere e ritrarre delicatamente l'ago dal centro della massa (B);
- Eseguire l'operazione anche in direzione obliqua;
- Rimuovere l'ago dalla massa (C);
- Collegare l'ago ad una siringa vuota in cui si è ritratto lo stantuffo ed esercitare una pressione adeguata sullo stantuffo per adagiare il materiale su uno o più vetrini puliti (D).

N.B Se possibile, eseguire più prelievi in vari siti all'interno della massa, per aumentare le possibilità di ottenere materiale diagnostico e garantire un campionamento rappresentativo della lesione. In caso di campionamento di lesioni di grosse dimensioni, è sempre opportuno prelevare materiale dalla periferia, evitando pertanto possibili aree centrali di necrosi.

- Procedere con l'allestimento del vetrino.





PRELIEVI DI CAMPIONI BIOPTICI

Le tecniche di prelievo di campioni bioptici differiscono in base al tipo di tessuto da esaminare. Le principali metodiche di cui ci si avvale comprendono l'apposizione, la biopsia con ago aspirazione e con ago infissione

Apposizione

Tecnica

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come al punto precedente;
- Poggiare delicatamente il campione bioptico su un vetrino prima del posizionamento in formalina;
- Asciugare la superficie di taglio del tessuto tamponando delicatamente su tovagliolo di carta per rimuovere il fluido superficiale o il sangue che possono compromettere l'adesione di cellule sul vetrino e diluire il materiale citologico;
- Premere saldamente il campione bioptico più volte su un vetrino pulito.

N.B. Non strofinare il tessuto sulla diapositiva per non alterare o distorcere la morfologia cellulare causando rottura cellulare e filamento nucleare

Biopsia con ago aspirazione e con ago infissione

Questa è una tecnica usata per ottenere materiale da organi che non liberano cellule spontaneamente. È preziosa nella diagnosi delle lesioni della mammella, della tiroide, dei linfonodi, del fegato, dei polmoni, della pelle, dei tessuti molli e delle ossa. La tecnica di prelievo è analoga a quella descritta al punto 7.1 - Biopsia con ago aspirato/biopsia con ago infissione.

Tamponi

Questa tecnica è utile per il campionamento di tragitti fistolosi, condotti uditivi, essudati e per la citologia vaginale.

Tecnica

- Scrivere con la matita sull'area smerigliata del vetrino come ai punti precedenti;
- Prima del prelievo inumidire leggermente il tampone con 1 o 2 gocce di soluzione fisiologica sterile (a meno che l'area di prelievo non sia molto umida);
N.B. Inumidire il tampone è consigliato, in quanto riduce al minimo il danno cellulare;
- Procedere al prelievo facendo roteare lentamente e delicatamente il tampone sull'area da indagare;
- Allestire lo striscio facendo rotolare delicatamente il tampone su un vetrino.;
- Non spalmare il tampone sul vetrino con un movimento da un lato all'altro per non provocare la rottura e la scarsa conservazione delle cellule.

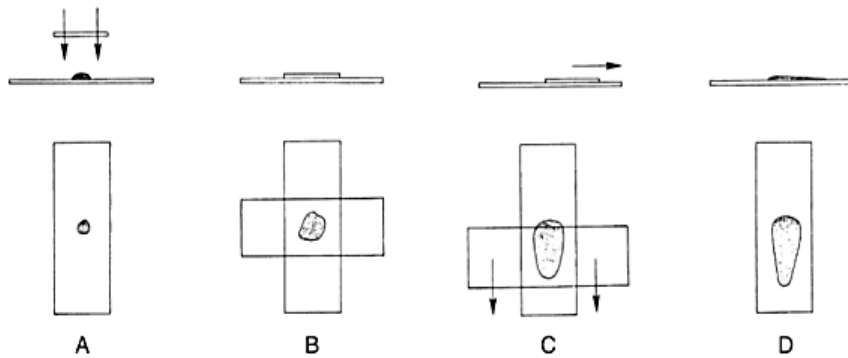
PREPARAZIONE DEI VETRINI

La preparazione del vetrino è un passaggio fondamentale per ottenere un monostato di elementi cellulari ben preservati in modo da poter essere identificati.

Si descrivono di seguito le tecniche più usate:

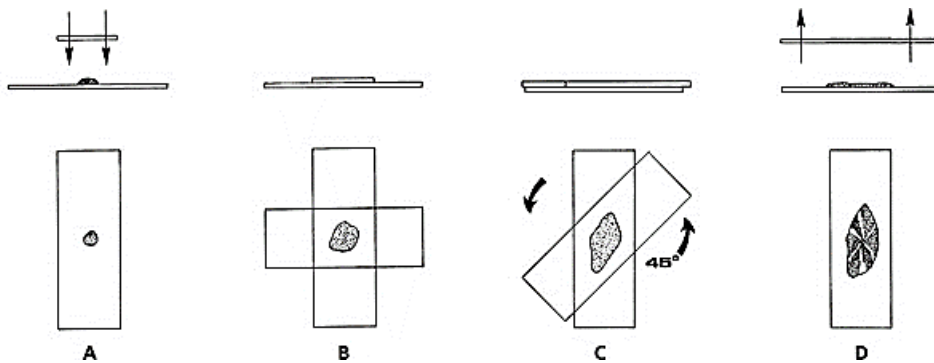
- **Squash-preparation (preparato per schiacciamento)**

Questa è la tecnica più utilizzata per allestire un preparato da masse solide. Il materiale raccolto viene delicatamente espulso vicino ad una estremità di un vetrino pulito. Un secondo vetrino è posizionato direttamente sopra il campione. Il contatto indurrà la distribuzione del materiale. Il secondo vetrino viene poi delicatamente mosso in direzione opposta favorendo una omogenea distribuzione del materiale. Se fatto correttamente, lo striscio dovrebbe avere una forma di fiamma che non si estende fino al bordo del vetrino.



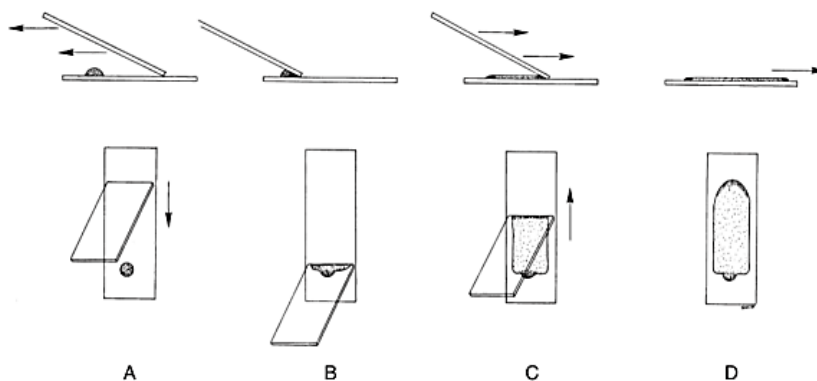
▪ **Squash-preparation modificata**

Porre l'aspirato sul vetrino e posizionare un altro vetrino sul campione in modo da far diffondere il materiale. Senza esercitare una pressione eccessiva, che provocherebbe la rottura delle cellule, ruotare il vetrino superiore di circa 45 gradi e sollevarlo verso l'alto.



▪ **Blood smear technique (tecnica dello striscio di sangue)**

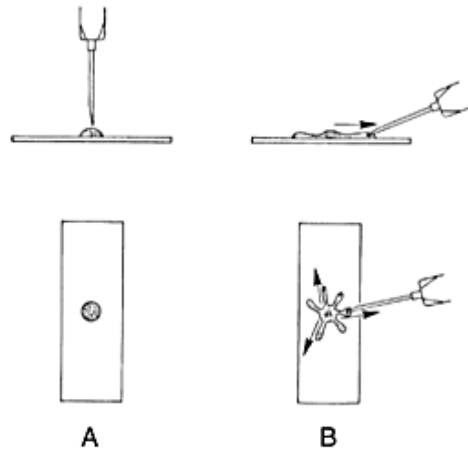
Il campione viene espulso dalla siringa vicino ad una estremità del vetrino. Il bordo corto del secondo vetrino viene posizionato davanti al campione, inclinato con un angolo di 45° rispetto al vetrino del campione e tirato indietro di circa un terzo rispetto a dove si trova il materiale aspirato. Il secondo vetrino viene quindi fatto scorrere in modo fluido e rapido in avanti, come viene fatto per gli strisci di sangue. Per ulteriori dettagli vedi SOP_CM_LDV_07.01 – Allestimento dello striscio ematico e da buffy coat.



▪ **Starfish preparation (preparati a stella marina)**

Un'altra tecnica per diffondere gli aspirati consiste nel trascinare il campione perifericamente in diverse direzioni con la punta di un ago realizzando una forma di stella marina. Questa tecnica tende a non danneggiare le cellule fragili, ma consente a uno spesso strato di fluido tissutale di rimanere attorno alle cellule.

A volte lo spesso strato di fluido impedisce alle cellule di diffondersi bene e interferisce con la valutazione dei dettagli cellulari. Di solito, tuttavia, sono presenti alcune aree accettabili.

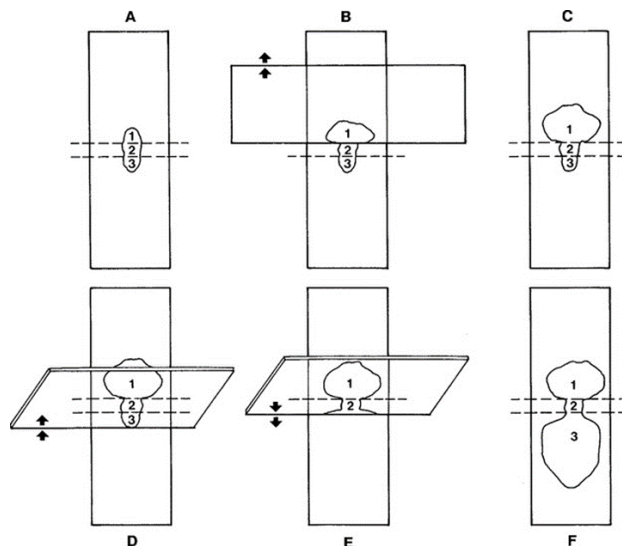


▪ **Tecnica combinata**

Una procedura combinata prevede l'uso di differenti metodiche di allestimento del vetrino con l'obiettivo di apprezzare al meglio tutte le caratteristiche cellulari del campione in esame.

Si procede ponendo l'aspirato al centro di un vetrino portaoggetto che viene tenuto saldamente su una superficie piana, solida e orizzontale. Posizionare il bordo di un secondo vetrino sulla superficie piana del primo vetrino davanti al campione con un angolo di 45 gradi. Tirare all'indietro per circa un terzo nell'aspirato. Far scorrere il secondo vetrino in avanti, dolcemente e rapidamente, come se si facesse uno striscio di sangue.

Successivamente, posizionare la superficie piana del vetrino di diffusione orizzontalmente sopra il terzo posteriore dell'aspirato ad angolo retto rispetto al vetrino di preparazione. Consentire al peso del secondo vetrino di distribuire il materiale, evitando di comprimere o di esercitare eccessiva pressione. Mantenendo il secondo vetrino piatto e orizzontale sul vetrino di preparazione, farlo scorrere rapidamente e senza incertezze.





La combinazione delle tecniche consente di ottenere diverse preparazioni sullo stesso vetrino. In particolare una preparazione per schiacciamento nel terzo posteriore, una preparazione per striscio con il campione delicatamente ed uniformemente disteso sul terzo anteriore, ed un'area dove il campione è intatto nel terzo medio. Questo consente di apprezzare tutte le potenziali caratteristiche del campione.

- Nel terzo posteriore, si dispongono gruppi di cellule più grandi e pesanti difficili da distendere
- Nel terzo anteriore (area di diffusione delicata) si dispongono cellule fragili senza danni eccessivi
- Nel terzo medio (non toccato) le cellule non sono state distese. L'osservazione di quest'area consente una valutazione generale più accurata rispetto alla cellularità (alta, bassa, molto bassa ecc..) ed alla tipologia di cellule predominante, nonché ad eventuali residui architetturali.

8. CONTROLLO QUALITÀ'

Non applicabile.

9. MANUTENZIONE

Non applicabile.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

I vetrini allestiti devono essere colorati (Vedi SOP_CM_LDV_08.01 - Colorazioni) e valutati microscopicamente.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3^A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.



STOCCAGGIO E TRACCIABILITÀ DEI CAMPIONI

Nome SOP:	CM_LDV_05.01	Pagine 4
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM) Laboratorio di Diagnostica Veterinaria (LDV),		Note
TITOLO Stoccaggio e tracciabilità dei campioni		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Version No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_05.01	originale			01/01/2023

1 SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui il campione deve essere gestito dopo essere stato processato nei Laboratori della Sezione di Clinica Medica. Precisa le procedure di stoccaggio e tracciabilità dello stesso, consentendone un rapido recupero nel caso fosse necessario sottoporlo ad ulteriori accertamenti. Questo consente sia un monitoraggio del contenuto dei singoli congelatori adibiti alla conservazione di campioni per la ricerca e la didattica, ma anche una costante attività di eliminazione di campioni obsoleti e pertanto non più utili ai fini diagnostici

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

La procedura operativa descritta si esegue nel Laboratorio 3 (Diagnostica Parassitologica) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Responsabile dello stoccaggio e tracciabilità dei campioni biologici processati presso i laboratori della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Medicina Veterinaria è il tecnico designato dal Responsabile di Laboratorio. In assenza del tecnico preposto il personale strutturato ne fa le veci.

4. MISURE DI SICUREZZA

Trattare tutti i campioni come potenzialmente pericolosi a rischio infettivo:

- Usare i DPI in ogni fase della loro manipolazione (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio).

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Non applicabile.

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP_CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Frigorifero Bosch economic cooler, locato in Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica;
- Freezer 1 Mod Bosch economic, locato in Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica;
- Freezer 2 Mod Bosch economic, locato in Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica;
- Freezer Whirlpool class A, locato in Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica;
- Eppendorf da 1,5/2ml;
- Pipette Pasteur monouso;
- Pipettatrici automatiche;
- Scatole portavetrini in plastica da 50 e 100 posti;
- PC di laboratorio, locato in Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica;
- Programma di gestione informatico in formato Excel caricato su PC di laboratorio in cui sono riportati;
- Criobox dedicati alla conservazione dei campioni identificati per:
 - Numero;
 - Colore;
 - Congelatore di destinazione;
 - Posizione all'interno del congelatore (cassetto);
 - Tipologia di campione;
 - Denominazione del progetto/ provenienza.
- Campioni stoccati suddivisi per tipologie:
 - Sangue;
 - Siero;
 - Urine;
 - Versamenti;

- Prelievi bioptici;
- Registro dei protocolli in formato cartaceo.

7. PROCEDURE

7.1 Stoccaggio dei campioni

- Tutti i campioni di sangue, siero, urine versamenti e prelievi bioptici che devono essere stoccati vanno aliquotati in eppendorf da 1,5ml o 2ml secondo le indicazioni del Responsabile di Sezione o titolare di progetto di ricerca.
- Le eppendorf devono riportare in etichetta:
 - Tipologia di campione;
 - Specie animale;
 - Nome dell'animale e del proprietario e/o Numero ID e nome del progetto;
 - Data di prelievo e/o Time point;
- I campioni devono essere inseriti nel Criobox specifico in una precisa posizione di allocamento.
- Sul coperchio del Criobox devono essere riportati:
 - Nome del progetto/ provenienza;
 - Tipologia del campione;
 - Specie animale;
 - Data di prelievo e/o Time point.
- L'elenco dei criobox e relativa posizione di allocamento devono essere riportati sull'anta esterna del congelatore;
- Dopo aver inserito il campione nel Criobox si deve procedere alla sua registrazione nel programma del gestionale:
 - L'accesso al sistema di gestione avviene tramite un ID e una password nota al solo personale tecnico, al responsabile di laboratorio ed al responsabile di Sezione:
 - Selezionare la cartella "Criobox";
 - Selezionare la cartella relativa al progetto/ provenienza;
 - Selezionare il foglio relativo alla tipologia di campione/ timepoint.
 - Inserire:
 - Numero progressivo;
 - Specie (es. "D" dog, "C" cat);
 - Tipologia del campione (es. "S" serum, "WB" whole blood, "P" plasma ecc....);
 - ID paziente e/o nome del paziente;
 - Razza, sesso, età, stato riproduttivo (se disponibili);
 - Nome del progetto e/o nome del proprietario;
 - Data del prelievo/ time point;
 - Esami svolti;
 - Referti e/o risultati.
 - Terminato l'inserimento, salvare i dati;
 - Chiudere il programma;
 - Spegner il computer di laboratorio.
- Nel caso in cui venga prelevata l'intera aliquota di un campione da un Criobox:
 - Selezionare la cartella "Criobox";
 - Selezionare la cartella relativa al progetto/ provenienza;
 - Selezionare il foglio relativo alla tipologia di campione/ timepoint;
 - Selezionare il campione prelevato;
 - Evidenziarlo in rosso;
 - Scrivere nota della data di esaurimento del campione e motivazione;
 - Terminato l'inserimento, salvare i dati;
 - Chiudere il programma;

- Spegnerne il computer di laboratorio.

7.2 Stoccaggio dei vetrini

- Pulire la superficie del vetrino dai residui di olio utilizzando batuffolo di cotone imbevuto di etanolo;
- Verificare che i dati riportati a matita sulla banda sabbata siano leggibili;
N.B. Se i dati dovessero risultare sbiaditi procedere a rimarcarli.
- Inserire il vetrino in apposita scatola portavetrini sul cui coperchio devono essere riportati:
 - Nome del progetto/ provenienza;
 - Tipologia del campione;
 - Specie animale;
 - Numero progressivo dei vetrini (es. da 1 a 100).
- Scrivere con penna nera o blu, sull'apposito elenco cartaceo interno alla scatola portavetrini in corrispondenza del numero di posizione del vetrino stoccato:
 - Nome del paziente e/o ID;
 - Nome del progetto e/o del proprietario;
 - Specie animale;
 - Tipologia del campione;
 - Diagnosi (se disponibile).
- Le scatole portavetrini vanno sempre richiuse dopo l'apertura e riposte nell'apposito armadietto sito nel laboratorio di pertinenza.

8. CONTROLLO QUALITA'

- Il tecnico di laboratorio incaricato o chi ne fa le veci è tenuto a seguire le procedure descritte nella presente SOP;
- L'accesso al sistema di gestione avviene tramite un ID e una password nota al solo personale tecnico, al responsabile di laboratorio ed al responsabile di Sezione;
- Il Responsabile di laboratorio vigila affinché tutte le procedure descritte vengano correttamente applicate.

9. MANUTENZIONE

- Il Computer di Laboratorio è sottoposto a procedure di backup annuali.
- Frigoriferi e congelatori sono sottoposti a costante monitoraggio (Vedi **SOP CM_LDV_02.01** – Monitoraggio temperature frigoriferi e congelatori).

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

I campioni che non necessitano di essere stoccati vanno smaltiti nei rifiuti speciali a rischio biologico.

11. REFERENZE

- DECRETO LEGISLATIVO 9 APRILE 2008, n. 81;
- DECRETO 5 Agosto 1998, n. 363.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI



DETERMINAZIONE DEL MICROEMATOCRITO

Nome SOP:	CM_LDV_06.01	Pagine 4
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note
TITOLO Determinazione del microematocrito		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalerà	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_06.01.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa SOP descrive come determinare correttamente il microematocrito con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso il Laboratorio di Ematologia della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. La determinazione del microematocrito permette di verificare l'ematocrito fornito durante l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico dallo strumento automatizzato, di valutare il colore del plasma e lo spessore del buffy coat e di effettuare lo striscio da buffy coat.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Ematologia e citologia (Laboratorio 1) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi SOP **CM_LDV_01.01**

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- Vedi SOP **CM_LDV_04.01** Ricezione e gestione dei campioni biologici.
- Il campione deve essere addizionato con anticoagulante (K3EDTA).
- Deve essere rispettato il rapporto campione/anticoagulante (un eccesso di anticoagulante porta al restringimento dei globuli rossi con microematocrito falsamente basso).
- Il campione deve essere accuratamente miscelato prima del riempimento del capillare.
- Il campione di sangue deve essere processato nel tempo più breve possibile e, possibilmente, senza essere refrigerato. Conservazione del sangue oltre le 6-8 ore comporta un aumento artefatto del microematocrito.

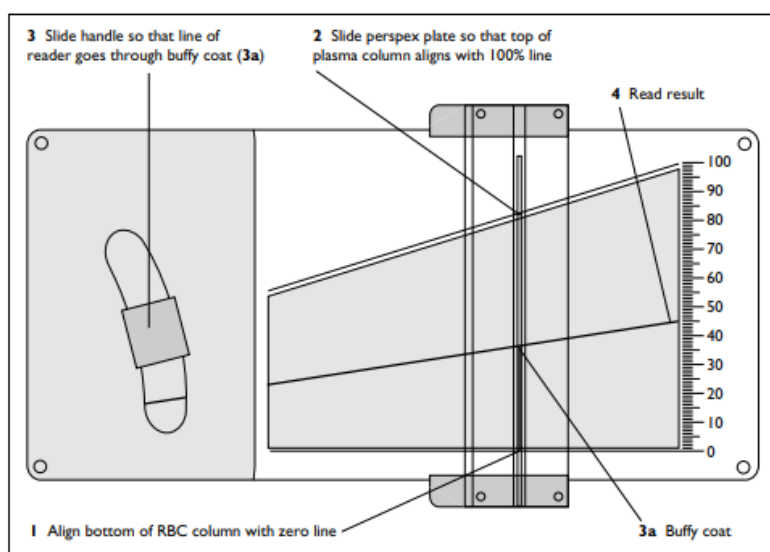
6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi SOP **CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Tubi capillari in vetro;
- Cera/plastilina per la sigillatura della base del capillare.
- Carta asciugamani.
- Centrifuga da microematocrito ([Thermo Scientific MicroCL](#)).
- Lettore per microematocrito.

7. PROCEDURA

- Mescolare adeguatamente il campione raccolto in provetta K3EDTA;
- Inclinare la provetta e porre il capillare da microematocrito nella provetta.
- Riempire il capillare fino al 75-80% circa del suo volume.
- Tappare l'estremità prossimale del capillare con un dito.
- Pulire la superficie esterna del capillare con carta asciugamani.
- Tappare l'estremità distale con apposita cera/plastilina.
- Inserire il capillare in centrifuga da microematocrito con parte con tappo di cera rivolto verso l'esterno.

- Bilanciare con altro capillare.
- Annotare la posizione di ciascun capillare.
- Chiudere il coperchio interno della centrifuga e quello esterno.
- Centrifugare per 5 minuti, o 8 minuti a seconda della specie, a velocità di 12.000 giri al minuto.
- A fine centrifugazione rimuovere i capillari e porli in posizione verticale finché non vengono letti.
N.B Sulla base inferiore del capillare si saranno stratificati gli eritrociti, poi il buffy coat (leucociti e piastrine) e infine il plasma.
- Controllare il colore del plasma (emolizzato? itterico? lipemico?) e lo spessore del buffy coat e prendere nota delle osservazioni.
- Posizionare il tubo capillare nella scanalatura sul cursore del lettore per microematocrito. Regolarlo in modo che la parte inferiore dello strato di globuli rossi sia a livello della linea inferiore ("0") (non il bordo dell'area nera) (vedi figura).
- Spostare il cursore orizzontalmente fino a quando la parte superiore dello strato di plasma è a livello della linea superiore ('100') (non il bordo dell'area nera).
- Muovere la manopola posta a sinistra del lettore la linea di lettura bianca (manopola a sinistra) in modo che intersechi la separazione tra i globuli rossi e il buffy coat.
- Leggere il risultato sulla scala a destra.
- Annotare il risultato.



8. CONTROLLO QUALITA'

Procedura di controllo semestrale

- Riempire due tubi capillari con un normale prelievo di sangue.
- Centrifugare per cinque minuti.
- Leggere il microematocrito.
- Riempire altre due capillari e centrifugare per sei minuti.
- Leggere il microematocrito.
- Ripetere la procedura per 7 e 8 minuti.
- Leggere il microematocrito. Se la centrifuga è funzionante, tutti i capillari daranno la stessa lettura +2%. In caso contrario richiedere assistenza.

9. MANUTENZIONE

- Controllare l'interno della centrifuga alla fine di ogni utilizzo e comunque sempre a fine giornata.
- Se si sono verificate perdite o rotture dei capillari:
 - Pulire lo strumento indossando i guanti.
 - Rimuovere i pezzi di vetro con una pinza.
 - Pulire il rotore e le parti esposte con soluzione di ipoclorito al 10%.
 - Lasciare agire per 10 minuti.
 - Pulire con acqua.
 - Asciugare.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- Gettare i tubi capillari usati nel contenitore per i rifiuti speciali taglienti.
- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI



ALLESTIMENTO STRISCIO EMATICO E DA BUFFY COAT

Nome della SOP:	CM_LDV_07.01	Pagine 6
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO	Allestimento striscio ematico e da buffy coat	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_07.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente uno striscio da sangue intero o da buffy coat con l'obiettivo di garantire la maggiore accuratezza del risultato diagnostico e la sicurezza degli operatori che lavorano presso Laboratorio di Ematologia della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. L'esecuzione di uno striscio ematico è parte complementare di un esame emocromocitometrico e la sua valutazione è necessaria per verificare la conta differenziale dei leucociti fornita dalla contaglobuli automatizzata, valutare la morfologia delle cellule ematiche ed evidenziare eventuali emoparassiti. L'allestimento di uno striscio da buffy coat è sempre utile per effettuare ulteriori e più dettagliate valutazioni sui leucociti e per evidenziare eventuali emoparassiti.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Ematologia e citologia (Laboratorio 1) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili della corretta esecuzione.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza dei laboratori

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici.
- Vedi **SOP CM_LDV_06.01** - Determinazione del microematocrito.
- Il campione deve essere stato addizionato con anticoagulante (K3EDTA).
- Deve essere rispettato il rapporto campione/anticoagulante.
- Il campione di sangue deve essere processato nel tempo più breve possibile e possibilmente senza essere refrigerato, preferibilmente entro un'ora dal prelievo in modo da evitare alterazioni morfologiche indotte dal lungo contatto del sangue con l'anticoagulante (es. echinocitosi, degenerazione dei globuli bianchi, aggregazione piastrinica ecc.).
- Se conservato in frigo il campione va riportato a temperatura ambiente prima di allestire lo striscio.
- Lo striscio da buffy coat deve essere effettuato immediatamente dopo la lettura del microematocrito (la procrastinazione dell'allestimento a tempi troppo lunghi provoca un eccessivo impacchettamento delle cellule con conseguente difficoltà di recuperare il campione dal capillare).

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio).
- Pipette monouso.
- Vetrini portaoggetti sgrassati (etanolo 90°), molati e con doppia banda smerigliata.
- Vetrini coprioggetto (24x60mm).
- Matita.
- Tubi capillari in vetro, non eparinizzati.
- Carta asciugamani.
- Centrifuga da microematocrito ([Thermo Scientific MicroCL](#)).

7. PROCEDURA

7.1 Esecuzione di strisci da sangue intero

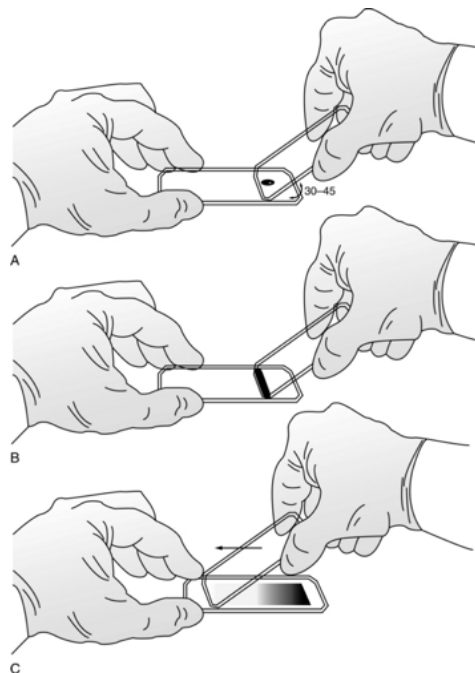
- Preparare 2 vetrini (vetrino di supporto e vetrino diffusore).
- Sistemare i vetrini su una superficie piana non scivolosa (meglio se su un telo o un foglio di carta ruvida) per evitare che si muovano durante l'esecuzione della manualità.
- Miscelare adeguatamente e delicatamente il campione per garantire l'omogeneità del campione da prelevare.
- Deposporre con una pipetta monouso una piccola quantità di sangue (5-10 μ L) al centro dell'estremità prossima alla banda sabbata del vetrino portaoggetti.

N.B. La dimensione della goccia di sangue è importante: una goccia troppo abbondante crea uno striscio lungo o spesso, mentre una goccia troppo piccola dà origine ad uno striscio corto o troppo sottile.

- Porre un altro vetrino molato, inclinato di 30-45° rispetto al precedente, davanti alla goccia.
- Tornare indietro e far diffondere il sangue per capillarità lungo tutto il margine di contatto tra i due vetrini.
- Far scorrere il secondo vetrino sul primo in modo uniforme, fino a completo esaurimento della goccia di sangue.

N.B. È essenziale mantenere un angolo costante tra vetrino portaoggetti e vetrino diffusore e una pressione uniforme e delicata. Spesso è necessario regolare l'angolo tra i vetrini per produrre uno striscio soddisfacente. Per campioni con ematocrito superiore al normale, l'angolo di inclinazione tra i due vetrini deve essere ridotto in modo che lo striscio non sia troppo corto e spesso. Per campioni con ematocrito molto basso, l'angolo di inclinazione deve essere aumentato.

N.B. È importante che l'intera goccia di sangue venga raccolta e diffusa con la giusta velocità: effettuare uno scorrimento lento accentua la scarsa distribuzione dei leucociti spingendo le cellule più grandi, come monociti e granulociti, fino alla fine e ai lati dello striscio.



- Una volta allestito agitare il vetrino all'aria per pochi secondi fino a completa essiccazione (non usare fissativi).

N.B. Il vetrino diffusore deve essere lavato in acqua ed asciugato regolarmente e deve essere sostituito periodicamente dal momento che il suo margine può usurarsi e diventare irregolare.

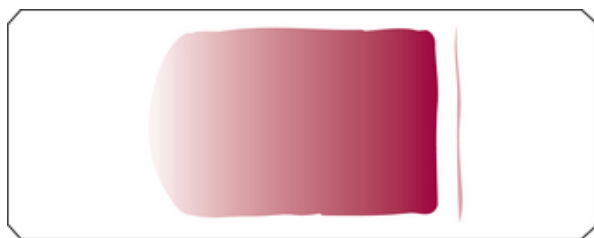
- Riportare a matita, sulla banda sabbata il cognome del proprietario, il nome dell'animale, la specie e la data prelievo.

N.B. Non usare penne o pennarelli, né attaccare etichette per evitare di perdere le informazioni al momento della colorazione del campione.

- Conservare il vetrino al riparo dalla luce e dalla polvere.
- La colorazione (vedi SOP **CM_LD**V_08.01 - Colorazioni) può essere differita nel tempo anche per più giorni, per tempi superiori fissare il vetrino con metanolo per 10/15 minuti.

Uno striscio di sangue periferico ben fatto deve dunque avere le seguenti caratteristiche:

- Lo striscio dovrebbe estendersi per circa due terzi della lunghezza del vetrino.
- Essere leggermente arrotondato sul bordo della coda (porzione sottile).
- Avere i bordi laterali visibili
- Apparire liscio senza irregolarità, buchi o striature.

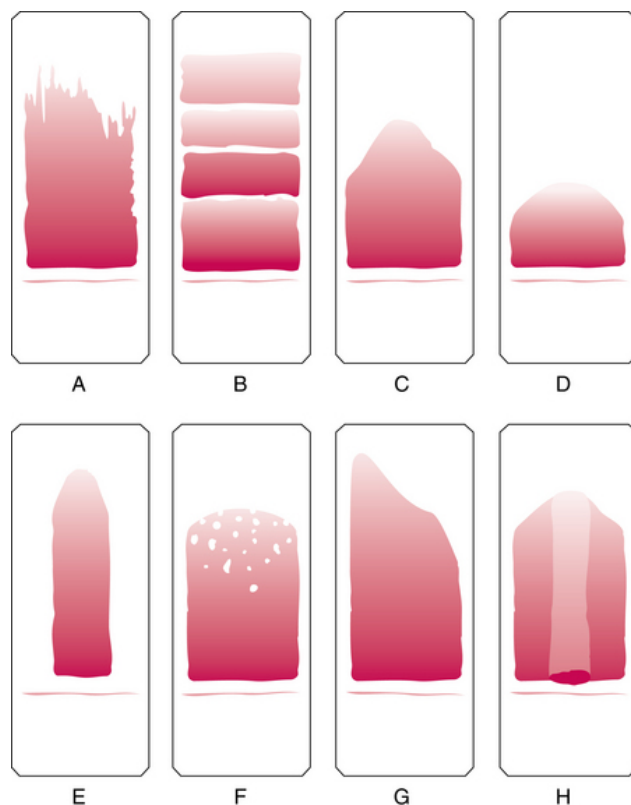


7.1.1 Errori da evitare

Spesso gli errori di allestimento dello striscio ematico sono tali da rendere completamente inadeguato il campione. In questi casi il rischio di fare delle valutazioni distorte o completamente errate è tale da portare il laboratorista ad eliminare il campione, privando il clinico di elementi diagnostici preziosi.

Vengono mostrati gli aspetti di strisci ematici associati agli errori più comuni.

Si noti come una combinazione di più cause può essere responsabile di preparati inaccettabili.



A, bordo scheggiato o ruvido del vetrino diffusore sul vetrino portaoggetti.

- B, Esitazione nel movimento in avanti del vetrino diffusore
- C, Avanzamento troppo rapido del vetrino diffusore.
- D, Goccia di sangue troppo piccola.
- E, Goccia di sangue non correttamente diffusa sulla larghezza del vetrino.
- F, Sporco o grasso sul vetrino; può anche essere causato da lipidi elevati nel campione di sangue.
- G, Pressione irregolare sul portaoggetti con il vetrino diffusore, da parte dell'operatore.
- H, Ritardo nell'effettuazione dello striscio: goccia di sangue in fase di asciugatura.

7.2 Esecuzione di strisci da buffy coat

- Allestire un capillare da microematocrito (Vedi SOP **CM_LDV_06.01** – Determinazione del microematocrito).
- Posizionare il capillare su un piano orizzontale
- Tagliare il capillare all'altezza del livello degli eritrociti subito al di sotto del buffy coat
- Far scivolare il buffy coat su un vetrino portaoggetti, subito dopo la banda sabbiata.
N.B. Fare in modo che con il buffy non scenda anche il plasma.
- Inclinare il vetrino coprioggetti o portaoggetti molato di 30-45° rispetto al precedente ed appoggiarlo davanti alla goccia.
- Tornare indietro e raccogliere il buffy coat con il secondo vetrino.
- Far scorrere immediatamente il secondo vetrino sul primo in modo uniforme, fino a completo esaurimento del campione.
- Il preparato, se ben allestito deve apparire distribuito in una sottile striscia al centro del vetrino portaoggetti.
- Asciugare all'aria.
- Una volta asciutto procedere con la colorazione (Vedi SOP **CM_DLV_08.01** - Colorazioni).
- Gettare i tubi capillari usati nel contenitore per i rifiuti speciali taglienti a rischio biologico.
- Eliminare il vetrino diffusore, se usurato, nel contenitore per i rifiuti taglienti a rischio biologico.

8. CONTROLLO QUALITA'

Non applicabile.

9. MANUTENZIONE

Vedi SOP **CM_LDV_02.01** Monitoraggio delle temperature di frigoriferi e congelatori.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

!2. ALLEGATI



COLORAZIONI

Nome della SOP:	CM_LDV_08.01	Pagine 5
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO Colorazioni		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_08.01	originale			01/01/2023



1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente le colorazioni per l'osservazione microscopica di strisci ematici o campioni citologici, con l'obiettivo di garantire accuratezza risultati rapidi e di qualità e la sicurezza per gli operatori che lavorano nei laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Diagnostica parassitologica (Laboratorio 3) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono responsabili dell'applicazione corretta delle procedure.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio per lo stoccaggio degli infiammabili e lo smaltimento dei coloranti impiegati come rifiuti liquidi pericolosi.

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici.

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DP Individuali e collettivi (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio)
- Colorante May-Grunwald
- Colorante Giemsa
- Soluzione tampone A+B a pH 7.0 (vedi punto 6.1)
- Soluzione tampone B+C a pH 7.0 (Vedi punto 6.2)
- Vaschetta per la colorazione con cestello
- Bottiglia per lavaggio
- Pipette monouso
- Carta bibula
- Vaschetta per la colorazione
- Bacchette portavetrini
- Pinza per vetrini a punte piatte
- Acqua distillata
- Diff-Quik kit:
 - Colorante A (soluzione di alcool metilico)
 - Colorante B (eosina in tampone fosfato)
 - Colorante C (colorante tiazinico in tampone fosfato)
- Liquido di montaggio (Eukitt) (opzionale)

6.1 Soluzione A+B

Si ottiene a partire dalle due soluzioni A e B

- Soluzione A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (9,2g/L)
- Soluzione B: NaH_2PO_4 (9,5 g/L)



Una volta preparate le due soluzioni vanno conservate in bottiglie, a tenuta ermetica, in frigorifero, con l'indicazione della data di preparazione e il nome dell'operatore che le ha preparate. La Soluzione A+B si ottiene unendo 39 ml di soluzione A a 61 ml di soluzione B. Una volta preparata la soluzione A+B va stoccata in una bottiglia a tenuta ermetica e conservata in frigorifero, con l'indicazione della data della ricostituzione e il nome dell'operatore che le ha preparate.

6.2 Soluzione B+C

Si ottiene preparando le soluzioni B e C:

- Soluzione B: NaH_2PO_4 (9,5 g/L)
- Soluzione C: KH_2PO_4 (9,08 g/L)

Una volta preparate le due soluzioni vanno conservate in bottiglie, a tenuta ermetica, in frigorifero, con l'indicazione della data di preparazione e il nome dell'operatore che le ha preparate. La Soluzione B+C si ottiene unendo 39 ml di soluzione C a 61 ml di soluzione B.

Una volta preparata la soluzione B+C va stoccata in una bottiglia a tenuta ermetica e conservata in frigorifero, con l'indicazione della data della ricostituzione e il nome dell'operatore che le ha preparate.

7. PROCEDURE

7.1 Colorazione di May-Grunwald Giemsa modificata

- Posizionare il preparato sulle bacchette a loro volta poste sulla vaschetta per raccogliere i coloranti che sversano;
- Con una pipetta monouso versare 2ml di May-Grunwald sul vetrino, coprendolo interamente e lasciare agire per 5 minuti;
- Aggiungere, senza versare il primo colorante, 2 ml di soluzione A+B;
- Lasciare agire per 1 minuto;
- Eliminare tutto il liquido senza effettuare alcun lavaggio;
- Con una pipetta monouso versare 2ml di Giemsa preventivamente diluito in rapporto di 1:10, coprire interamente il vetrino e lasciare agire per 5 minuti;

N.B. Il Giemsa deve essere preparato immediatamente prima dell'utilizzo;

- Lavare rapidamente ed abbondantemente con acqua distillata;
- Effettuare una decolorazione rapida con etanolo diluito 2:1 in acqua tamponata;
- Sciacquare abbondantemente con acqua di fonte;
- Lasciare asciugare i vetrini verticalmente su carta bibula (non utilizzare fonti di calore, stufa o piastra).

N.B. I preparati così colorati possono essere montati con liquido di montaggio per una migliore conservazione.

7.2 Colorazione di May-Grunwald Giemsa su bacchette per citologici

- Posizionare il preparato sulle bacchette a loro volta poste sulla vaschetta per raccogliere i coloranti che sversano;
- Con una pipetta monouso versare 3ml di May-Grunwald sul vetrino, coprendolo interamente e lasciare agire per 6 minuti;
- Sciacquare rapidamente con soluzione A+B;
- Con una pipetta monouso versare 3ml di Giemsa preventivamente diluito in rapporto di 1:15 coprendo interamente il vetrino e lasciare agire per 40 minuti (o in alternativa 3ml di Giemsa diluito 1:10 per 20 minuti);
- Lavare rapidamente ed abbondantemente con acqua distillata;
- Lasciare asciugare i vetrini verticalmente su carta bibula (non utilizzare fonti di calore, stufa o piastra).



N.B. I preparati così colorati possono essere montati con liquido di montaggio per una migliore conservazione.

7.3 Colorazione di Giemsa in vaschetta

- Fissare il preparato con alcool metilico per 10 /15 minuti e porlo nel cestello;
- Preparare la soluzione di Giemsa, diluita 1:10 con soluzione B+C;
- Filtrare la soluzione di Giemsa due volte ;
- Riempire la vaschetta con la soluzione di Giemsa;
- Immergere il cestello con i vetrini nella vaschetta per 60 minuti;
- Sciacquare due volte immergendo rapidamente il cestello in vaschette contenenti acqua di fonte;
- Togliere i vetrini dal cestello e lasciarli asciugare verticalmente (non utilizzare fonti di calore, stufa o piastra).

N.B. I preparati così colorati possono essere montati con liquido di montaggio per una migliore conservazione.

7.4 Colorazione Diff-Quik

- Immergere il vetrino 5 volte per 1 secondo nel colorante A. Dopo ogni immersione, allontanare il colorante in eccesso scuotendo il vetrino;
- Immergere il vetrino 5 volte per 1 secondo nel colorante B. Come nel passaggio precedente e dopo ogni immersione attendere l'eliminazione del colorante in eccesso;
- Infine, immergere il vetrino 5 volte per 1 secondo nel colorante C. Dopo ogni immersione, attendere l'eliminazione del colorante in eccesso;
- Lavare con acqua di fonte;
- Risciacquare lo striscio con acqua distillata;
- Lasciare asciugare in posizione verticale su carta bibula (non utilizzare fonti di calore, stufa o piastra).

7.5 Colorazione con nuovo blu di metilene (Per la conta dei reticolociti)

Questa colorazione si effettua per la conta manuale dei reticolociti necessaria per valutare la capacità eritropoietica del midollo in corso di anemia.

N.B. Effettuare la conta reticolocitaria preferibilmente su campioni freschi, raccolti da meno di 6 ore.

- Miscelare in parti uguali il sangue intero ed una soluzione fisiologica contenente lo 0,5% di Nuovo blu di metilene;
- Lasciare riposare a temperatura ambiente per 15/20 minuti;
- Miscelare nuovamente;
- Eseguire lo striscio con questa miscela come fosse uno striscio da sangue intero (vedi **SOP CM_LDV_07.01-** Allestimento dello striscio ematico e da buffy coat);
- Lasciare asciugare il vetrino prima di osservarlo al microscopio.

N.B. I preparati così colorati possono essere montati con liquido di montaggio per una migliore conservazione.

8. CONTROLLO QUALITA'

- Non usare i coloranti oltre la data di scadenza riportata sulla confezione;
- Non mescolare i prodotti di lotti differenti;
- Seguire le normali raccomandazioni di sicurezza necessarie al campionamento, alla manipolazione ed al trattamento di campioni biologici e di tutto ciò che è stato in contatto con il paziente. Chiudere sempre le bottiglie contenenti i coloranti in modo da evitarne l'evaporazione;

- Sostituire i coloranti dopo 20/25 colorazioni ed ogni qualvolta appaiano macroscopicamente contaminati.

9. MANUTENZIONE

La cappa chimica viene sottoposta a revisione periodica calendarizzata seguendo le indicazioni della ditta produttrice;

I documenti di revisione sono disponibili a tutto il personale di laboratorio e responsabile per la sicurezza (UO) e ben visibili sulla parete laterale della cappa.

CAMPIONE DOPO IL TEST

Non applicabile.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

!2. ALLEGATI



LETTURA STRISCIO EMATICO

Nome della SOP:	CM_LDV_09.01	Pagine 6
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM). Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV),		Note:
TITOLO Lettura striscio ematico		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavallera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_09.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente la lettura dello striscio ematico con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso il Laboratorio di Ematologia della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. La lettura dello striscio ematico integra l'esame emocromocitometrico automatizzato in quanto permette di effettuare la formula leucocitaria manuale e ottenere ulteriori informazioni rispetto a quelle fornite dallo strumento.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Ematologia e citologia (Laboratorio 1) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- Il campione di sangue deve essere idoneo (Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici);
- Lo striscio deve essere ben allestito (Vedi **SOP CM_LDV_07.01** – Allestimento dello striscio ematico e da buffy coat)
- Il vetrino deve essere adeguatamente colorato (Vedi **SOP CM_LDV_08.01** – Colorazioni).

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Microscopio ottico [Nikon eclipse Ci - H550 L](#);
- Microscopio ottico [Leica DM750](#);
- Olio sintetico per obiettivi ad immersione;
- Alcool denaturato;
- Carta asciugamani;
- Portavetrini.

7. PROCEDURE

7.1 Accendere il microscopio;

- Posizionare il vetrino sul tavolino;
- Ridurre l'apertura del diaframma e luminosità per evitare di essere abbagliati;
- Controllare la distanza tra gli oculari (deve essere analoga allo spazio interpupillare dell'operatore);
- Posizionare il condensatore alla sua massima altezza;
- Osservare al microscopio a basso ingrandimento (10X) per valutare:
 - Qualità della colorazione;
 - Presenza di aggregati piastrinici;
 - Presenza di emoparassiti (es. microfilarie).

- Procedere con l'osservazione del resto dello striscio) al fine di:
 - Individuare l'area ottimale (monostrato) per l'esame a maggiore ingrandimento.

N.B Nel monostrato le cellule sono distribuite uniformemente e ben diffuse. In genere si osserva tra il corpo e la coda dello striscio di sangue e la sua corretta individuazione è fondamentale per eseguire un corretto conteggio differenziale dei leucociti e tutte le valutazioni a carico delle cellule.
- Verificare che i leucociti siano distribuiti uniformemente in tutto lo striscio e non eccessivamente concentrati sul bordo sfumato;

N.B. In alcuni strisci eseguiti male, la maggior parte dei leucociti viene trascinata fino alla fine dello striscio (di solito quando lo striscio viene eseguito troppo lentamente). In questo caso, se possibile, preparare un altro striscio e muovere più rapidamente il vetrino di diffusione, in modo da diffondere i globuli bianchi in modo più uniforme.
- Una volta individuata l'area ottimale, passare a un ingrandimento maggiore (obiettivo 40-100 x).

7.2 Eseguire il conteggio differenziale dei leucociti:

- Iniziare il conteggio muovendosi avanti e indietro attraverso lo striscio in uno schema che eviti di coprire la stessa area. In alternativa spostarsi lateralmente o longitudinalmente attraverso lo striscio.
- Identificare ogni leucocita che si incontra fino a quando non sono state contate, e ordinate per tipo, 100 cellule;



- Calcolare la percentuale di ogni tipo di cellula (neutrofili, linfociti, monociti, eosinofili e basofili);
- Se presenti includere il numero di neutrofili immaturi (banda, metamielociti e mielociti);
- Calcolare il valore assoluto di ogni tipo cellulare moltiplicando la percentuale di ciascun tipo di cellula per il totale dei globuli bianchi (in migliaia/ μL).
- Segnalare la presenza nei neutrofili di alterazioni tossiche (basofilia citoplasmatica, corpi di Döhle, vacuolizzazione citoplasmatica, granulazioni tossiche). Indicare come poche, moderate o marcate;
- Segnalare la presenza di linfociti reattivi e indicarli come pochi, moderati o molti;
- Segnalare la presenza di cellule che normalmente non dovrebbero essere presenti nel sangue (es. blasti leucemici, mastociti, istiociti, macrofagi reattivi).
- Segnalare la presenza di agenti infettivi (ad es. *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp.)

7.3 Fare una stima del numero delle piastrine e valutare la morfologia delle piastrine:

- Contare le piastrine in 10 campi con l'obiettivo 100x

N.B. A questo ingrandimento nella maggior parte delle specie, si contano una media di 12-15 piastrine per campo 100x, che equivale a 180-225.000 piastrine/ μL . I cavalli hanno generalmente una conta piastrinica inferiore rispetto ad altre specie; quindi, una media di 6 piastrine rientra negli intervalli di riferimento per i cavalli, pari a una conta piastrinica di 90.000/ μL .
- Indicare la stima effettuata come:
 - Aumentata: il conteggio è superiore all'intervallo di riferimento per la specie.
 - Adeguata: il conteggio rientra nell'intervallo di riferimento per la specie.
 - Bassa/ inadeguata: il conteggio è inferiore all'intervallo di riferimento per la specie.
 - Molto bassa/gravemente inadeguata: la conta piastrinica è molto al di sotto dei limiti.

- Segnalare la presenza di eventuali aggregati piastrinici che renderebbero la stima piastrinica non corretta;
- Valutare le dimensioni (micro, macropiastrine) e la granularità (normale o diminuita);
- Segnalare la presenza di eventuali agenti infettivi (es. *Anaplasma platys*).

7.4 Eseguire la valutazione morfologica degli eritrociti (obiettivo 40x e/o 100x):

- Valutare la forma e segnalare eventuali anomalie (acantociti, echinociti, eccentricociti, cheratociti, schistociti, sferociti, ovalociti, cellule bersaglio, stomatociti. Indicare come: pochi, moderati o molti;
- Valutare le dimensioni (macroцити, microцити). Indicare come: pochi, moderati o molti;
- Valutare l'anisocitosi: indicare come lieve, moderata o marcata;
- Valutare il colore (ipocromasia, policromasia). Indicare come lieve, moderata o marcata;
- Segnalare l'eventuale presenza di Inclusioni (punteggiature basofile (RNA), corpi di Howell-Jolly (residui nucleari), corpi di Heinz (emoglobina ossidata). Indicare come: pochi, moderati o molti;
- Segnalare se è presente agglutinazione o rouleaux. Indicare come lieve, moderata o marcata;
- Segnalare eventuali agenti infettivi (*Babesia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.*);
- Se presenti contare gli eventuali eritrociti nucleati senza includerli nella formula leucocitaria
N.B. In caso di policromasia effettuare la colorazione con il nuovo blu di metilene (vedi **SOP CM_LDV_08.01** - Colorazioni) che mette in evidenza il reticolo formato dai ribosomi aggregati, mitocondri ed organuli presenti nelle cellule immature, reticolo che scompare con la maturazione degli eritrociti, e contare i reticolociti ed eventualmente calcolare l'indice di produzione reticolocitario (RPI)(vedi punto 7.5).

7.5 Conteggio dei reticolociti e calcolo dell'RPI

- Contare i reticolociti su un totale di 1000 eritrociti per ottenere la percentuale relativa
 - Moltiplicare la percentuale relativa per il numero totale dei globuli rossi per ottenere il valore assoluto
N.B. Si considera rigenerativa una conta assoluta superiore a:
 - 80.000/ μ l per il cane
 - 60.000/ μ l per il gatto
- Il grado di rigenerazione potrà essere lieve, moderato o marcato in base al numero assoluto dei reticolociti.
- Per il cane correggere la percentuale relativa in funzione dell'ematocrito:
$$\text{Percentuale corretta} = \text{percentuale relativa} \times \frac{\text{ematocrito paziente}}{\text{ematocrito medio di specie}}$$

Dividere la percentuale corretta per il tempo di maturazione, in giorni, previsto in base all'ematocrito (il tempo di maturazione aumenta con il diminuire dell'ematocrito).
Con questa correzione si ottiene l'indice di produzione reticolocitaria che indicherà una rigenerazione se superiore a 1.

7.6 Terminata la lettura:

- Spegnerne il microscopio;
- Rimuovere i residui di olio ad immersione dalle lenti degli obiettivi con un batuffolo imbevuto di alcool;
- Disinfettare gli oculari con alcool al 70%;
- Coprire il microscopio con apposita copertura.

8. CONTROLLO QUALITA'

Non applicabile

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica quotidianamente

- Il corretto spegnimento e la pulizia delle lenti dei microscopi; annualmente
- Le date di revisione e manutenzione ordinaria dei microscopi.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

Vetrini da conservare:

- Pulire la superficie del vetrino dai residui di olio utilizzando batuffolo di cotone imbevuto di etanolo;
- Verificare che i dati riportati a matita sulla banda sabbata siano leggibili;
N.B. Se i dati dovessero risultare sbiaditi procedere a rimarcarli.
- Inserire il vetrino in apposita scatola portavetrini sul cui coperchio devono essere riportati:
 - Nome del progetto/ provenienza;
 - Tipologia del campione;
 - Specie animale;
 - Numero progressivo dei vetrini (es. da 101 a 200).
- Scrivere con penna nera o blu, sull'apposito elenco cartaceo interno alla scatola portavetrini in corrispondenza del numero di posizione del vetrino stoccato:
 - Nome del paziente e/o ID;
 - Nome del progetto e/o del proprietario;
 - Specie animale;
 - Tipologia del campione;
 - Diagnosi (se disponibile).**N.B.** Le scatole portavetrini vanno sempre richiuse dopo l'apertura e riposte nell'apposito armadietto sito nel laboratorio di pertinenza.

Vetrini da eliminare:

- Smaltire nell'apposito contenitore per i rifiuti speciali taglienti a rischio biologico.

11. REFERENZE

Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.

S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.

CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61.

MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);

World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI

ESAME EMOCROMOCITOMETRICO CON ANALIZZATORE

Nome SOP:	CM_LDV_10.01	Pagine 5
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note
TITOLO Esame emocromocitometrico con analizzatore		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavallera	DVM, PhD	01/01/2023	

Storia del documento				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_10.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa descrive come effettuare un esame emocromocitometrico con un analizzatore l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza dei lavoratori che operano presso il laboratorio di Ematologia dell' Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

L'esame emocromocitometrico è uno degli esami di laboratorio più frequentemente richiesti e fa parte dello studio di base necessario per l'orientamento diagnostico e la valutazione del paziente, per monitorare la progressione della malattia e/o l'efficacia della terapia, ma anche per valutare lo stato di salute generale di un animale.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Ematologia e citologia (Laboratorio 1) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Tutte le procedure descritte di seguito devono essere svolte nel rigoroso rispetto delle norme di biosicurezza utilizzando i dispositivi di protezione individuali (DPI) (vedi **SOP CM_LDV_01.01**- Sicurezza di laboratorio).

Tutti reagenti necessari alla procedura diagnostica, noti o sospetti di essere tossici o dannosi per l'ambiente devono essere smaltiti seguendo le procedure di smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Raccogliere in appositi contenitori, contrassegnati con etichette, i composti chimici e i solventi usati, che devono essere eliminati come rifiuti pericolosi.

Nessuna sostanza chimica tossico-nociva per l'ambiente può essere eliminata attraverso le fognature.

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici;
- Il campione deve essere con anticoagulante (K3EDTA);
- Deve essere rispettato il rapporto campione/anticoagulante;
- Il campione di sangue deve essere accuratamente miscelato sia subito dopo il prelievo (per evitare la formazione di coaguli) sia prima di essere processato per garantire l'omogeneità delle popolazioni cellulari;
- Il campione di sangue deve essere esaminato nel tempo più breve possibile e possibilmente senza essere refrigerato, preferibilmente entro un'ora dal prelievo in modo da evitare alterazioni morfologiche indotte dal lungo contatto del sangue con l'anticoagulante (es. echinocitosi, degenerazione dei globuli bianchi, aggregazione piastrinica ecc.);
- Se conservato in frigo il campione va riportato a temperatura ambiente prima di essere analizzato;

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Analizzatore automatico (Cell Dyn 3700)

7. PROCEDURA

7.1 Accensione Cell Dyn 3700

L'analizzatore per ematologia CELL DYN 3700 è collegato alla rete elettrica e alla stazione operativa, costituita dal computer, con programma ematologico dedicato, monitor, tastiera e stampante.

I tasti operativi F1 – F8 sono localizzati sulla tastiera e corrispondono a tasti non operativi posti lungo la parte inferiore del monitor, che indicano i diversi menù.

- A strumento spento, accendere l'analizzatore con il pulsante situato sul laterale sx dello strumento e di seguito il computer, il monitor e la stampante. Lo strumento avvia automaticamente l'inizializzazione.
- Al termine di questo processo premere il tasto F2, corrispondente al "Run" sulla base del monitor. L'analizzatore effettuerà un conteggio di "Background".
- Verificare che il "Background" sia accettabile. In caso contrario ripetere il ciclo toccando la piastra di contatto posta dietro l'ago aspiratore e se i risultati dei conteggi di "Background" non sono soddisfacenti consultare il manuale (capitolo 10) per individuare e risolvere i problemi relativi ai conteggi di "Background". Risolti gli eventuali problemi relativi al "Background" al di fuori delle specifiche, sul pannello di stato dello strumento appare "Ready" e lo strumento è pronto per l'analisi del campione.

7.2 Analisi del campione

- Con il tasto operativo F2, corrispondente ad "Animal type" sulla base del monitor, scegliere la specie da analizzare dalla lista di animali visualizzata;
- Confermare la scelta con il tasto F4, "Select animal";
- Premere il tasto F8 "Return", per ritornare alla videata principale;
- Inserire l'anagrafica del campione e procedere al test;
- Miscelare accuratamente il campione di sangue;
- Procedere all'aspirazione automatica dello stesso, ponendo il campione sotto l'ago di aspirazione e premendo la piastra di contatto posta dietro lo stesso;
- Un segnale acustico indica che l'aspirazione è stata completata e si può togliere la provetta;
- L'ago di aspirazione viene automaticamente lavato ;
- A completamento del ciclo di lavaggio sul pannello indicatore di stato appare "Ready" e lo strumento è nuovamente pronto per l'analisi;
- Contestualmente sul monitor appare la visualizzazione del risultato;
- Premere il tasto F7, corrispondente a "Print", per stampare il referto;
- Dalla posizione di "Ready", si può accedere all'archivio premendo in successione F8 ed F3 (Data Log) per visualizzare e gestire le letture archiviate;

N.B Dopo qualche minuto dall'ultimo esame, lo strumento effettua automaticamente un breve lavaggio.

Se l'inattività dell'analizzatore si protrae per più di quattro ore, lo strumento va automaticamente nella modalità "Standby". Per riattivarlo premere il tasto F2 "Run".

7.3 Spegnimento Cell Dyn 3700

- Dalla schermata di lettura dell'ultimo campione, in posizione di "Ready", premere il tasto F8 "Main";
- Premere il tasto F7 "Special Protocols";
- Premere per due volte F6 "More";
- Premere il tasto F3 "Daily shutdown";
- Porre sotto l'ago di aspirazione una provetta tipo eppendorf contenente un detergente enzimatico necessaria per eliminare l'accumulo di proteine all'interno dello strumento;
- Premere F2 "Start". La macchina effettua il lavaggio;
- Al termine del ciclo di pulizia lo strumento si troverà in modalità "Standby";
- Procedere allo spegnimento dello strumento, del computer, del monitor e della stampante.

Ulteriori dettagli relativi all'utilizzo e manutenzione del Cell-Dyn 3700, sono disponibili nel manuale di istruzioni disponibile in formato elettronico nel computer di laboratorio o in formato cartaceo presso il Laboratorio 1 – Ematologia e citologia.

8. CONTROLLO DI QUALITÀ

Per il controllo di qualità si impiega sangue di controllo (normale, alto e basso), conservato a 4°C fino alla scadenza. I vari controlli vengono letti come un campione ematico, verificando che tutti i parametri rientrino nei range di riferimento forniti con quel lotto di controllo.

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica annualmente:

- Le date di revisione e manutenzione ordinaria della contaglobuli;

mensilmente:

- Le quantità di reagenti stoccate;

quotidianamente:

- Il corretto spegnimento e pulizia dell'apparecchio.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi;

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);

- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

!2. ALLEGATI



DIAGNOSI MICROSCOPICA DI DIROFILARIOSI

Nome del SOP:	CM_LDV_11.02	Pagine 6
Version No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO	Diagnosi microscopica di dirofilariosi	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalerà	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_11.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente le indagini diagnostiche per la ricerca di dirofilarie con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso Laboratorio di Diagnostica parassitologica della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. La diagnosi diretta di infezione è tradizionalmente basata sulla presenza di microfilarie circolanti.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Diagnosi Parassitologica - Laboratorio 3, della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

- Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio);
- La soluzione contenente blu di metilene 1% non deve essere ingerita e deve essere evitato il contatto con la pelle.

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici;

La presenza irregolare di microfilarie nel circolo periferico richiede alcune precauzioni nella scelta del momento del prelievo del campione. Le microfilarie, infatti, seguono i ritmi circadiani con una maggiore presenza notturna e serale. Si consiglia di prelevare il sangue dopo aver sottoposto il paziente a un breve sforzo fisico. Queste misure sono particolarmente necessarie se la diagnosi viene effettuata su sangue fresco mediante goccia spessa, o test di Knott, mentre non sono essenziali se vengono eseguiti altri metodi di rilevazione quali test sierologici o di biologia molecolare.

- I campioni di sangue devono essere prelevati in provette contenente anticoagulante (EDTA);
- Trasportati al laboratorio e processati il prima possibile.

6. APPARECCHIATURA E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Microscopio ottico con obiettivi 4X, 10X, 40X e 100x ([Leica DM750](#));
- Centrifuga [Thermo Scientific Medifuge](#);
- Provette in plastica da 10 ml con fondo tondo;
- Tappi in plastica a tenuta per provette;
- Vetrini portaoggetto;
- Vetrini coprioggetto;
- Pipette Pasteur monouso;
- Acqua;
- Blu di metilene concentrazione 0,1%.

7. PROCEDURE

Le tecniche per il rilevamento delle microfilarie includono:

- Esame a fresco a goccia spessa;

- Test di Knott.

Questi metodi rappresentano il primo approccio diagnostico che dovrebbe sempre essere quello di rilevare la microfilaremia. Solo nei casi dubbi o quando i reperti certi, nonostante l'assenza di microfilarie nel sangue, indicano un'infestazione, è utile utilizzare le tecniche di diagnosi sierologica o biomolecolare.

Le più importanti filariosi nei carnivori sono causate dalla *Dirofilaria immitis* e dalla *D. repens*. L'agente eziologico della dirofilariosi cardiopolmonare del cane è la *D. immitis* la cui vive nell'atrio e nel ventricolo destro e nell'arteria polmonare. La femmina è larvipara e, dopo essere stata fecondata dal maschio, libera le larve (microfilarie) nel torrente circolatorio. Le lesioni sottocutanee sono invece causate soprattutto da *D. repens* i cui adulti, invece, vivono nel tessuto sottocutaneo. L'infestazione da *D. repens* è scarsamente patogena e poco preoccupante. L'infestazione da *D. immitis* invece, è più pericolosa a causa della localizzazione degli adulti, specie in presenza di numerosi parassiti. Il ruolo di una corretta diagnosi, dunque, risulta di fondamentale importanza perché consente di distinguere la natura della parassitosi e, conseguentemente, di intervenire tempestivamente con un efficace protocollo terapeutico.

7.1 Esame a fresco con goccia spessa

L'esame del sangue a fresco mediante goccia spessa è la più semplice e rapida delle procedure per rilevare la microfilariaemia. Se nel sangue venoso sono presenti molte microfilarie, questa la tecnica rivelerà la loro presenza consentendo di osservare le microfilarie mobili e lo spostamento degli eritrociti causato dalle microfilarie stesse. Tuttavia, si tratta di un metodo poco sensibile poiché se nel sangue da esaminare è presente un basso numero di microfilarie (50-100/ml) difficilmente queste potranno essere osservate nei pochi μL osservati nella goccia di campione. Pertanto, in caso di negatività è opportuno svolgere esami più sensibili quali il test di Knott modificato o PCR.

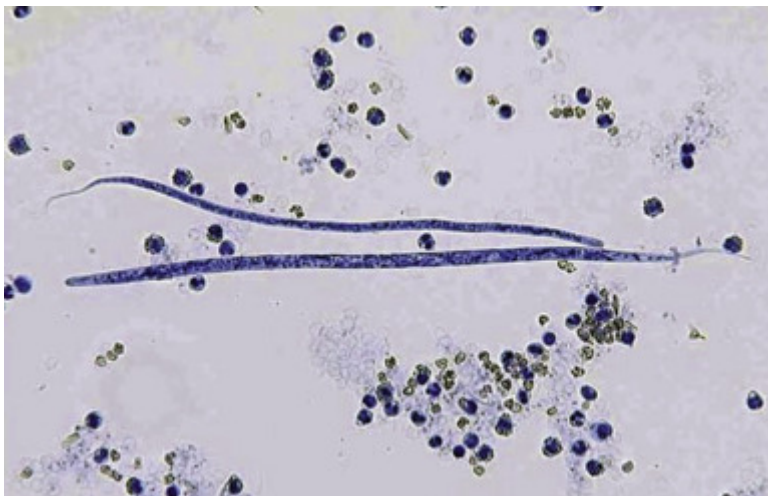
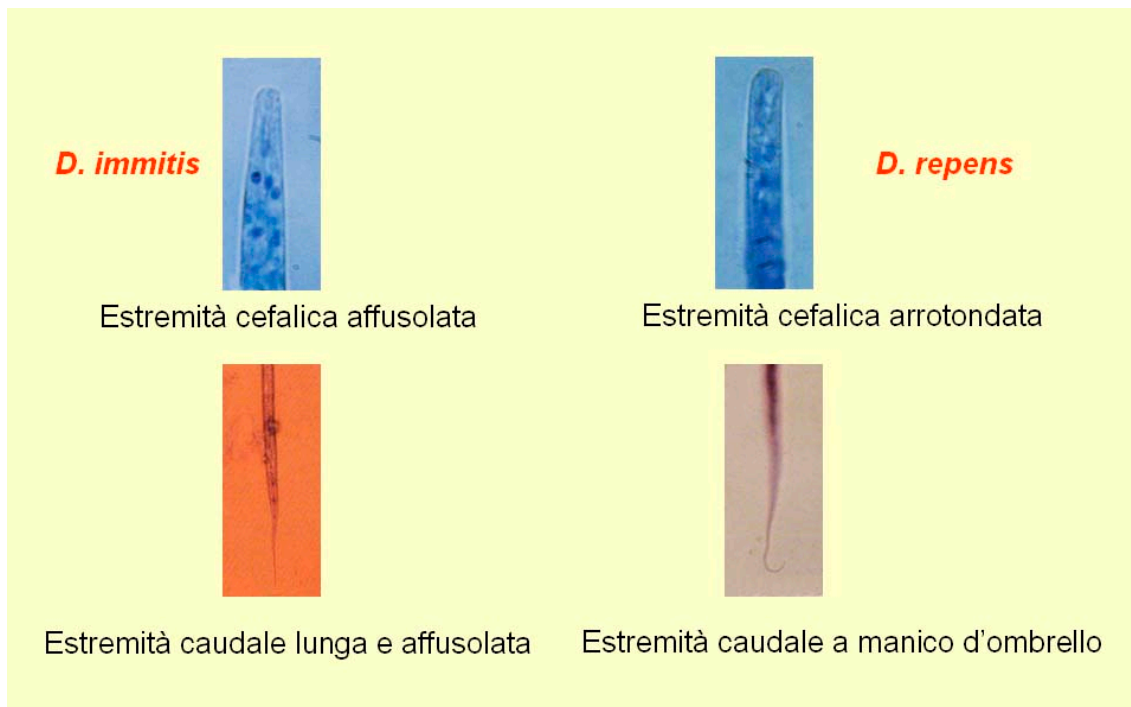
Tecnica:

- Miscelare il campione delicatamente
- Con una pipetta Pasteur, porre 1 o 2 gocce di sangue (20-40 μL) al centro di un vetrino portaoggetti (preventivamente sgrassato con alcool) in un'area di circa 1,5 cm di diametro.
- Appoggiare un vetrino coprioggetto (24 x 24 mm) sulla goccia di sangue
- Osservare immediatamente il preparato al microscopio ottico a piccolo ingrandimento (4X o 10X).
- L'osservazione microscopica permette di osservare lo spostamento dei globuli rossi causato da movimento vorticoso delle microfilarie vitali.
- Se la presenza di eritrociti rende difficoltosa la lettura, è preferibile miscelare la goccia di sangue con una goccia di soluzione fisiologica.
N.B. L'esame consente di emettere diagnosi di microfilariaemia ma non permette di effettuare una diagnosi di specie. In caso di positività è fondamentale eseguire test aggiuntivi per individuare la specie parassita coinvolta.

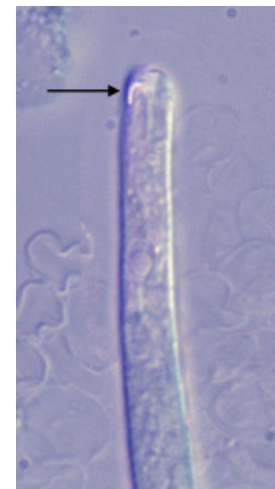
7.2 Test di Knott modificato (esame per arricchimento)

Il test di Knott modificato consente il rilevamento e l'identificazione delle microfilarie nel sangue. È il metodo ideale per osservare la morfologia, misurare le dimensioni e quindi per differenziare microfilarie di *Dirofilaria immitis* da quelle di *D. repens* o da altre specie meno patogene. Consiste nel lisare le cellule del sangue ed esaminare al microscopio il campione concentrato previa centrifugazione per rilevare la presenza di microfilarie. Nonostante sia un esame di semplice esecuzione e poco costosa, questo test richiede tempo. Inoltre, l'operatore deve avere una buona conoscenza della morfologia delle microfilarie:

- Le microfilarie di *D. immitis* superano i 300 μm di lunghezza e 5-7 μm di larghezza e hanno testa affusolata e coda diritta con l'estremità appuntita.
- Le microfilarie di *D. repens* sono lunghe oltre 300-360 μm e larghe 6-8 μm e hanno l'estremità cefalica ottusa e la coda affilata e filiforme che spesso termina a manico di ombrello.
- Le microfilarie di *Acanthocheilonema reconditum* sono più piccole (260-283 μm e 4 μm di larghezza) e hanno l'estremità cefalica ottusa con un uncino cefalico prominente, ed estremità caudale ricurva.



Acanthocheilonema reconditum (in alto) e *Dirofilaria immitis* (in basso).



Uncino cefalico di *A.reconditum*

Tecnica

- Aggiungere ad 1 ml di sangue intero, 9 ml di acqua in una provetta da 15 ml per determinare l'emolisi delle emazie;
- Tappare la provetta;
- Centrifugare per 5 minuti a 1200 rpm;
- Con una pipetta Pasteur prelevare ed eliminare il surnatante;
- Aggiungere l'acqua in quantità pari al surnatante eliminati;
- Miscelare e risospendere il sedimento;
- Centrifugare la miscela per 5 minuti a 1200 rpm;
- Ripetere le fasi di centrifugazione ed eliminazione finché il surnatante non è limpido;
- Eliminare il surnatante;

- Mescolare il sedimento con eguale quantitativo di soluzione allo 0,1% di blu di metilene; Il colorante viene utilizzato con lo scopo di provocare la morte delle microfilarie, la successiva distensione (altrimenti sarebbero mobili) e colorazione dei tessuti. Per effettuare l'identificazione su base morfologica è importante e necessario che il nematode sia disteso e fermo. Inoltre, il blu di metilene conferisce una lieve colorazione celeste, tale da poter evidenziare meglio le microfilarie sul fondo del preparato.
- Porre una goccia di sedimento colorato su un vetrino portaoggetto;
- Coprire il campione con un coprioggetto;
- Osservare a basso ingrandimento (obiettivi 10X e 20X);
- Osservare a maggiore ingrandimento (obiettivo 40X) per visualizzare i dettagli morfologici;

Per esami di tipo quantitativo:

- Osservare due vetrini allestiti con 50µL di sedimento;
- Contare le microfilarie presenti in ciascun vetrino;
- Procedere al calcolo delle microfilarie presenti in 1mL di campione di sangue facendo la seguente proporzione:
 $N:100/\mu L = X:1000/\mu L$
Dove N è il numero di microfilarie contate in totale e X il numero di microfilarie in un mL di sangue.
- Riportare i dati nel form che segue:

REPORT DEI DATI

Nome paziente o ID	Provenienza/ proprietario	Data del prelievo	Pos/Neg	Specie	Numero di microfilarie V1	Numero di microfilarie V2	Operatore

8. CONTROLLO QUALITA'

- Il personale di laboratorio è tenuto a seguire le procedure descritte nella presente SOP;
- Il Responsabile di laboratorio vigila affinché tutte le procedure descritte vengano correttamente applicate.

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica annualmente:

- Le date di revisione e manutenzione ordinaria di:
 - Microscopio;
 - Centrifuga.

- Le quantità residue delle soluzioni;

Quotidianamente:

- Il corretto spegnimento e pulizia delle lenti del microscopio;
- Il corretto spegnimento della centrifuga;
- La corretta disinfezione della centrifuga e dei supporti.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi;
- Eliminare i vetrini utilizzati per i test nel contenitore per i rifiuti taglienti a rischio biologico;
- I liquidi derivanti dall'esecuzione dei test vanno smaltiti nell'apposita tanica per rifiuti speciali a rischio biologico presente nel laboratorio di Diagnostica Parassitologica – Laboratorio 3, della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI

ESAME DEI VERSAMENTI CAVITARI

Nome della SOP:	CM_LDV_12.01	Pagine 6
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO Esame dei versamenti cavitari		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavallera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_12.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard descrive le modalità con cui effettuare correttamente le indagini diagnostiche su campioni di versamenti cavitari, con l'obiettivo di garantire la maggiore accuratezza del risultato diagnostico e la sicurezza degli operatori che lavorano nel Laboratorio di Ematologia della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

Il versamento cavitario è una raccolta patologica di liquido in una cavità corporea (pleurica, addominale o pericardica) che può verificarsi per molteplici cause. Caratterizzare un versamento cavitario è una componente importante nella valutazione diagnostica in quanto può consentire di identificare il processo patologico responsabile dell'accumulo di liquido.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

La procedura operativa descritta si esegue in parte nel Laboratorio 1 (Ematologia e Citologia) e in parte nel Laboratorio 3 (Diagnostica parassitologica) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici;

I campioni devono essere raccolti:

in provetta con K3 EDTA per effettuare:

- Esame citologico;
- Conta cellulare;
- PCR.

in provetta senza anticoagulante:

- Test biochimici;
- Proteine totali;
- Peso specifico.

in terreni sterili:

- Esami colturali.

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Pipette monouso;
- Vetrini portaoggetti sgrassati (etanolo 90°), molati e con doppia banda smerigliata per scrivere identificativo del paziente;
- Rifrattometro;
- Analizzatore automatico ([Cell Dyn 3700](#));
- Citocentrifuga [Cytospin](#);
- Coloranti;
- Microscopio ottico [Nikon eclipse Ci - H550 L](#);

- Microscopio ottico [Leica DM750](#);
- Olio sintetico per obbiettivi ad immersione;

7. PROCEDURA

7.1 Esame macroscopico

Può fornire indicazioni utili sul processo patologico

Vengono valutati:

- Trasparenza/torbidità

Riflette la quantità di cellule presenti:

- Liquido/acquoso indica bassa cellularità
- Liquido lievemente opaco indica moderata cellularità
- Fortemente opaco indica da moderata ad elevata cellularità

- Colore

Riflette la presenza di pigmenti nel fluido:

- Rosso/rosato indica la presenza di eritrociti
- Giallo/arancio indica la presenza di bilirubina
- Bianco lattescente indica la presenza di colesterolo/trigliceridi

7.2 Misurazione della concentrazione delle proteine totali

Viene eseguita con il rifrattometro (vedi **SOP CM_LDV_13.01** – Uso del rifrattometro per la determinazione delle proteine sieriche)

7.3 Conta cellulare

La conta delle cellule nucleate viene essere eseguita con la contaglobuli (vedi **SOP CM_LDV_10.01**- Esame emocromocitometrico con analizzatore)

In base alla concentrazione delle proteine totali e al numero delle cellule, i versamenti vengono tipicamente classificati come:

Trasudati a bassa concentrazione di proteine:

- Proteine totali < 2 g/dl
- Cellularità scarsa (<1500 cell/ μ L)

Trasudati ad alta concentrazione di proteine:

- Proteine totali > 2 g/d
- Cellularità modesta (<5000 cell/ μ L)

Essudati:

- Proteine totali > 2 g/dl
- Cellularità abbondante (> 5000 cell/ μ L)

N.B. alcuni tipi di versamenti non ricadono in queste categorie e comprendono:

-versamenti emorragici

-versamenti di origine linfatica

-versamenti secondari a rottura di organi

-versamenti neoplastici

7.4 Allestimento preparati per la citologia del versamento

L'allestimento del campione per l'esame citologico dipende dall'aspetto del liquido prelevato (limpido o torbido)

Se il liquido è torbido si può allestire uno striscio tal quale:

- Vedi **SOP CM_LDV_07.01** - Allestimento strisci ematici da sangue intero e da buffy coat;
- Fare asciugare il vetrino all'aria;
- Colorare il vetrino (vedi **SOP CM_LDV_08.01** - Colorazioni).

Se il liquido non è torbido o è solo moderatamente torbido è necessario concentrare le cellule mediante:

- Allestimento di uno striscio concentrato:
 - Centrifugare il campione (150-350 g per 5 min)
 - Effettuare uno striscio con parte del sedimento

- Fare asciugare il vetrino all'aria;
- Colorare il vetrino (vedi **SOP CM_LDV_08.01** - Colorazioni).
- Allestimento di uno striscio a concentrazione lineare (striscio linea):
 - Deporre piccola quantità di campione (5-10µL) al centro verso un'estremità del vetrino portaoggetti;
 - Inclinare il vetrino coprioggetti o portaoggetti molato di 30-45° rispetto al precedente ed appoggiarlo davanti alla goccia;
 - Tornare indietro e far diffondere il campione per capillarità su tutto il bordo del secondo vetrino;
 - Far scorrere il secondo vetrino sul primo in modo uniforme;
 - Interrompere bruscamente lo scorrimento in modo da formare una linea di cellule concentrate;
 - Fare asciugare il vetrino all'aria;
 - Colorare il vetrino (vedi **SOP CM_LDV_08.01** - Colorazioni).
- Allestire preparati con tecnica cytospin:
 - Scrivere i dati del paziente, proprietario e campione sul vetrino con una matita;
 - Inserire il vetrino nell'apposito supporto (concentratore) assicurandosi che la parte superiore smerigliata del vetrino sia rivolta verso l'alto;
 - Posizionare la carta filtro tra il vetrino e il concentratore e chiudere con l'apposita clip;
 - Posizionare il concentratore montato nell'incavo corrispondente del rotore della citocentrifuga con i concentratori verso il centro del rotore;
 - Dispensare delicatamente la sospensione cellulare nel citoimbuto;

N.B. Ricordarsi che la citocentrifuga deve essere sempre bilanciata. Nel caso si debba preparare un solo vetrino caricare il secondo supporto con acqua.

 - Chiudere il coperchio del rotore e il coperchio della citocentrifuga;
 - Selezionare il ciclo appropriato e premere il tasto di avvio;
 - A conclusione del ciclo aprire il coperchio della citocentrifuga e il coperchio del rotore. Attendere la conclusione del ciclo;
 - Rimuovere l'eccesso di fluido residuo nell'imbuto del supporto;
 - Rimuovere la clip del concentratore;
 - Aprire il concentratore a libro e rimuovere il vetrino in modo da mantenere il citocentrifugato verso l'alto;

N.B. Fare attenzione a sollevare la carta da filtro senza danneggiare la preparazione cellulare.

 - Fare asciugare il vetrino all'aria;
 - Colorare il vetrino (vedi **SOP CM_LDV_08.01** - Colorazioni);
 - Lavare i supporti usati con detergente neutro e disinfettare con candeggina all'1%, risciacquare in acqua distillata. Asciugarli prima di qualsiasi ulteriore utilizzo.

7.5. Esame citologico

In condizioni normali le cavità corporee contengono una popolazione mista di neutrofilii maturi, monociti/macrofagi, cellule mesoteliali, pochi e piccoli linfociti e raramente eosinofili e mastociti. Per la valutazione citologica si rimanda ai testi di citologia.

7.6. Analisi biochimiche

Indagini biochimiche (vedi **SOP CM_LDV_15.01** – Analizzatore biochimico) possono fornire ulteriori indicazioni diagnostiche e vengono effettuate sul surnatante dopo centrifugazione:

- urea, creatinina, potassio: uroperitoneo;
- bilirubina: peritonite biliare;
- colesterolo e trigliceridi e loro rapporto: chilotorace/chiloaddome;
- lipasi totale: essudato da pancreatite sottostante;
- glucosio: essudato settico, diminuzione per consumo da parte di batteri;

N.B. Per una corretta interpretazione è indispensabile riportare tali parametri agli stessi parametri valutati sul siero.

7.7. Ulteriori indagini

In particolare nel gatto per diagnosi di FIP:

- Elettroforesi delle sieroproteine (vedi **SOP CM_LDV_16.01** – Elettroforesi delle proteine);
- Sierologia (IFAT) per la valutazione del titolo anticorpale;
- Biologia molecolare (PCR).

Per gli essudati si possono eseguire:

- Esame batteriologico (colture batteriche);
- Biologia molecolare (PCR).

8. CONTROLLO QUALITA'

Non applicabile

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica annualmente:

- Le date di revisione e manutenzione ordinaria di:
 - microscopi;
 - centrifuga e citocentrifuga;
- Le quantità residue dei diversi coloranti;

mensilmente:

- L'aggiornamento degli elenchi dei vetrini stoccati e relative diagnosi.

quotidianamente

- Il corretto spegnimento e pulizia delle lenti dei microscopi.
- Il corretto spegnimento di centrifughe e citocentrifughe;
- La corretta disinfezione delle centrifughe e dei supporti.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

Gestione dei campioni analizzati

- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali a rischio biologico o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi.
- Smaltire i vetrini usati per allestire lo striscio nel contenitore per i rifiuti speciali taglienti;
- Smaltire tutto il materiale venuto in contatto con il campione (es. pipette, carta bibula, puntali monouso) nel contenitore dei rifiuti speciali a rischio biologico.

Gestione dei vetrini da conservare

- Pulire la superficie del vetrino dai residui di olio utilizzando batuffolo di cotone imbevuto di etanolo;
- Verificare che i dati riportati a matita sulla banda sabbata siano leggibili;
N.B. Se i dati dovessero risultare sbiaditi procedere a rimarcarli.
- Inserire il vetrino in apposita scatola portavetrini sul cui coperchio devono essere riportati:
 - Nome del progetto/ provenienza;
 - Tipologia del campione;
 - Specie animale;
 - Numero progressivo dei vetrini (es. da 101 a 200).
- Scrivere con penna nera o blu, sull'apposito elenco cartaceo interno alla scatola portavetrini in corrispondenza del numero di posizione del vetrino stoccato:
 - Nome del paziente e/o ID;
 - Nome del progetto e/o del proprietario;
 - Specie animale;
 - Tipologia del campione;
 - Diagnosi (se disponibile).

- Le scatole portavetrini vanno sempre richiuse dopo l'apertura e riposte nell'apposito armadietto sito nel laboratorio di pertinenza.

Gestione dei vetrini da eliminare:

- Smaltire i vetrini nell'apposito contenitore per i rifiuti speciali taglienti a rischio biologico.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3° EDIZIONE.
- Rose E. Raskin & Denny J. Meyer. Citologia diagnostica del cane e del gatto. 2016. EDRA, 3° EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61.
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI



USO DEL RIFRATTOMETRO PER LA DETERMINAZIONE PROTEINE SIERICHE

Nome della SOP:	CM_LDV_13.01	Pagine 4
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO Uso del rifrattometro per la determinazione delle proteine sieriche		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_13.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard descrive le modalità con cui utilizzare correttamente il rifrattometro. Il rifrattometro è uno strumento ottico che sfrutta il principio di rifrazione della luce ed è impiegato per la valutazione la determinazione delle proteine totali.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

La procedura operativa descritta si esegue nel Laboratorio 2 (Chimica Clinica) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio.

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici.

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Pipette monouso;
- Acqua distillata;
- Carta asciugamani;
- Rifrattometro.

7. PROCEDURA

Calibrazione

- Aprire coperchio del prisma e dispensare 2-3 gocce di acqua distillata sul prisma principale;
- Richiudere il coperchio in modo da permettere all'acqua di distribuirsi su tutta la superficie del prisma;
- Lasciare che l'acqua rimanga sul prisma per circa 30 secondi;
- Posizionare il rifrattometro nella direzione della fonte di luce e guardare attraverso l'oculare;

N.B. Sarà visibile un'area circolare con una gradazione di colore verso il centro (è possibile che sia necessario mettere a fuoco l'oculare per vedere chiaramente le gradazioni). La sezione superiore dell'area deve risultare blu, mentre la sezione inferiore bianca.

- Osservando attraverso l'oculare, ruotare la vite di calibrazione finché la linea di demarcazione tra la porzione superiore e quella inferiore è posizionata su 1.000. A questo punto lo strumento è calibrato.

Analisi del campione

- Aprire il coperchio del prisma e dispensare 2-3 gocce di campione sul vetro;
- Richiudere il coperchio del prisma per permettere al campione di distribuirsi su tutta la superficie del vetro;
- Mantenere il rifrattometro nella direzione della fonte di luce e guardare attraverso l'oculare. Se necessario, regolare la messa a fuoco ruotando manualmente l'oculare;

N.B.: Guardando attraverso l'oculare sarà possibile vedere 3 scale delle quali due sono quelle relative al peso specifico urinario di cane e gatto, mentre la terza riguarda la scala graduata per la misurazione della concentrazione delle proteine nel siero (**Figura 1**).

- Eseguire la lettura nel punto in cui la linea di demarcazione tra le due sezioni incrocia la scala graduata.

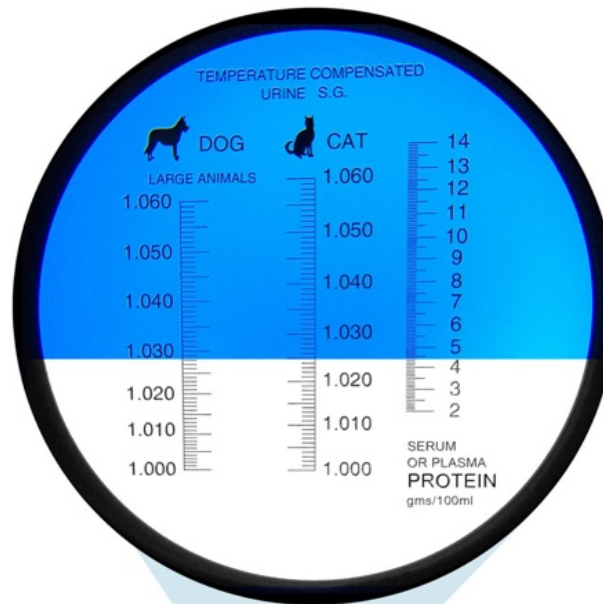


Figura 1.

(immagine tratta e modificata dal sito <https://www.tekcoplus.com/products/retk-71>)

8. CONTROLLO QUALITA'

Prima di ogni utilizzo vengono svolte le procedure di calibrazione (Vedi punto 5)

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica il corretto uso del rifrattometro e che vengano seguite le procedure per la sua pulizia:

- Pulire accuratamente il vetro del rifrattometro con acqua distillata dopo ogni utilizzo;
- Asciugare con un panno, facendo attenzione a non graffiare il vetro;
- "Azzerrare" lo strumento ponendo 2-3 gocce di acqua distillata sull'apposito supporto e regolando l'oculare fino a ottenere una lettura di 1000 (idealmente questa operazione dovrebbe essere effettuata prima e dopo ogni utilizzo). Non immergere il prisma nell'acqua.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

Gestione dei campioni analizzati

- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali a rischio biologico o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi.
- Smaltire tutto il materiale venuto in contatto con il campione (es. pipette, carta bibula, puntali monouso) nel contenitore dei rifiuti speciali a rischio biologico.

11. REFERENZE



- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI



ESAME DELLE URINE

Nome della SOP:	CM_LDV_14.01	Pagine 13
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari Sezione di Clinica Medica (CM). Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV),		Note:
TITOLO	Esame delle urine	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_14.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente le indagini diagnostiche su campioni di urine, con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso di Chimica clinica (Laboratorio 2) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. L'esame delle urine è indicato per identificare eventuali infezioni del tratto urinario, patologie renali e nella valutazione di disordini epatici e metabolici.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Chimica Clinica (Laboratorio 2) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio)

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Il campione deve essere idoneo (Vedi **SOP CM_LDV_04.01** Ricezione e gestione dei campioni biologici); Quando possibile, l'esame delle urine deve essere eseguito entro 60 minuti dalla raccolta del campione. Se un campione viene lasciato a temperatura ambiente per varie ore, possono verificarsi le seguenti alterazioni:

- Aumento del ph dovuto alla degradazione batterica dell'urea ed ammoniaca;
- Degenerazione di cellule e cilindri tubulari;
- Dissoluzione o precipitazione di cristalli;
- Possibile riduzione dei livelli di glucosio, chetoni e bilirubina;
- Possibile proliferazione batterica;

Questi fattori devono essere inoltre tenuti in considerazione qualora il campione debba essere inviato a un laboratorio esterno.

- I campioni di urina devono essere mantenuti in un contenitore universale sterile;
- Devono essere refrigerati, successivamente riportati a temperatura ambiente e miscelati prima delle analisi.
- La refrigerazione può determinare la precipitazione di cristalli virgola che non sempre si disciolgono nuovamente con il riscaldamento del campione.

I campioni di urina non devono essere congelati, dal momento che questa procedura può danneggiare il sedimento.

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Microscopio ottico [Nikon eclipse Ci - H550 L](#);
- Microscopio ottico [Leica DM750](#);
- Contenitore sterile/provetta per campioni di urine;
- Pipette monouso;
- Microscopio ottico;

- Centrifuga ([Thermo medifuge](#));
- Rifrattometro;
- Acqua distillata;
- Strisce reattive per analisi urinaria (dipstick);
- Analizzatore automatico ([Urilyzer®100 Pro](#)) [opzionale];
- Carta assorbente;
- Registro per annotare i risultati

7. PROCEDURA

7.1 Esame macroscopico dell'urina

Miscelare accuratamente il campione al fine di poterne valutare:

- il colore
- il grado di limpidezza
- l'eventuale presenza di un sedimento evidente.

L'urina, in condizioni normali, deve avere un colore da giallo chiaro a giallo scuro e deve essere limpida o solo lievemente torbida. Le possibili variazioni cromatiche e macroscopiche delle urine sono:

- molto chiaro, quasi incolore;
- rosso;
- rosso-marrone;
- rosso-rosa;
- marrone scuro;
- giallo arancio;
- giallo-verde o giallo-marrone;
- torbido.

7.2 Misurazione del peso specifico

La misurazione del peso specifico deve essere eseguita mediante l'impiego del rifrattometro per urine ad uso veterinario. Il peso specifico può essere letto sull'urina intera oppure, se il campione contiene una quantità significativa di sedimento ed è torbido, è possibile centrifugarlo e valutare il peso specifico del surnatante.

Calibrazione

- Aprire coperchio del prisma e dispensare 2-3 gocce di acqua distillata sul prisma principale;
- Richiudere il coperchio in modo da permettere all'acqua di distribuirsi su tutta la superficie del prisma;
- Lasciare che l'acqua rimanga sul prisma per circa 30 secondi;
- Posizionare il rifrattometro nella direzione della fonte di luce e guardare attraverso l'oculare;

N.B. Sarà visibile un'area circolare con una gradazione verso il centro (è possibile che sia necessario mettere a fuoco l'oculare per vedere chiaramente le gradazioni). La sezione superiore dell'area deve risultare blu, mentre la sezione inferiore bianca.

- Osservando attraverso l'oculare, ruotare la vite di calibrazione finché la linea di demarcazione tra la porzione superiore e quella inferiore è posizionata su 1.000. A questo punto lo strumento è calibrato.

Analisi del campione

- Se necessario, regolare la messa a fuoco ruotando manualmente l'oculare. La sezione superiore dell'area dovrebbe risultare blu, mentre la sezione inferiore bianca.
- Eseguire la lettura nel punto in cui la linea di demarcazione tra le due sezioni incrocia la scala graduata. La scala fornirà una lettura diretta del peso specifico delle urine (Figura 1).
- **N.B.:** Guardando attraverso l'oculare sarà possibile vedere 3 scale delle quali due sono quelle relative al peso specifico urinario di cane e gatto, mentre la terza riguarda la scala graduata per la misurazione della concentrazione delle proteine nel siero (Figura 1).

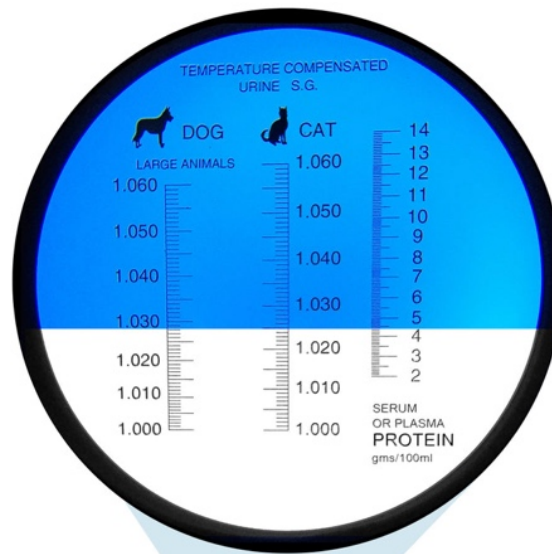


Figura 1.

(immagine tratta e modificata dal sito <https://www.tekcoplus.com/products/retk-71>)

7.3 Esame chimico

Per l'analisi chimica delle urine si utilizzano le strisce reattive (o dipstick) che, nella maggior parte dei casi, risultano sufficienti per una valutazione completa delle caratteristiche chimiche del campione. L'analisi del dipstick viene solitamente eseguita su urina non centrifugata, a meno che non vi sia una marcata ematuria (che può influenzare l'interpretazione dei cambiamenti di colore sul dipstick). Nelle urine con marcata ematuria, gli eritrociti interferenti possono essere sedimentati mediante centrifugazione e l'analisi con dipstick può essere eseguita sul surnatante.

I dipstick sono costituiti da strisce reattive in plastica rigida sulle quali sono apposte varie sostanze reattive in aree separate che forniscono un cambiamento di colore quando un particolare analita è presente nelle urine. Questo cambiamento di colore viene convertito in un risultato semi-quantitativo per l'analita in questione (glucosio, bilirubina, chetoni, sangue, pH, proteine, urobilinogeno, nitrito, leucociti, peso specifico). La misurazione del peso specifico mediante strisce reattive è notoriamente inaccurata e non viene presa in considerazione.

Letture Dipstick classica

- Capovolgere la provetta contenente il campione di urine in modo da miscelarlo accuratamente;
- Introdurre la striscia reattiva nella provetta contenente il campione;
- Rimuoverla ed eliminare l'eccesso di campione picchiettando leggermente la striscia sul bordo del contenitore o su carta assorbente;
N.B in caso di campioni di piccolo volume, applicare direttamente alcune gocce di urina sulla striscia con l'ausilio di una pipetta.
- Attendere che si realizzino le reazioni nel preciso arco di tempo riportato sulla confezione del kit;
- Confrontare il colore ottenuto in ciascun riquadro di rivelazione con il corrispondente colore di riferimento riportato sulla confezione del kit (Figura 2)
- Registrare i risultati, preferibilmente utilizzando un metodo semiquantitativo ("negativo", "tracce", "1+", "2+", "3+", ecc.)

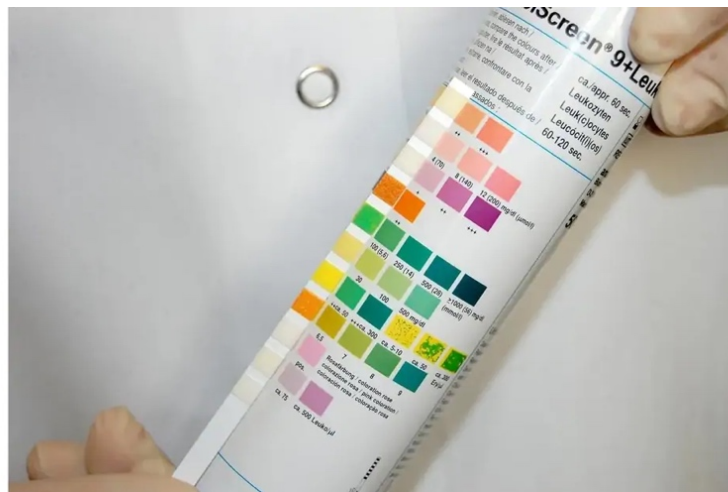


Figura 2.

(immagine tratta dal sito <https://cistite.info/esami-diagnostici/strisce-reattive-stick-urine.html>)

Letture Dipstick tramite analizzatore automatico Urilyzer® 100 (Pro)

- Accendere lo strumento attraverso l'interruttore On/Off (premere il tasto per circa 2 secondi); quando appare lo start menù, lo strumento è pronto all'uso;
- Capovolgere la provetta contenente il campione di urine in modo da miscelarlo accuratamente;
- Introdurre la striscia reattiva nella provetta contenente il campione;
- Rimuoverla ed eliminare l'eccesso di campione picchiando leggermente la striscia sul bordo del contenitore o su carta assorbente;

N.B. in caso di campioni di piccolo volume, applicare direttamente alcune gocce di urina sulla striscia con l'ausilio di una pipetta.

- Collocare la striscia sul carrello porta striscia con i tamponcini rivolti verso l'alto;
 - Se l'autostart è abilitato, collocare la striscia sul carrello;
 - Lo strumento rileva automaticamente la striscia e avvia un conto alla rovescia per l'incubazione;
 - Se l'autostart non è abilitato premere il tasto start sul touchscreen entro 5 secondi dopo l'immersione della striscia;
 - Attendere la comparsa sul display del segnale di avvio del conto alla rovescia
- N.B.** La lettura parte automaticamente dopo 60 secondi;
- I risultati, oltre a comparire sullo schermo, saranno stampati automaticamente dopo la lettura;
 - Rimuovere e smaltire la striscia usata nel contenitore dei rifiuti speciali.

7.4 Esame a fresco del sedimento urinario

- Centrifugare un volume standard di urina (almeno 5 ml) in provetta conica a bassa velocità (300-450 g, corrispondenti a circa 1500-2000 rpm, per 5 minuti) per evitare di danneggiare strutture delicate come cilindri e cellule.
- Rimuovere il surnatante con una pipetta di plastica.
- Risospesare delicatamente il sedimento in un volume standard (0,5 ml) di surnatante con una pipetta.
- Porre una goccia dell'urina risospesa su un vetrino.
- Apporre sulla goccia di urina un vetrino coprioggetto.

- Esaminare al microscopio ottico utilizzando gli obiettivi 10x (*low power field* o lpf) e 40x (*high power field* o hpf).
N.B. Assicurarsi che il condensatore del microscopio sia abbassato per evidenziare le strutture (l'illuminazione soffusa è necessaria per aumentare la rifrazione degli elementi urinari non colorati).
N.B. Nelle urine si possono riscontrare elementi cellulari (cellule ematiche e cellule epiteliali), cilindri, cristalli, uova di parassiti, agenti infettivi (batteri, funghi) e altri costituenti (detriti, muco, contaminanti) (vedi Allegato 1).
- Con l'obiettivo 10x osservare l'intera area ricoperta dal coprioggetto per valutare la quantità e per il riconoscimento degli elementi di maggiori dimensioni.

Eritrociti

- Con l'obiettivo alto ingrandimento 40x contare gli eritrociti (possono apparire sottoforma di dischi lisci con profilo arrotondato oppure sotto forma di elementi cellulari crenati in caso di invecchiamento del campione) in 10 campi e fare poi la media. Riportare il risultato ottenuto come: 0, <5, oppure come eritrociti/hpf.
Interpretazione: in condizioni normali, le urine contengono meno di 5 eritrociti per campo ad alto ingrandimento (40x). Modalità di raccolta delle urine come cateterismo, cistocentesi e compressione manuale possono causare emorragia iatrogena (con la cistocentesi, di solito si tratta di un'ematuria microscopica in un'urina grossolanamente gialla [o microematuria]).

Leucociti

- Con l'obiettivo 40x contare i leucociti in 10 campi e fare poi la media. Riportare il risultato ottenuto come: 0, <5, oppure come leucociti/hpf. Nel sedimento a fresco appaiono di dimensioni maggiori rispetto ai globuli rossi con un contenuto granulare.
Interpretazione: in condizioni normali, le urine contengono meno di 5 leucociti per campo ad alto ingrandimento. Un aumento del numero di leucociti (o piuria) si può osservare in caso di infiammazione del tratto urinario o genitale oppure per cause non settiche di infiammazione, come uroliti e neoplasie.

Cellule epiteliali

Comprendono le cellule epiteliali renali, le cellule epiteliali di transizione e (nei campioni da minzione o da cateterismo) le cellule dell'epitelio squamoso della parte distale dell'uretra e dei genitali esterni. Le loro grandi dimensioni consentono in genere di distinguerle dai leucociti.

- Con l'obiettivo 10x contare il numero di cellule epiteliali osservate ad alto ingrandimento in 10 campi e fare poi la media. Riportare il risultato ottenuto come: 0, <5, oppure esprimendo il numero di cellule contate/hpf.
Interpretazione: in condizioni normali, la presenza di grandi cellule epiteliali arrotondate (di transizione) e di cellule epiteliali squamose (nei campioni da minzione spontanea e da cateterismo) è occasionale (0-2 per campo a basso ingrandimento 10x). Un aumento del numero di cellule epiteliali si osserva ad esempio nei casi di trauma da cateterismo, infiammazione mucosale, neoplasie.
N.B. I dettagli morfologici delle cellule epiteliali non sono sempre semplici da apprezzare nei preparati a fresco del sedimento. Quando non si è sicuri dell'origine delle cellule nelle urine, o siano presenti anomalie evidenti o un aumento significativo delle cellule epiteliali, è indicato l'esame citologico delle urine.

Cristalli

La cristalluria indica che l'urina è sovrassatura dei composti che compongono i cristalli, come ad esempio ammonio, magnesio e fosfato per struvite. I cristalli possono essere osservati nelle urine di animali clinicamente sani o in animali senza evidenza di malattia urinaria. Tuttavia, alcuni cristalli possono essere patologicamente rilevanti. Si noti che i cristalli potrebbero non formarsi in tutte le urine sovrassature di questi composti.

- Contare per ciascun tipo di cristallo eventualmente ritrovato il numero di elementi osservati a basso ingrandimento (10X) in 10 campi e fare poi la media. Riportare il risultato ottenuto come: scarsi, moderati, numerosi.

Cristalli di riscontro comune:

- Struvite: forma oblunga “a coperchio di bara” sebbene possano presentarsi in varie forme;
- Ossalato di calcio diidrato: forma quadrangolare, con una tipica formazione “a croce di Malta” sebbene possano avere dimensioni estremamente variabili e talvolta sono visibili solo ad alto ingrandimento (400x);

Cristalli di riscontro meno comune:

- Ossalato di calcio monoidrato: forma oblunga con estremità appuntite (simile alla dogma di una staccionata), sebbene si osservi una certa variabilità;
- Urati di ammonio: sferici di colore giallo/bruno scuro, spesso appaiono disposti in densi ammassi;
- Fosfato di calcio: amorfi, o sferici, o aghiformi, a volte aggregati a formare rosette;
- Bilirubina: strutture aghiformi o granulari dorate;
- Cistina: incolori, di forma esagonale, presenti singolarmente o associati a formare delle pile;
- Tirosina: sottili, aghiformi, incolori o di colore giallo, tendenti ad aggregarsi in fasci.

Cilindri

I cilindri sono rappresentati da voluminosi corpi cilindrici con estremità smusse, affusolate o irregolari, ma con i lati perfettamente paralleli; questo aspetto consente di distinguerli dagli artefatti. Possono avere l'aspetto di corti frammenti dritti, oppure possono avere una forma convoluta a seconda della loro sede di origine e dello stato di preservazione. Il loro diametro riflette la dimensione del tubulo renale in cui si sono formati. In presenza di bilirubinuria, emoglobinuria o mioglobinuria, si possono formare cilindri pigmentati.

- Contare il numero di cilindri osservati a basso ingrandimento (10x) in 10 campi e fare poi la media. Riportare il risultato ottenuto (per esempio 5-10/LPF).

Interpretazione: I cilindri non rappresentano un reperto normale, ma la loro presenza è indicativa di una patologia dei tubuli renali; l'unica eccezione è data dal riscontro occasionale, in animali sani, di cilindri ialini o granulari, in numero inferiore a 2 per campo a piccolo ingrandimento (obiettivo 10x).

Cilindri ialini: corpi a superficie liscia, quasi trasparenti, privi di una struttura interna;

Cilindri granulari: possono contenere granuli fini o grossolani, a seconda del materiale costitutivo e del tempo trascorso dalla loro formazione;

Cilindri cellulari: incorporano cellule epiteliali, eritrociti o leucociti (o una combinazione di questi elementi);

Cilindri cerei: cilindri più spessi e più densi dei calchi ialini, ad alto indice di rifrazione;

Cilindri emoglobinici: cilindri giallo-marroni con consistenza granulare.

Microrganismi

L'esame del sedimento urinario è utile per rilevare la presenza di batteriuria, sebbene il mancato riscontro di batteri all'esame visivo, non consenta di escluderne la presenza. I batteri sono visibili ad alto ingrandimento (40x) e nei campioni non colorati si presentano come cocchi o bacilli quasi incolori, che possono essere disposti in ammassi o catene.

- Valutare la presenza di batteri ad alto ingrandimento (40x). Riportare il risultato ottenuto come: scarsi, moderati, numerosi.

Interpretazione: il riscontro di batteri può essere dovuto a un'infezione del tratto urinario o alla contaminazione del campione, per cui deve essere interpretato alla luce di altri reperti dell'esame del sedimento (eventuale evidenza di piuria) e del metodo di raccolta del campione.

Altri reperti di significato diagnostico scarso o nullo

- Lipiduria;
- Presenza di elementi micotici (per esempio, *Candida* spp.);

- Spermatozoi;
- Uova di parassiti dell'apparato urinario (per esempio, *Paersonema plica*);
- Contaminanti o artefatti (per esempio, materiali di origine vegetale o bolle di aria).

Per informazioni maggiormente approfondite si rimanda alla lettura di un testo di patologia clinica veterinaria o di citologia diagnostica veterinaria.

8. CONTROLLO QUALITA'

Prima di ogni utilizzo del rifrattometro vengono svolte le procedure di calibrazione (Vedi punto 5)

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica il corretto uso della strumentazione di laboratorio. In particolare

Rifrattometro:

- Pulire accuratamente il vetro del rifrattometro con acqua distillata dopo ogni utilizzo;
- Asciugare con un panno, facendo attenzione a non graffiare il vetro;
- "Azzerrare" lo strumento ponendo 2-3 gocce di acqua distillata sull'apposito supporto e regolando l'oculare fino a ottenere una lettura di 1000 (idealmente questa operazione dovrebbe essere effettuata prima e dopo ogni utilizzo). Non immergere il prisma nell'acqua;
- Dopo ogni utilizzo verificare che il rifrattometro sia stato correttamente asciugato e riposto nel suo apposito contenitore.

Analizzatore automatico

- Pulire il carrello porta striscia con un panno (senza filamenti) dopo ogni lettura;
- dopo che l'analizzatore viene spento, strofinare la parte esterna (escluso il display) con un panno umido e un detergente delicato.
- N.B.: Non utilizzare strisce danneggiate o scadute. Non spingere il carrello dell'analizzatore fino in fondo perché potrebbe bloccarsi ed impedirne l'uso. Per ulteriori dettagli vedere il manuale d'uso dell'analizzatore automatico [Urilyzer® 100 \(Pro\)](#).

Microscopi

Dopo ogni utilizzo:

- Pulire il carrello portavetrino con ipoclorito di sodio all'1% ed alcool
- Pulire le lenti con alcool al 70%.
- Verificare il corretto spegnimento dell'apparecchio.

Centrifughe

A fine giornata:

- Pulire l'esterno dell'apparecchio con ipoclorito di sodio all'1% ed alcool;
- Verificare il corretto spegnimento dell'apparecchio.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- Assicurarsi che il tappo sia riposizionato sulla provetta del campione prima di essere smaltito nel bidone dei rifiuti speciali a rischio biologico o riposto in frigorifero se da sottoporre ad ulteriori analisi.
- Smaltire tutto il materiale venuto in contatto con il campione (Es. pipette, carta bibula, puntali monouso) nel contenitore dei rifiuti speciali a rischio biologico.

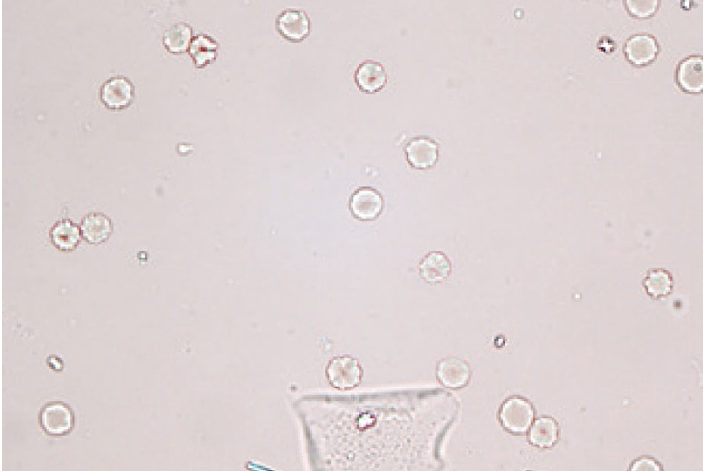
11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.
- Rose E. Raskin & Denny J. Meyer. Citologia diagnostica del cane e del gatto. 2016. EDRA, 3° EDIZIONE.
- S M Lewis & Sudarshan Kumari. Guidelines on Standard Operating Procedures for Haematology. World Health Organization Regional Office for South-East Asia - New Delhi. 2000.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61.
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI

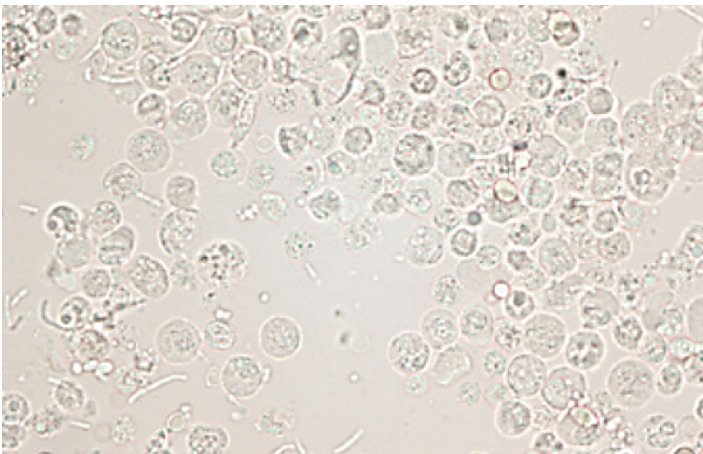
Allegato 1 – Iconografia

Allegato 1 - Iconografia



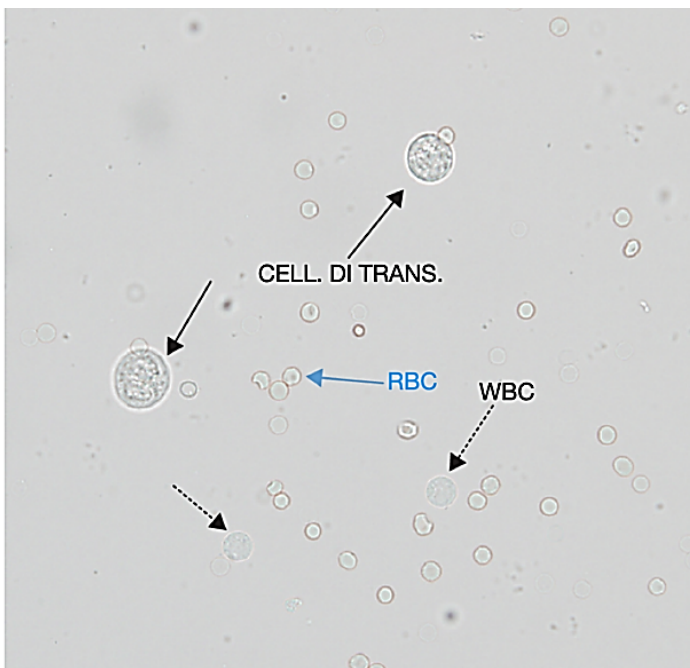
Eritrociti

Gli eritrociti (o RBC, *red blood cell*) possono apparire sotto forma di dischi lisci con profilo arrotondato oppure sotto forma di elementi cellulari crenati (o echinociti) in caso di invecchiamento del campione



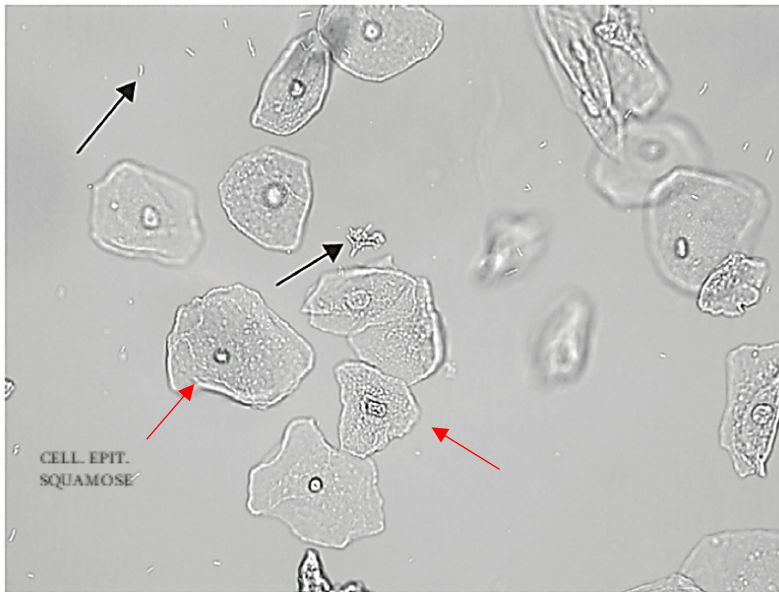
Leucociti

I leucociti (o WBC, *white blood cell*) sono di dimensioni maggiori rispetto agli eritrociti, anche se la differenza può risultare impercettibile. Quando non sottoposti a colorazione, il loro contenuto appare granulare e possono essere presenti singolarmente o in ammassi.



Cellule epiteliali di transizione

Le cellule epiteliali di transizione sono di dimensioni relativamente grandi e hanno una forma variabile da rotonda a ovale



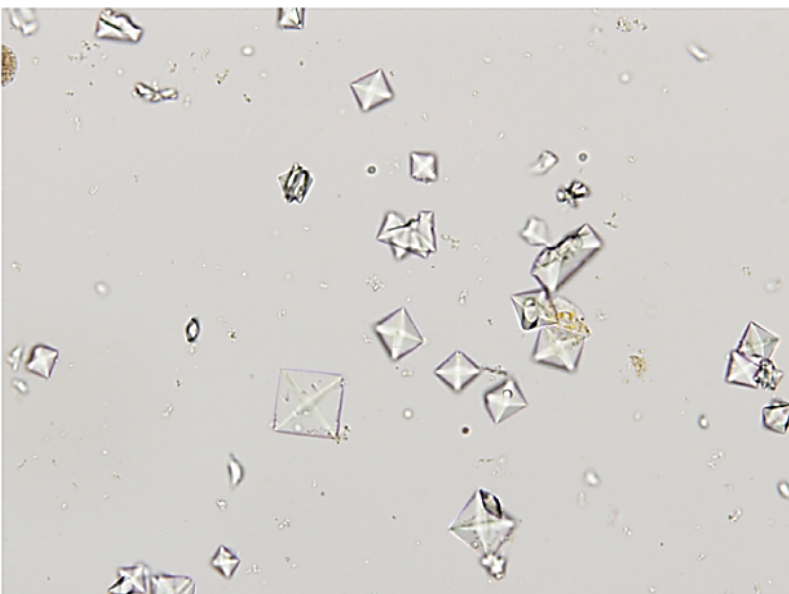
Cellule epiteliali squamose

Le cellule epiteliali squamose sono gli elementi cellulari più grandi e hanno spesso un profilo spigoloso o poligonale.



Cristalli di struvite

Struvite (o cristalli di fosfato ammonio magnesiaco): forma oblunga “a coperchio di bara” sebbene possano presentarsi in varie forme.



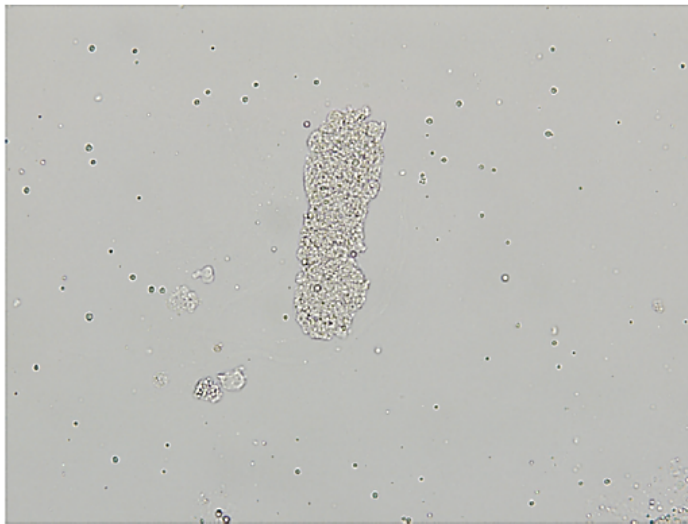
Cristalli di ossalato di calcio

Ossalato di calcio diidrato: forma quadrangolare, con una tipica formazione “a croce di Malta” sebbene possano avere dimensioni estremamente variabili e talvolta sono visibili solo ad alto ingrandimento (400x).



Cilindri ialini

Corpi a superficie liscia, quasi trasparenti, privi di una struttura interna.



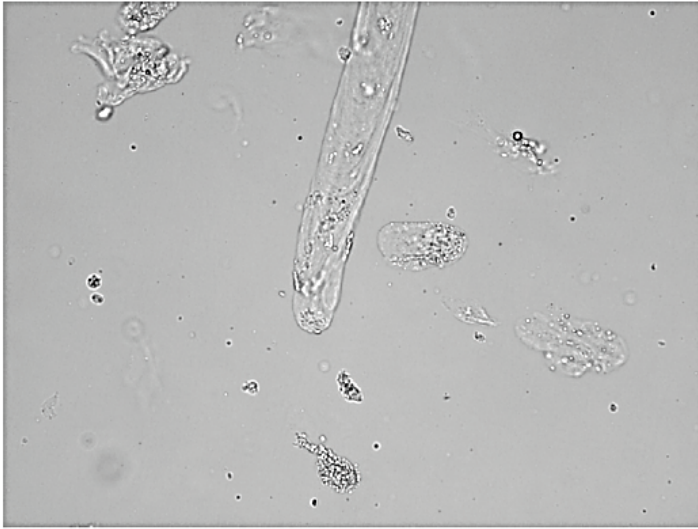
Cilindri granulari

Possono contenere granuli fini o grossolani, a seconda del materiale costitutivo e del tempo trascorso dalla loro formazione.



Cilindri cellulari

Incorporano cellule epiteliali, eritrociti o leucociti (o una combinazione di questi elementi).




Cilindri cerei

Cilindri più spessi e più densi dei calchi ialini, ad alto indice di rifrazione.

BIOCHIMICA CLINICA

Nome SOP:	CM_LDV_15.01	Pagine 4
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note
TITOLO		Biochimica clinica

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Version No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_15.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) ha lo scopo di descrivere le modalità con cui effettuare correttamente le indagini diagnostiche di biochimica clinica su campioni di siero/plasma, con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso i Laboratori della Sezione di Clinica Medica. La chimica clinica, o biochimica clinica, è un ramo della medicina di laboratorio che si occupa dello studio delle alterazioni biochimiche di natura patologica.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Chimica clinica (Laboratorio 2) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITÀ

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- I campioni di siero e/o plasma devono essere idonei (Vedi **SOP CM_LDV_04.01** Ricezione e gestione dei campioni biologici);

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Analizzatore biochimico SAT450 (Assel, Roma);
- Capsuline per analizzatore biochimico SAT450;
- Reagenti per analizzatore biochimico SAT450 (all'occorrenza);
- Soluzioni di lavaggio per analizzatore biochimico SAT450 (i.e., rinse solution [liquido I], acqua distillata [liquido II], cleaning solution [liquido III], acid solution [liquido IV]) (all'occorrenza);
- Sieri di controllo (e.g., System Control N) (all'occorrenza);
- Calibratori per chimica clinica (e.g., Plus Calibrator) (all'occorrenza);
- Micropipette a volume variabile P100 e P1000;
- Puntali per micropipette a volume variabile P100 e P1000.

7. PROCEDURE

Preparazione dell'area di lavoro

- Assicurarsi che l'area di lavoro sia pulita e, se possibile, sgombra da materiali non utili per la procedura oggetto della SOP.
- Indossare il camice ed i guanti.

Preparazione del campione

- Portare il campione a temperatura ambiente se conservato in regime di refrigerazione.
- Mescolare delicatamente il campione con una micropipetta P100, evitando la creazione di bolle al suo interno.
- Aliquotare il campione nelle apposite capsuline precedentemente identificate con il nome o l'identificativo del paziente.

N.B. Il quantitativo di campione di siero/plasma da utilizzare varia in funzione della tipologia di analisi richieste. In linea generale, il profilo biochimico completo richiede una quantità di almeno 600 µl di siero.

Esecuzione dell'analisi

- Effettuare l'accesso al software dell'analizzatore attraverso l'icona "SAT 450" presente sul desktop del computer *msi* situato nel Laboratorio 2, inserendo username e password noti al personale autorizzato.
- Attendere lo svolgimento delle procedure di inizializzazione del software;
- Controllare il livello delle soluzioni di lavaggio stoccate nei flaconi adiacenti all'analizzatore e nei due serbatoi di scarto;
- Se il Sat 450 è rimasto inutilizzato per più di 24 ore (ad esempio durante il fine settimana), eseguire un ciclo di lavaggio delle cuvette;
- Eseguire il "WBL" (WBL Water Base Line o Water Blank Level) delle cuvette premendo il tasto designato nella maschera di "Avvio";
- Valutare i risultati del WBL cuvette;
- Verificare la configurazione e i livelli di fornitura dei reagenti nella maschera "Monitor Sistema";
- Verificare la validità della calibrazione corrente e, se necessario, effettuare una nuova calibrazione;
- Eseguire i controlli di qualità (vedi di seguito punto 8 "controllo di qualità");
- Programmare la routine introducendo i dati dei pazienti e l'analisi richiesta manualmente nella maschera "Imposta lista lavoro" accessibile dalla voce del menù "Lavoro";
- Inserire le capsule nei rotori dedicati;
- Eseguire la routine;
- Esaminare i risultati (mostrati nella maschera "Monitor Sistema" o in quella "Risultati campioni per campione/per test" accessibile dalla voce del menù "Lavoro"), valutarli e decidere (se necessario) di richiedere la ripetizione di una specifica analisi;
- Stampare i risultati delle analisi;
- Archiviare i risultati delle analisi nel software;
- Al termine del lavoro, il software SAT 450 può essere spento o lasciato in "Stand-by".
- Rimuovere sempre tutte le cuvette presenti a bordo dell'analizzatore.

N.B. L'analizzatore biochimico SAT450 deve rimanere sempre acceso.

8. CONTROLLO QUALITÀ

Allo scopo di tenere sotto controllo l'efficienza dei metodi di misura, ed in particolare la precisione e l'accuratezza dell'analizzatore biochimico, è necessario procedere con l'esecuzione del controllo di qualità prima di ciascuna attività di analisi e della calibrazione ogni due settimane nonché all'occorrenza nel caso in cui la calibrazione corrente non dovesse risultare valida.

N.B. Per ulteriori informazioni riguardo le procedure di ricostituzione dei sieri di controllo e dei calibratori per chimica clinica consultare le relative schede di sicurezza fornite dal produttore.

9. MANUTENZIONE

Giornalmente:

Prima di effettuare l'accesso al software dell'analizzatore:

- Controllare il livello dei liquidi I, II, III, IV e, se necessario, riempire i relativi serbatoi;
N.B. Per la ricostituzione dei liquidi consultare le schede di sicurezza delle soluzioni di lavaggio fornite dal produttore.
- Controllare la configurazione e i livelli di reagenti, standard e controlli;
- Controllare il livello dei due serbatoi di scarto e, se necessario, procedere con lo smaltimento (vedi di seguito);
- Prima di procedere con l'esecuzione delle analisi, eseguire il "WBL" delle cuvette;

- Al termine delle attività di analisi, eseguire l'ISE Cleaning e Conditioning del modulo ISE.

Settimanalmente:

Al termine delle attività di analisi, eseguire la procedura di pulizia del lato esterno della sonda di campionamento;

Eseguire la procedura di pulizia dei pozzetti di lavaggio.

Bisettimanalmente:

Eseguire la procedura di pulizia delle sonde della stazione di lavaggio e dei serbatoi contenenti i liquidi I, II, III e IV.

Mensilmente:

Eseguire la procedura di lavaggio del circuito idraulico.

Ogni tre mesi:

Ogni tre mesi procedere alla sostituzione delle cuvette di reazione.

Se necessario, eseguire la procedura di pulizia del tampone di asciugatura.

N.B. Per ulteriori informazioni riguardo le singole procedure di manutenzione fare riferimento al manuale d'uso dell'analizzatore biochimico SAT 450.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

I campioni biologici di siero/plasma utilizzati per le indagini diagnostiche di biochimica clinica possono essere conservati in congelatore (temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$) fino a sei mesi oppure in frigorifero (a $+2^{\circ}/+8^{\circ}\text{C}$) per 7 giorni, altrimenti smaltiti nei contenitori dedicati ai rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo.

Per il corretto smaltimento dei campioni biologici e dei reagenti vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio.

- Smaltire tutti i campioni biologici ed i materiali venuti a contatto con sostanze biologiche in robusto sacco di plastica posto all'interno di apposito contenitore contrassegnato con simbolo "rifiuti speciali a rischio biologico";
- Una volta riempito il sacco deve essere sigillato;
- Chiudere il contenitore per i rifiuti speciali;
- Smaltire tutti i liquidi a rischio biologico in apposita tanica in plastica con chiusura a tenuta e contrassegnata con simbolo "rifiuti speciali a rischio biologico";

N.B. Nessuna sostanza liquida a rischio biologico può essere eliminata attraverso le fognature.

11. REFERENZE

Paltrinieri S., Bertazzolo W., Girdano A. Patologia clinica del cane e del gatto. Approccio pratico alla diagnostica di laboratorio. 1° ed. Elsevier-Masson, luglio 2010, pp 362.

Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3A EDIZIONE.

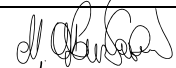

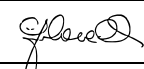
SAT 450 – Manuale operativo - marzo 2020

Villiers E., Ristić J. Gli esami di laboratorio – Indicazioni, esecuzione, interpretazione – Cane e gatto. 3° ed. a cura di Paltrinieri S., Dondi F., Giordano A., Edra-EV, settembre 2017, pp 684

12. ALLEGATI

ELETTROFORESI DELLE SIEROPROTEINE

Nome SOP:	CM_LDV_16.01	Pagine 5
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari, Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note
TITOLO Elettroforesi delle sieroproteine		

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Version No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_16.01	originale			01/01/2023

1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) ha lo scopo di descrivere le modalità con cui effettuare correttamente le indagini diagnostiche di elettroforesi delle proteine su campioni di siero, con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso i Laboratori della Sezione di Clinica Medica. L'elettroforesi delle sieroproteine è una tecnica che permette di separare le diverse frazioni proteiche presenti nel sangue consentendo il riconoscimento di alterazioni della concentrazione delle varie frazioni proteiche.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Chimica clinica (Laboratorio 2) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- I campioni di siero e/o devono essere idonei (Vedi **SOP CM_LDV_04.01** Ricezione e gestione dei campioni biologici);

6. ATTREZZATURE E MATERIALI

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Analizzatore per elettroforesi su gel d'agarosio HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING (SEBIA);
- Kit HYDRAGEL β 1- β 2 7/15/30 (SEBIA) che comprende:
 - Gels di agarosio (pronti all'uso);
 - Strisce tamponate (pronte all'uso);
 - Diluente per la soluzione colorante (soluzione concentrata);
 - Colorante amidoschwartz (soluzione concentrata);
 - Applicatori (pronti all'uso);
 - Cartine da filtro sottili.
- Telaio portagel;
- Camera umida di conservazione
- Sieri di controllo normale (E siero di controllo, SEBIA PN 4785) (all'occorrenza);
- Micropipette a volume variabile P10 e P100;
- Puntali per micropipette a volume variabile P10 e P100.

7. PROCEDURE

7.1 Preparazione dell'area di lavoro

- Assicurarci che l'area di lavoro sia pulita e, se possibile, sgombra da materiali non utili per la procedura oggetto della SOP.
- Indossare il camice ed i guanti.

7.2 Preparazione del campione

- Portare il campione a temperatura ambiente se conservato in regime di refrigerazione;
- Mescolare delicatamente il campione con una micropipetta P100, evitando la creazione di bolle al suo interno;
- Dopo aver posizionato l'applicatore per HYDRAGEL β 1- β 2 su di una superficie piana con i numeri dei pozzetti correttamente orientati verso l'alto, applicare in ciascun pozzetto 10 μ L di campione entro 2 minuti;
- Dopo il caricamento dei campioni, inserire l'applicatore nella camera umida di conservazione con i dentini rivolti (maneggiare i depositori mediante la cornice protettiva in plastica);
- Lasciare che i campioni diffondano nei dentini per 5 minuti dall'applicazione dell'ultimo campione.

Nota: Mantenere la camera così preparata in frigorifero se si intende usare gli applicatori più tardi (fino ad 8 ore).

7.3 Esecuzione dell'analisi

Migrazione

- Accendere l'analizzatore HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING attraverso l'interruttore ON/OFF posizionato nel pannello posteriore;
- Aprire il coperchio del modulo di migrazione e sollevare con cura le cornici mobili porta elettrodi e porta applicatori (carrello di migrazione);
- Selezionare dal menù dello strumento il programma di migrazione "7 B1-B2" per il gel HYDRAGEL 7 β 1- β 2 o il "15/30 B1-B2" per il gel HYDRAGEL β 1- β 2 15/30;
- Estrarre le strisce tamponate dalla confezione maneggiandole dalle linguette di plastica;
- Fissare le strisce tamponate agganciando le estremità in plastica forate sugli spinotti della cornice porta elettrodi;

Nota: il lato della striscia fissata sulla linguetta deve essere a contatto con l'elettrodo

- Estrarre il gel dalla confezione;
- Eliminare l'eccesso di liquido in superficie, stendendo sul gel la carta da filtro sottile;
- **Nota:** non lasciare le cartine da filtro in contatto prolungato con il gel in modo da evitare la sua disidratazione.
- Dispensare 120-200 μ L di acqua distillata/deionizzata sul terzo inferiore del riquadro stampato sulla Piastra di Controllo Temperatura del modulo di migrazione;
- Posizionare la lastrina del gel (faccia verso l'alto) sul piano a ridosso dello scalino alla base del riquadro;
- Curvare il gel e adagiarlo sulla goccia di acqua assicurandosi che non siano rimaste intrappolate bolle d'aria.

Nota: L'acqua deve essere uniformemente stratificata al di sotto della lastrina di gel e questa deve essere allineata all'interno del riquadro stampato;

- Abbassare il carrello di migrazione fino a battuta. In questa posizione le spugnette tamponate non toccano il gel;
- Estrarre l'applicatore dalla camera di umidificazione maneggiandolo mediante la cornice di protezione;
- Staccare la cornice di protezione dei dentini dell'applicatore;
- Con 7 e 15 campioni inserire l'applicatore, sulla cornice mobile, in posizione No. 6, con 30 campioni inserire i due applicatori rispettivamente in posizione No. 3 e 9;
- Chiudere lo sportello del modulo di migrazione;
- Avviare la sequenza premendo sull'icona di esecuzione del programma (freccia verde "START") e dopo la comparsa del messaggio "conferma?" premere nuovamente sull'icona di esecuzione.

Trattamento del gel

- Al termine del programma, aprire lo sportello, estrarre e gettare gli applicatori;
- Sollevare il carrello di migrazione, togliere le strisce tamponate tirandole dalle linguette e gettarle;

- Estrarre il gel essiccato pronto per le fasi successive;
Nota: dopo ogni utilizzo, pulire accuratamente gli elettrodi ed il piano di migrazione con una carta morbida umidificata
- Posizionare il gel all'interno del telaio portagel avendo cura che sia posizionato verso l'operatore;
- Inserire il telaio portagel nella fessura del modulo di colorazione;
- Selezionare il programma di colorazione "PROTEIN(E)/B1-B2" dal menù dello strumento ed avviare la procedura premendo il tasto "START";
Nota: Durante i cicli di colorazione, decolorazione e asciugatura, il compartimento rimane bloccato. Dopo il ciclo di raffreddamento, un segnale acustico indica che il compartimento è sbloccato (la ventilazione è mantenuta fino a quando il supporto del gel viene rimosso).
- Al termine del programma, togliere il telaio portagel dal suo alloggiamento e collocarlo nella fenditura del modulo di lettura.

Letture del gel

- Effettuare l'accesso al software dell'analizzatore attraverso l'icona "PHORESIS" presente sul desktop del computer *Philips* situato nel Laboratorio 2, inserendo username e password noti al personale autorizzato;
- Creare la lista di lavoro dei pazienti inserendo le seguenti informazioni (se disponibili): nome animale, specie, sesso, età, reparto, data di prelievo, proteine totali, data di prelievo;
Nota: per ulteriori informazioni consultare il manuale d'uso dell'analizzatore alla voce "funzione lista di lavoro a tabella".
- Avviare la lettura del gel accedendo alla funzione del menù "lettura da scanner" o attraverso l'icona e dopo aver selezionato la tipologia di gel utilizzata (e.g., gel (5) equivalente ad un gel da 7 pozzetti) dal menù a tendina di configurazione, premere "inizio lettura" per effettuare l'acquisizione delle immagini;
- La visualizzazione delle curve sotto forma di mosaico per il programma di lavoro in corso avviene attraverso un clic sul tasto "visualizza/nascondi l'anteprima delle letture" al seguito del quale è possibile selezionare la curva di interesse;
- Dalla finestra di visualizzazione dei singoli gel è possibile visionare l'immagine ingrandita della curva, i dati del paziente, i tasti di visualizzazione ed il numero del gel in corso di visualizzazione;
- Al termine dell'analisi vengono calcolati automaticamente le percentuali relative e/o le concentrazioni delle differenti frazioni grazie alla lettura densitometrica del gel.

8. CONTROLLO QUALITÀ

Si consiglia di includere, in ogni gruppo di campioni processati, un siero di controllo.

Nota: per ulteriori informazioni riguardo le procedure di ricostituzione dei sieri di controllo consultare le relative schede di sicurezza fornite dal produttore.

9. MANUTENZIONE

- Ogni giorno, dopo l'uso, pulire gli elettrodi ed il piano di migrazione con un foglio di carta morbida umidificata.
- Ogni settimana, avviare un programma di lavaggio che includa la pulizia del carrello di migrazione, delle parti esterne e dello schermo touch screen.
- Ogni tre mesi, si raccomanda di pulire tutte le taniche.

Nota: per ulteriori informazioni riguardo le singole procedure di manutenzione fare riferimento al manuale d'uso dell'analizzatore HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

I campioni biologici di siero utilizzati per l'elettroforesi delle sieroproteine possono essere conservati in congelatore (temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$) fino a sei mesi oppure in frigorifero (a $+2^{\circ}/+8^{\circ}\text{C}$) per 7 giorni, altrimenti

smaltiti nei contenitori dedicati ai rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo. I campioni biologici di siero/plasma utilizzati per le indagini diagnostiche di biochimica clinica possono essere conservati in congelatore (temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$) fino a sei mesi oppure in frigorifero (a $+2^{\circ}/+8^{\circ}\text{C}$) per 7 giorni, altrimenti smaltiti nei contenitori dedicati ai rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo.

Per il corretto smaltimento dei campioni biologici e dei reagenti vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio.

- Smaltire tutti i campioni biologici ed i materiali venuti a contatto con sostanze biologiche in robusto sacco di plastica posto all'interno di apposito contenitore contrassegnato con simbolo "rifiuti speciali a rischio biologico";
- Una volta riempito il sacco deve essere sigillato;
- Chiudere il contenitore per i rifiuti speciali;
- Smaltire tutti i liquidi a rischio biologico in apposita tanica in plastica con chiusura a tenuta e contrassegnata con simbolo "rifiuti speciali a rischio biologico";
- Nessuna sostanza liquida a rischio biologico può essere eliminata attraverso le fognature.

11. REFERENZE

Bertazzolo W., Bonfanti U., Paltrinieri S., Giraldi M., Lisi C. Manuale di elettroforesi delle sieroproteine del cane e del gatto. 1° ed. MYLAV Edition for Vets, maggio 2022.

Hydrasys 2 scan – Manuale di istruzioni – Versione 1.XX 2008/11

Paltrinieri S., Bertazzolo W., Girdano A. Patologia clinica del cane e del gatto. Approccio pratico alla diagnostica di laboratorio. 1° ed. Elsevier-Masson, 2010.

Villiers E., Ristić J. Gli esami di laboratorio – Indicazioni, esecuzione, interpretazione – Cane e gatto. 3° ed. a cura di Paltrinieri S., Dondi F., Giordano A., Edra-EV, 2017.

12. ALLEGATI



ESAME DELLE FECI

Nome della SOP:	CM_LDV_17.01	Pagine 10
Versione No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari, Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO	Esame delle feci	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_17.01	originale			01/01/2023

1 SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente le indagini diagnostiche su campioni di feci con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso Laboratorio di Diagnostica parassitologica della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

Gli esami coprologici vengono eseguiti principalmente per rilevare parassiti gastrointestinali e broncopulmonari. Si tratta di numerosissimi patogeni per la cui diagnosi e corretta identificazione sono essenziali corrette pratiche di campionamento nonché specifiche tecniche di laboratorio.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Diagnosi Parassitologica (Laboratorio 3) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

- Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio);
- I liquidi derivanti dall'esecuzione dei test vanno smaltiti nell'apposita tanica per rifiuti speciali a rischio biologico presente nel laboratorio di Diagnostica Parassitologica – Laboratorio 3, della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.
- I campioni solidi processati, ed i materiali di consumo usati durante l'esecuzione dei test vanno smaltiti nell'apposito contenitore per rifiuti speciali a rischio biologico presente laboratorio di Diagnostica Parassitologica – Laboratorio 3, della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria;
- Prima di essere eliminati i campioni fecali devono essere chiusi in contenitori a tenuta o in buste sigillate;
- Il bidone deve essere sempre chiuso con il suo coperchio ermetico.
- Gli attrezzi di laboratorio utilizzati durante la processazione del campione (matraci, pestelli, imbuti ecc) devono essere sanificati seguendo le procedure descritte nella presente SOP (Vedi punto 7)

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

- Il campione deve essere idoneo (Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici);
- Al momento della ricezione il campione deve essere:
 - Accompagnato dal modulo di richiesta analisi (Allegato 1 - **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici);
 - Fresco;
 - Correttamente raccolto;
 - Idoneamente conservato;
- L'operatore deve assicurarsi che sul contenitore sia stata correttamente applicata l'etichetta adesiva con i dati del paziente e del proprietario;
N.B. La presenza di materiale grossolano o non digerito nelle feci può rendere difficile l'interpretazione dei risultati. I campioni di feci troppo secchi o mescolati con terra o altro materiale sono considerati campioni non idonei
- I campioni fecali devono preferibilmente essere raccolti dal retto ed esaminati freschi;

N.B. Se è difficile prelevare campioni rettali, le feci fresche possono essere raccolte dalla lettiera o dal pavimento dopo l'evacuazione dell'animale.

- La quantità del campione deve essere di almeno 4 gr di feci formate;
 - Se le feci sono morbide/malcomposte, la quantità del campione deve essere di 8 gr.
 - Se diarroiche, il campione deve essere di 16 gr.
 - Per le feci liquide è appropriato un campione di 20 gr o superiore.
- Una quantità di campione inadeguata può causare risultati falsi negativi.
- Per rimuovere grandi detriti fecali, si consiglia di setacciare prima delle analisi attraverso una garza dopo la miscelazione con acqua o soluzione di flottazione.
- Per alcuni test, come quello con l'apparato di Baermann o la ricerca di protozoi del genere *Giardia* spp è necessario raccogliere le feci in tre giorni consecutivi.

N.B. Questo aspetto è fondamentale visto che l'eliminazione di alcuni parassiti non è costante e la singola raccolta potrebbe comportare un risultato falso negativo dell'esame.

- I campioni raccolti dopo diverse ore, se mal conservati, potrebbero deteriorarsi. I campioni raccolti da più di 24 ore, infatti, possono essere disidratati e di difficile interpretazione a causa di cambiamenti morfologici e modifiche degli elementi parassitari.
- Il campione può essere conservato per 2-3 giorni in frigorifero (4°C) o anche più a lungo in una soluzione di formalina al 10% a temperatura ambiente per minimizzare le alterazioni.

6. Apparecchiatura e materiali

- DPI (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Microscopio ottico con obiettivi 4X, 10X, 40X e 100x ([Leica DM750](#));
- Stereomicroscopio Wild MB;
- Retroilluminatore LEICA CLS 150 XE sorgente a luce fredda;
- Centrifuga [Thermo Scientific Medifuge](#);
- Contenitori in plastica per feci;
- Mortai;
- Pestelli;
- Etichette;
- Garze 20x20cm;
- Provette in plastica da 10 ml;
- Tappi in plastica a tenuta per provette;
- Vetrini portaoggetto;
- Vetrini coprioggetto;
- Pipette Pasteur monouso;
- Vetrini da orologio;
- Acqua;
- Camera McMaster;
- Apparato Baerman;
- Bilancia di precisione;
- Cilindri calibrati di diverse dimensioni; Densimetro di Baumé.
- Soluzioni di flottazione a densità differenziata (Vedi allegato 1);
- Soluzione di Lugol (Vedi allegato 1)

7. PROCEDURE

Tecniche di diagnostica coprologica:

- Esame diretto (striscio diretto)

- Flottazione (centrifuga o passiva)
- Metodo McMaster
- Sedimentazione
- Test di Baermann

7.1. Esame fecale mediante striscio diretto

L'esame fecale mediante striscio diretto è un test estremamente rapido che presenta costi contenuti. Viene eseguito per rilevare parassiti gastrointestinali come nematodi, anchilostomi, tricocefali, tenie, *Giardia* spp. e coccidi.

Tecnica:

- Mescolare alcune gocce d'acqua ad una quantità equivalente di feci su un vetrino da orologio.
N.B. Per agevolare la lettura i campioni possono essere colorati con la soluzione liquida di Lugol considerando che le forme vegetative dei protozoi dopo il trattamento con iodio perdono la loro mobilità (precondizione per l'osservazione allo stato fresco).
- Mescolare il campione con 2/3 gocce di Lugol fino ad ottenere una miscela omogenea di colore marrone. Mediante l'uso di una pipetta Pasteur disporre due gocce di sospensione su un vetrino da microscopio; Mantenere il vetrino leggermente inclinato. (L'inclinazione del vetrino consente alle uova più leggere di allontanarsi dai detriti più pesanti).
- Porre un vetrino coprioggetto sul campione
- Esaminare il preparato al microscopio ottico.

N.B È utile mettere a fuoco una piccola bolla d'aria per ottenere il piano focale corretto. Il bordo del coprioggetto può essere sigillato con smalto per unghie per evitare l'essiccazione e per consentire l'esame del campione ad immersione.

Questo metodo consente di rilevare uova, larve e protozoi mobili come *Giardia* o *Tricomonas*, ma a causa della piccola quantità di feci che si sottopone ad esame, presenta bassa sensibilità.

Nel caso di esame a fresco per la ricerca di protozoi del genere *Giardia* spp si raccomanda di esaminare campioni di feci emesse in tre giorni consecutivi

7.2. Flottazione (esame qualitativo per arricchimento)

La flottazione è un metodo di arricchimento e ha lo scopo di concentrare il maggior numero di uova (o altre forme parassitarie) dalla minor quantità possibile di materiale da analizzare. Questo esame permette di evidenziare protozoi, uova di nematodi e di digenea, oncosferere di cestodi e, occasionalmente, larve di elminti.

Il principio di qualsiasi metodo di flottazione è che quando le uova di un parassita sono sospese in un liquido con un peso specifico superiore a quello delle uova stesse, queste ultime salgono in superficie.

Protozoi, e uova di nematodi e cestodi galleggiano in liquidi con peso specifico compreso tra 1100 e 1200;

Le uova di trematodi, molto più pesanti, richiedono un peso specifico di 1300 e 1350.

Le soluzioni di flottazione utilizzate per le uova di nematodi e cestodi sono principalmente a base di cloruro di sodio o talvolta solfato di magnesio.

Per le uova di trematodi sono ampiamente utilizzate soluzioni sature di cloruro di zinco o solfato di zinco.

Nonostante la soluzione di iodio potassio mercuriata sia utilizzata in molti laboratori, questa soluzione non viene utilizzata nel laboratorio di Diagnostica Parassitologica della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria perché estremamente tossica e pericolosa per gli operatori.

Qualunque sia la soluzione impiegata, il peso specifico deve essere controllato regolarmente. Sia il tipo che la concentrazione di soluzioni zuccherine o saline utilizzate possono influenzare la sensibilità della diagnosi

Tecnica:

- Porre in un matraccio una piccola quantità di feci fresche (2,0 o 3,0 gr) a 30 ml di soluzione di flottazione;
- Miscelare per ottenere una sospensione fecale omogenea;
- Trasferire la sospensione in una provetta da 10 ml e riempirla fino a creare un menisco;
- Posizionare un vetrino coprioggetto sopra la provetta sulla superficie della sospensione fecale;
- Attendere per 20 minuti;
- Rimuovere il coprioggetto;
- Posizionare il coprioggetto su un vetrino ed esaminarlo al microscopio.

7.3 Mc Master (esame quantitativo)

Questa tecnica quantitativa viene utilizzata quando è necessario contare il numero di uova o larve per grammo di feci utilizzando una camera di conta, la "Camera di Mc Master".

Essa è formata da due vetrini sovrapposti delimitati tra loro da uno spazio di 1.5 mm. Sul vetrino superiore sono disegnati due quadrati di 1 cm di lato, per cui il volume delle camere sottostanti, utile per l'esame, è di 0.30 mL (0,15 mL a camera). Ogni singola camera è delimitata da 6 corridoi, questi rappresentano l'area dove saranno contate le uova (Figura 1).



Figura 1. Camera di Mc Master

Tecnica

- Pesare 2.0 g di feci;
- Porle in un mortaio;
- Aggiungere 28 mL della soluzione di flottazione che si intende utilizzare (NaCl, ZnCl₂, ZnSO₄);
- Miscelare accuratamente con il pestello fino ad ottenere una soluzione omogenea;
- Filtrare la soluzione fecale con garza a doppio strato;
- Versarla in un becker;
- Prelevare con una pipetta Pasteur la soluzione avendo cura nell'effettuare questa operazione, di applicare una rotazione continua all'interno del becker durante la fase di aspirazione del liquido;
- Appoggiare la punta della pipetta in corrispondenza dell'intercapedine tra i due vetrini;
- Far defluire il liquido che, per capillarità, si distribuirà omogeneamente nella prima camera
- Ripetere l'operazione con la seconda camera;
- Lasciare riposare il preparato per qualche minuto in posizione orizzontale;
- Esaminare al microscopio a piccolo ingrandimento (4X o 10X);
- Contare tutte le uova/oocisti/larve comprese nel quadrato disegnato sul vetrino, (ossia nei sei corridoi) di ogni singola camera;
- Moltiplicare il numero di uova o larve per 100, e dividere per 2 così da ottenere il numero di uova per grammo di feci (epg);

N.B Se non si osserva alcun uovo o larva è necessario confermare la negatività del campione attraverso la flottazione fecale del fluido che non viene utilizzato per il riempimento della camera.

Il metodo di McMaster ha una sensibilità di 50 epg pertanto cariche inferiori potrebbero essere interpretate come falsi negativi. Se la presenza di uova o larve viene rilevata dalla flottazione, il valore di upg sarà indicato, indipendentemente dal loro numero, come <50.

È impossibile calcolare dall'upg l'effettiva popolazione di parassiti dell'ospite, poiché molti fattori influenzano la produzione di uova, inoltre anche il numero di uova varia a seconda della specie. Tuttavia, i conteggi delle uova superiori a 1000 sono generalmente considerati indicativi di infezioni gravi e quelli superiori a 500 di infezione moderata. Tuttavia, un basso upg non è necessariamente indicativo di infezioni molto basse.

Lo stato fisico delle feci può influenzare notevolmente i risultati di questo esame. Pertanto si consiglia di moltiplicare il numero di uova per i seguenti fattori di correzione:

- feci molli x 1,3
- feci molli x 2

- feci molto morbide ma non liquide x 3
- feci diarroiche x 4.

7.3 Sedimentazione fecale (esame qualitativo per arricchimento)

La sedimentazione fecale viene utilizzata per rilevare uova grandi o pesanti come quelle di molti spiruridi, trematodi e cestodi che, per il loro peso, non vengono rilevate con la tecnica di flottazione fecale. Il sedimento contiene molti detriti, quindi esaminare questi preparati può risultare piuttosto difficile. A volte è utile aggiungere al preparato del nuovo blu di metilene come colorante di sfondo per evidenziare gli elementi parassitari. La soluzione di Lugol può invece essere utilizzata per evidenziare le strutture interne di uova, oocisti e cisti.

Esistono molte varianti sulla tecnica di sedimentazione fecale, molte delle quali includono una fase che utilizza solventi organici per rimuovere parte del materiale dal sedimento. Una semplice suggerimento è quello di aggiungere di una goccia di detersivo per piatti all'acqua (100 ml) utile a liberare le uova dai detriti. La sedimentazione può essere spontanea, oppure ottenuta per centrifugazione a bassa velocità.

Tecniche:

Sedimentazione diretta (o passiva)

- Omogeneizzare 3 gr di feci con acqua;
- Passare la sospensione attraverso un setaccio a maglie larghe (250 μm);
- Trasferire il filtrato in una beuta conica e lasciare riposare per 40-60 minuti;
- Rimuovere il surnatante e trasferire il resto (circa 12 - 15 ml) in una piastra Petri;
- Fare sedimentare per altri 2 minuti;
- Prelevare nuovamente il surnatante;
- Aggiungere alcune gocce di soluzione di Lugol o di nuovo blu di metilene nel sedimento;
- Osservare il sedimento fecale utilizzando uno stereomicroscopio.

Sedimentazione per centrifugazione

- Aggiungere 7 ml di acqua su circa 2 gr di feci.
- Filtrare il composto.
- Versare il preparato filtrato in una provetta da centrifuga
- Centrifugare a 600-1000 rpm per circa 5 minuti;
- Fare decantare il sedimento;
- Rimuovere parte del sedimento dallo strato superiore utilizzando una pipetta;
- Mettere una goccia di sedimento su un vetrino per l'esame;
- Posizionare un vetrino coprioggetto sopra la goccia di sospensione di sedimento;
- Mescolare una goccia di Lugol per migliorare la visualizzazione di uova o oocisti.

N.B. Se sono presenti molti detriti, è possibile aggiungere prima dell'acqua.

7.4 Esame mediante apparato di Baermann

Questa tecnica è una modifica dell'apparato Berlese utilizzato dagli entomologi per raccogliere insetti da campioni di piante e terreno. Viene utilizzato per recuperare le larve di nematodi da feci, suolo, materiale vegetale o altro materiale organico.

L'apparecchio è costituito da un imbuto di vetro tenuto in un supporto munito di una valvola che ne permette la chiusura e l'apertura.

L'apparato di Baermann è utilizzato per recuperare larve di primo stadio (L1) di nematodi (*Protostrongylidae*, *Dictyocaulidae* e *Metastrongilidae*), che presentano mobilità spontanea e forte idrofilia. Il test di Baermann funziona in base al principio secondo cui le larve del nematode escono dal campione biologico, non possono nuotare contro la gravità e cadono attraverso l'acqua nell'area del tubo bloccato. Il morsetto viene rilasciato per raccogliere le larve per l'identificazione. Per questo motivo qualsiasi campione fecale inviato per questa procedura deve essere stato appena emesso in modo da non risultare contaminato da nematodi a vita libera.

In sintesi, questo apparato è utile per:

- Diagnosi di infezione da vermi polmonari
- Identificazione di larve di terzo stadio [L3] da coproculture.

La validità dell'esame è fortemente condizionata dal campionamento (su tre giorni) e dalla qualità del campione fecale che non deve essere (per quanto possibile) contaminato da nematodi a vita libera. Il test di Baermann non è raccomandato come tecnica diagnostica primaria per la diagnosi di parassitosi gastrointestinali.

Tecnica

- Preparare un pool di 3 campioni fecali da 5 gr;
- Posizionarli direttamente in una garza 20x 20cm;
- Chiudere il quadrato di garza con del filo morbido a formare un sacchetto;
- Inserire il sacchetto così chiuso nell'imbuto;
- Chiudere saldamente la valvola dell'imbuto;
- Aggiungere acqua tiepida fino a 3/4 dell'imbuto e lasciare riposare 24 ore.
- dopo 24 ore:
- Aprire delicatamente la valvola dell'imbuto;
- Far fuoriuscire la soluzione fecale fino a riempire quasi una provetta a base conica da 10 ml;
- Aggiungere al liquido alcune gocce di soluzione iodata di iodio;
- Centrifugare a 1000 rpm per 5 minuti;
- Rimuovere il surnatante;
- Raccogliere l'intero sedimento con una pipetta e metterlo in una piastra di Petri;
- Osservare il sedimento fecale utilizzando uno stereomicroscopio.

In alternativa:

- Con una pipetta Pasteur trasferire una piccola goccia del sedimento dalla capsula di Petri a un vetrino da microscopio.
- Posizionare delicatamente un coprioggetto sulla goccia;
- Esaminare al microscopio ottico ad ingrandimento 10X;
N.B Eventuali nematodi a vita libera si tingeranno di marrone scuro molto rapidamente, mentre le larve delle specie parassite si tingeranno solo molto lentamente poiché la guaina larvale protegge il loro corpo. I nematodi a vita libera possono essere distinti su base morfologica perché' dotati di un esofago a doppio bulbo (rabditiforme), estremità caudale dritta o filiforme e notevoli dimensioni.
- **Pulizia e sanificazione delle attrezzature e materiali diagnostici**
- Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio);

Alla fine di ogni test:



- Smaltire i residui liquidi di campione nell'apposito bidone per i rifiuti speciali liquidi a rischio biologico
- Rimuovere i residui grossolani di campione dai matracci e dai pestelli usando carta asciugamani;
- Smaltire la carta contaminata nel bidone dei rifiuti speciali a rischio biologico.
- Procedere a lavaggio accurato con sapone per stoviglie usando unicamente la spugna dedicata;
- Immergere il materiale in apposita vaschetta contenente ipoclorito di sodio al 10% per 30 minuti;
- Sciacquare accuratamente con acqua di fonte;
- Fare asciugare all'aria.
- Procedere alla pulizia di tutte le superfici di lavoro con ipoclorito di sodio al 2% ed alcool.

8. CONTROLLO QUALITA'

Non applicabile.

9. MANUTENZIONE

Non applicabile.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- I campioni fecali dopo essere stati processati, devono essere smaltiti, salvo diverse indicazioni del Responsabile di Laboratorio e/o di Sezione.
- Tutti i campioni fecali devono essere considerati potenzialmente infetti.
- È fatto obbligo dell'uso dei DPI durante tutte le attività di eliminazione dei campioni (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- I campioni fecali valutati come non idonei devono essere smaltiti nel laboratorio di ricevimento (Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica) e non essere portati in altri laboratori;
- Contenitori primari e secondari contaminati da campione fuoriuscito non devono essere aperti ma eliminati direttamente nel contenitore dei rifiuti speciali solidi a rischio biologico secondo precisa procedura (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Documenti di trasporto contaminati da campioni fecali non devono essere rimossi dal contenitore secondario e smaltiti con lo stesso nel contenitore per rifiuti speciali a rischio biologico;
- DPI e materiale monouso entrato in contatto con il campione devono essere smaltiti nel contenitore dei rifiuti speciali a rischio biologico;
- Prima di essere eliminati i campioni fecali devono essere chiusi in contenitori a tenuta o in buste sigillate;
- Il contenitore per lo smaltimento dei campioni biologici deve essere sempre chiuso con il suo coperchio ermetico.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3^A EDIZIONE.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.

12. ALLEGATI

Allegato 1 – Linee guida per preparazioni soluzioni

Allegato 1

Linee guida per la preparazione di soluzioni di flottazione e soluzioni iodate (Lugol)

Soluzione a bassa densità (densità di circa 1.100) Utile per il rilevamento di oocisti e uova di elminti.

Soluzione sovrasatura di cloruro di sodio (NaCl).

Questa soluzione è molto semplice da preparare, ma è instabile, poiché i valori della sua densità variano in funzione della temperatura (es. 1.120 a 10°C e 1.200 a 38°C).

Attrezzature e componenti

- Cloruro di sodio (NaCl)
- 1000 ml di acqua calda (da 50° a 60°C)
- Cilindro
- Grande cono in plastica
- Densimetro di Baumé
- Bacchetta di vetro
- Bottiglia di vetro (contenitore della soluzione)

7.1.2 Tecnica

- Riempire il cono di plastica con acqua calda a circa 50-60 °C
- Aggiungere un bicchiere di sale (NaCl).
- Agitare il tutto a lungo.

N.B Generalmente, la soluzione diventa satura dopo 24 ore. La densità è 1.200 utilizzando circa 720 gr. Di soluto Il valore di densità deve essere controllato dopo ogni preparazione utilizzando l'idrometro Baumé. E' importante lasciare sempre uno strato di almeno 2-3 cm di sale non disciolto sul fondo del contenitore della soluzione.

Soluzione a densità medio-bassa (densità pari o superiore a 1.200) Utile per la ricerca di oocisti comuni e uova di elminti.

Soluzione di Cloruro di zinco (ZnCl₂) e cloruro di sodio (NaCl).

La densità varia tra 1.180 e 1.250 fino a raggiungere la densità di 1.350 aumentando la concentrazione di ZnCl₂. La soluzione, però, tende ad essere schiumogena, e spesso rende poco facile la diagnosi. Se viene lasciata troppo a lungo a contatto con il campione fecale, altera anche la morfologia delle uova.

Attrezzature e componenti

- Cloruro di zinco;
- Cloruro di sodio;
- Acqua;
- Cilindro in vetro;
- Cono grande in plastica;
- Densimetro di Baumé;
- Bacchetta di vetro;
- Bottiglia di vetro (contenitore della soluzione).

Tecnica

- Pesare 210 gr di NaCl;
- Pesare 220 gr di ZnCl₂;
- Inserirli nel cono di plastica;
- Aggiungere, poco alla volta, l'acqua, fino ad un volume di 800 ml;
- Agitare il tutto energicamente con la bacchetta di vetro fino a quando tutto il sale non sarà completamente sciolto;
- Passare la soluzione nel cilindro di vetro e inserire il densimetro per valutare la densità;

- Se e' necessaria una soluzione con un peso specifico maggiore, aggiungere $ZnCl_2$ e calcolare la densità;
- Quando la soluzione si è raffreddata, metterla nel flacone e applicare l'etichetta indicante la densità.

Soluzione di Lugol

La soluzione liquida di Lugol viene utilizzata per la colorazione di trofozoi e cisti di protozoi (*Giardia* spp., e *Trichomonas* spp.), larve (L1) di nematodi broncopolmonari (*Muellerius capillaris*, *Cystocaulus ocreatus*, *Protostrongylus rufescens*, *Neostrongylus linearis*, *Dyctiocaulus viviparus*, *Dyctiocaulus filaris* e *Aelurostrongylus abstrusus*), quello cardio-circolatorio (*Angiostrongylus vasorum*) e gastrointestinale (*Trichostrongylidae*) viene sfruttato anche per identificare i granuli di amido.

Componenti

- Iodio metallico
- Ioduro di potassio
- Acqua distillata
- Beuta

Esistono molte varianti nella preparazione della soluzione e ognuna ha concentrazioni e utilizzi diversi.

Liquido di Gram o Lugol semplice

- Pesare 1 gr di iodio metallico e 2 gr di ioduro di potassio;
- Sciogliere in una beuta contenente 300 mL di acqua distillata.

Liquido di Lugol e Nicolle

- Pesare 1 gr di iodio metallico e 2 gr di ioduro di potassio;
- Sciogliere in un pallone contenente 200 ml di acqua distillata.

Soluzione Lugol Doppio

- Pesare 1 gr di iodio metallico e 2 gr di ioduro di potassio;
- Sciogliere in un pallone contenente 100 ml di acqua distillata.

N.B Normalmente si utilizzano soluzioni concentrate per la rilevazione dei protozoi (5 gr di iodio metallico, 10 gr di ioduro di potassio; 100 ml di acqua distillata).

Si consiglia di diluire la soluzione in funzione per evitare un'eccessiva colorazione dei preparati.

Le soluzioni devono essere conservate in flaconi scuri con tappo di vetro e rinnovate ogni due o tre settimane.



RICERCA DI ACARI RESPONSABILI DI ROGNA

Nome della SOP:	CM_LDV_18.01	Pagine 6
Version No.:	01	Data di attuazione: 01/01/2023
		Data di revisione: 01/01/2026
Università degli Studi di Bari. Sezione di Clinica Medica (CM), Laboratori Diagnostica Veterinaria (LDV)		Note:
TITOLO	Ricerca di acari responsabili di rogna	

Autorizzazioni				
	Nome	Titoli	Data	Firma
Autore	Viviana Domenica Tarallo	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Andrea Zatelli	DVM, PhD	01/01/2023	
Revisore	Grazia Carelli	BSci, PhD	01/01/2023	
Revisore	Maria Alfonsa Cavalera	DVM, PhD	01/01/2023	

Aggiornamenti				
Versione No.	Revisioni	Autore	Riepilogo modifiche	Data
CM_LDV_18.01	originale			01/01/2023



1. SCOPO

Questa procedura operativa standard (SOP) descrive le modalità con cui effettuare correttamente le indagini di diagnostica dermatologica con l'obiettivo di garantire accuratezza diagnostica e sicurezza per gli operatori che lavorano presso Laboratorio di Diagnostica parassitologica della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

La ricerca degli acari responsabili di rogna si effettua analizzando, a seconda del sospetto diagnostico, forfora, pelo o croste, raschiato cutaneo o materiale ceruminoso prelevato dal condotto uditivo. La tecnica utilizzata varia con l'ectoparassita di cui si sospetta la presenza.

2. LABORATORIO DI ESECUZIONE

Le procedure operative descritte si applicano nel laboratorio di Diagnosi Parassitologica (Laboratorio 3) della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.

3. RESPONSABILITA'

Il Responsabile dell'attività didattica e della ricerca in laboratorio è responsabile della formazione e della vigilanza su tutti i lavoratori che operano all'interno dei Laboratori della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria. I singoli operatori, previa autorizzazione ad accedere in laboratorio, sono tenuti a rispettare la seguente procedura e sono responsabili del corretto utilizzo delle apparecchiature e del materiale diagnostico.

4. MISURE DI SICUREZZA

- Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di Laboratorio);
- I liquidi derivanti dall'esecuzione dei test vanno smaltiti nell'apposita tanica per rifiuti speciali a rischio biologico presente nel laboratorio di Diagnostica Parassitologica – Laboratorio 3, della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria.
- I campioni solidi processati, e i materiali di consumo usati durante l'esecuzione dei test vanno smaltiti nell'apposito contenitore per rifiuti speciali a rischio biologico presente laboratorio di Diagnostica Parassitologica – Laboratorio 3, della Sezione di Clinica Medica del Campus di Medicina Veterinaria;
- Prima di essere eliminati i campioni devono essere chiusi in contenitori a tenuta o in buste sigillate;
- Il bidone deve essere sempre chiuso con il suo coperchio ermetico.
- Gli attrezzi di laboratorio utilizzati durante la processazione del campione (vetrini da orologiaio, pinzette, piastre Petri in vetro) devono essere sanificati seguendo le procedure descritte nella presente SOP (Vedi punto 7)

5. REQUISITI DEL CAMPIONE

Per aumentare le possibilità di ritrovare i parassiti, è essenziale scegliere una zona cutanea "tipica", cioè favorevole, su cui eseguire il campionamento. È bene prelevare il materiale fresco, meglio se dai margini della lesione. I prelievi di materiale diagnostico sono facilmente eseguibili nella maggior parte dei siti, tuttavia, il raschiato da aree sensibili quali testa o piedi, o la raccolta di materiale ceruminoso da soggetti con otite può richiedere sedazione. È opportuno scegliere un punto che non sia stato alterato da escoriazioni od altri traumi e che non sia stato medicato. Sebbene non siano sempre diagnostici, la loro relativa facilità di esecuzione ed il basso costo li rendono test essenziale in dermatologia.

- Il campione deve essere idoneo (Vedi **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici);
- Al momento della ricezione il campione deve essere:
 - Accompagnato dal modulo di richiesta analisi (Allegato 1 - **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici);
 - Correttamente connotato con i dati del paziente e del proprietario;
 - Fresco;



- Correttamente raccolto;
- Idoneamente conservato.

6. APPARECCHIATURE E MATERIALI

- Microscopio ottico con obiettivi 4X, 10X, 40X e 100X ([Leica DM750](#)).
- Centrifuga [Thermo Scientific Medifuge](#);
- Lama di bisturi n. 10 monouso (le lame n. 15 risultano utili per sedi difficili come zampe ed orecchie);
- Pinzette anatomiche ed a “dente di topo”;
- Vetrini portaoggetto;
- Vetrini coprioggetto;
- Vetrino da orologiaio;
- Pipette Pasteur;
- Soluzione cheratolitica di KOH a concentrazione variabile dal 10 al 20%;
- Paraffina liquida;
- Nastro adesivo (consigliato Scotch® 3M);
- Kit di colorazione rapida Diff-Quik;
- Stereomicroscopio con obiettivi 0.6X, 1.0X, 2.5X e 4X;
- Tamponi a secco.

7. PROCEDURE

Raschiato cutaneo

Gli acari che possono essere identificati con questa tecnica sono *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*, *Demodex* spp. È necessario raccogliere scaglie di superficie, croste e cellule epidermiche raschiando la pelle non escoriata. Il raschiato cutaneo può essere costituito da croste cutanee ottenute mediante scarificazione a sangue, o peli e forfora, ottenuti mediante semplice passaggio con la lama del bisturi sul mantello dell'animale. Le lesioni preferibili comprendono cute con eritema, papule in rilievo e croste. È sempre preferibile effettuare il campionamento ai margini delle lesioni, dove la cute alterata incontra quella sana.

Tecniche:

7.1 Raschiato cutaneo con uso di paraffina

- Tagliare il pelo in prossimità della lesione;
- Applicare una goccia paraffina liquida sulla cute;
- Raschiare con lama di bisturi n. 10;
- Continuare a raschiare fino a provocare la fuoriuscita di sangue dai capillari;
N.B Evitare di raccogliere una qualità eccessiva di sangue poiché rende difficile l'osservazione dei parassiti.
- Porre il materiale raccolto in un vetrino da orologiaio;
- Aggiungere poche gocce di paraffina ed amalgamare il campione;
- Porre il preparato su un vetrino portaoggetto;
- Coprire il preparato con un vetrino coprioggetto;
- Procedere con l'osservazione microscopica.

Tutti gli acari sono visibili con obiettivo 10X per cui l'esame microscopico risulta molto rapido; Fare attenzione ad eventuali elementi mobili e nel caso di dubbio o sospetto esaminare a maggiore ingrandimento.

7.2 Esame delle croste con uso di sostanze cheratolitiche

- Raccogliere il materiale prelevato (compresa la lama del bisturi) in un vetrino da orologiaio;
- Aggiungere al materiale 5-6 ml di soluzione di KOH;
- Amalgamare il tutto;

- Lasciare agire la soluzione cheratolitica per 15 minuti in stufa alla temperatura di 37°C o 30 minuti a temperatura ambiente;
- Prelevare frammenti di materiale (che deve presentarsi pastoso o semifluido);
- Porre il preparato su un vetrino portaoggetto;
- Coprire il preparato con un vetrino coprioggetto;
- Procedere con l'osservazione microscopica.

Tutti gli acari sono visibili con obiettivo 10X per cui l'esame microscopico risulta molto rapido;

N.B. Le soluzioni di KOH al 10 o 20% sono letali per gli acari e la mancanza di movimento può risultare svantaggiosa per l'operatore. Soluzioni al 5% mantengono gli acari vitali ma possono essere necessari oltre 30 minuti affinché la soluzione agisca.

7.3 Esame delle croste mediante arricchimento:

- Porre alcuni frammenti di materiale in esame in una provetta da centrifuga da 10 ml. Aggiungere 5 ml di soluzione di KOH al 10%;
- Stemperare il materiale mediante una bacchetta di vetro;
- Lasciare agire per 60 minuti in stufa a 37°C, agitando di tanto in tanto per 3-4 volte;
- oppure
- Lasciare per 4 ore a temperatura ambiente;
- Porre la provetta viene posta in centrifuga per 10 minuti a 1000 giri;
- Eliminare il surnatante;
- Risospendere e il sedimento in 5 cc di una soluzione al 50% saccarosio;
- Centrifugare per 10 minuti;
- Lasciare il centrifugato a temperatura ambiente per almeno 10 minuti;
- Prelevare alcune gocce del surnatante con una pipetta;
- Allestire un vetrino portaoggetto con il campione coperto da portaoggetto;
- Osservare ad ingrandimento 10X.

7.4 Preparati su nastro adesivo (Scotch test)

Questa metodica estremamente semplice ed atraumatica consente di rilevare acari quali *Cheyletiella* ed *Otodectes cynotis* e le loro uova ma anche pidocchi ed escrementi di pulce. È anche possibile identificare la presenza di *Demodex* spp. se le lesioni vengono spremute prima di raccogliere il campione. I campioni ottenuti su nastro adesivo possono essere anche colorati (vedi oltre) e consentono l'osservazione di lieviti del genere *Malassezia*, batteri, cellule infiammatorie e cellule esfoliate da lesioni erose come i carcinomi squamocellulari.

Tecnica:

- Applicare un pezzo di nastro adesivo ripetutamente sulla cute fino a quando il materiale da raccogliere non sarà chiaramente evidente;
- Attaccare il nastro direttamente su un vetrino portaoggetti;
- Procedere all'osservazione microscopica;

Qual ora si voglia procedere con la colorazione del campione:

- Staccare delicatamente il nastro dal vetrino con l'ausilio di una pinzetta a punte piatte;
- Immergere il nastro in posizione verticale nelle vaschette dei coloranti secondo la procedura di colorazione (vedi **SOP CM_LDV_08.01** - Colorazioni);
- Stendere il nastro adesivo colorato sul vetrino portaoggetti;
- Asciugare la superficie del nastro con carta assorbente;
- Procedere all'osservazione microscopica.

7.5 Tampone auricolare

Questa metodica viene generalmente utilizzata per l'identificazione di acari del genere *Otodectes cynotis*, ma può essere utile anche per identificare Lieviti del genere *Malassezia*, batteri e cellule infiammatorie o

neoplastiche. I campioni devono essere raccolti prima di procedere con la pulizia dell'orecchio o prima di qualsiasi trattamento terapeutico.

Nella diagnosi di rogna otodettica il materiale ceruminoso, generalmente prelevato mediante un tampone auricolare, può essere esaminato direttamente, senza preventivo trattamento con sostanze cheratolitiche osservando il tampone direttamente allo stereomicroscopio.

Tecnica:

- Tenere il padiglione auricolare con la mano non dominante;
- Tiralo delicatamente verso l'alto per esporre e aprire il canale verticale;
- Inserire delicatamente il tampone fino a raggiungere la giunzione con la parte orizzontale del condotto uditivo esterno;
- Ruotare il tampone in senso orario o antiorario per raccogliere i detriti uditivi;
- Osservare il materiale raccolto sul tampone con lo stereomicroscopio;
- Valutare la presenza di acari adulti, stadi immaturi e uova;
- Allestire un vetrino per la valutazione citologica (vedi allegato 3 **SOP CM_LDV_04.01** - Ricezione e gestione dei campioni biologici).

8. CONTROLLO QUALITA'

- Il personale di laboratorio è tenuto a seguire le procedure descritte nella presente SOP;
- Il Responsabile di laboratorio vigila affinché tutte le procedure descritte vengano correttamente applicate.

9. MANUTENZIONE

Un membro specializzato del personale tecnico, nominato dal Responsabile di Laboratorio, verifica annualmente:

- Le date di revisione e manutenzione ordinaria di:
 - Microscopi;
 - Centrifuga;
- Le quantità residue delle soluzioni;

Quotidianamente:

- Il corretto spegnimento e pulizia delle lenti dei microscopi;
- Il corretto spegnimento di centrifughe;
- La corretta disinfezione delle centrifughe e dei supporti.

10. CAMPIONE DOPO IL TEST

- I campioni dopo essere stati processati, devono essere smaltiti, salvo diverse indicazioni del Responsabile di Laboratorio e/o di Sezione.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente infetti.
- È fatto obbligo dell'uso dei DPI durante tutte le attività di eliminazione dei campioni (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- I campioni valutati come non idonei devono essere smaltiti nel laboratorio di ricevimento (Laboratorio 3 – Diagnostica Parassitologica) e non essere portati in altri laboratori;
- Contenitori primari e secondari contaminati da campione fuoriuscito non devono essere aperti ma eliminati direttamente nel contenitore dei rifiuti speciali solidi a rischio biologico secondo precisa procedura (Vedi **SOP CM_LDV_01.01** – Sicurezza di laboratorio);
- Le lame di bisturi utilizzate per i prelievi devono essere smaltite nel contenitore dei rifiuti speciali taglienti a rischio biologico;
- Documenti di trasporto contaminati dai campioni non devono essere rimossi dal contenitore secondario e smaltiti con lo stesso nel contenitore per rifiuti speciali a rischio biologico;



- DPI e materiale monouso entrato in contatto con il campione devono essere smaltiti nel contenitore dei rifiuti speciali a rischio biologico;
- Prima di essere eliminati i campioni devono essere chiusi in contenitori a tenuta o in buste sigillate;
- Il contenitore per lo smaltimento dei campioni biologici deve essere sempre chiuso con il suo coperchio ermetico.

11. REFERENZE

- Elizabeth Villiers & Jelena Ristic. Gli esami di laboratorio. Indicazioni, esecuzione, interpretazione. Cane e gatto. 2017. EDRA, 3^A EDIZIONE.
- CDC MMWR (2012) Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories VOL. 61;
- MANUALE DI BIOSICUREZZA nei laboratori, 3^A EDIZIONE AIREPSA 2005 (Pubblicato da OMS);
- World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed.