

Procedura Operativa Standard per: CITOFLUORIMETRO GALLIOS

POS N. 01 versione 01

Data: 04 Giugno 2018

NORME PER GLI UTENTI ACCREDITATI **PER UN CORRETTO UTILIZZO DEL** **CITOFLUORIMETRO** **GALLIOS**

Procedura a cura della Dott.ssa Maria Carollo e del Dr. Massimo Sanchez

NOTE INTRODUTTIVE.

Il computer (workstation) è sempre acceso e non deve mai essere spento.

Si raccomanda agli utenti di osservare le linee guida generali sull'attività lavorativa in ambienti a rischio biologico e chimico fornite dal Dipartimento di Prevenzione e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità.

1.1. PROCEDURA DI ACCENSIONE.

1.1.1 Ad un qualsiasi movimento del mouse appare sullo schermo la sequenza di Windows Log, ossia premere (CTR + ALT + CANC) (Figura 1).



Figura 1

1.1.2. Accedere al computer utilizzando le credenziali di posta elettronica ISS (nome.cognome@iss.it e password), seguite da "ENTER" in modo da aver accesso al proprio desktop e/o documenti (Figura 2).

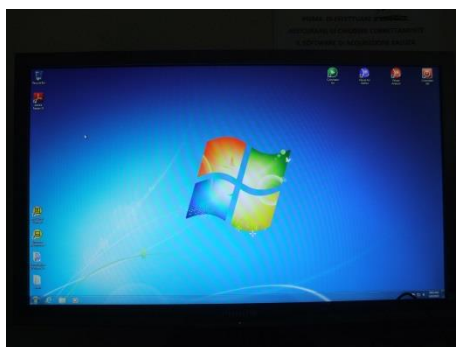


Figura 2

1.1.3. Controllare che il vano porta carosello, indicato in Figura 3, contenga esclusivamente il carosello vuoto e nessun altro oggetto al suo interno.



Figura 3

1.1.4. Il personale tecnico della *core facility* giornalmente (al mattino) accende, lava ed allinea lo strumento, lasciandolo acceso (Figura 4) e pronto per l'uso: i campioni possono essere immediatamente acquisiti come descritto nella procedura 1.2.



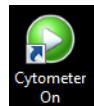
Figura 4

- 1.1.5. In assenza del personale tecnico della *core facility* lo strumento è spento, così come i laser ed il pannello elettronico (Figura 5).



Figura 5

- 1.1.6. Accendere il citofluorimetro cliccando sull'icona verde "Cytometer On" del proprio Desktop.



Il pannello elettronico passerà da spento (Figura 5) ad acceso (Figura 4).

- 1.1.7. Inserire nel carosello vuoto in posizione 1 un tubo contenente acqua distillata pulita per lavare la sonda e sciogliere gli eventuali sali depositati sulla stessa, utilizzando il protocollo di acquisizione "Water" ricevuto durante il corso di formazione.

Lo strumento sarà pronto per acquisire i campioni come da procedura 1.2.

Non è necessario che gli utenti effettuino l'allineamento, essendo questo un controllo di qualità delle performances dello strumento; il non effettuarlo non inficia il funzionamento dello strumento.

1.2. PROCEDURA DI ACQUISIZIONE.

- 1.2.1. Avviare il software di acquisizione cliccando sull'icona blu "Kaluzza for Gallios" del proprio Desktop.



- 1.2.2. Creare nella cartella Documenti oppure nel Desktop una sottocartella relativa all'esperienza in corso in cui salvare sia i files di acquisizione che il protocollo e/o la lista di lavoro (o "Worklist").

- 1.2.3. Creare un protocollo come da esigenze sperimentali e, in base alle istruzioni apprese durante il corso di formazione, salvarlo nella cartella di interesse, cliccando sull'icona sinistra indicata in Figura 6 della barra dell'Output.

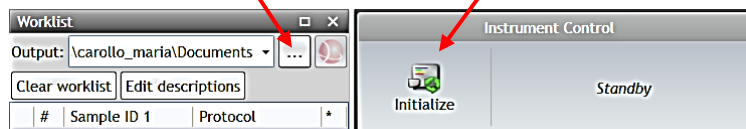


Figura 6

- 1.2.4. Dal pannello "Instrument Control" cliccare sul tasto "Initialize" (mostrato in Figura 6, nell'icona destra) per inizializzare lo strumento: si avvierà un contatore di inizializzazione (in verde) ed il messaggio "Initializing" (Figura 7).

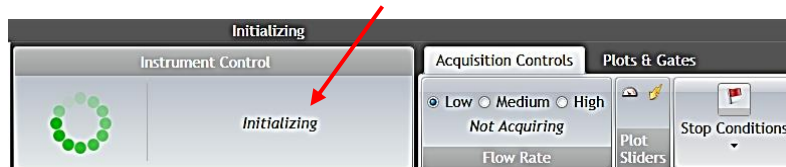


Figura 7

- 1.2.5. Nel pannello elettronico l'icona relativa allo "Status", inizialmente rossa (Figura 8a), diventerà verde (Figura 8b).

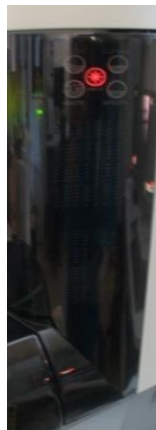


Figura 8a



Figura 8b

- 1.2.6. **Agitare sempre i campioni con il vortex prima di caricare i tubi nel carosello vuoto.**
 1.2.7. Prima di acquisire i campioni è consigliabile una rapida visualizzazione dei campioni senza salvare il file; cliccare su "Setup Mode" ed "Acquire" (o viceversa): il colore del browser di acquisizione cambierà da grigio (modalità di registrazione) (Figura 9) ad azzurro (modalità di settaggio) (Figura 10).



Figura 9

Figura 10

- 1.2.8. Se la visualizzazione delle popolazioni di interesse in fase di settaggio è corretta, registrare gli eventi e salvare il campione deselectando "Setup Mode": il colore del browser di acquisizione "Instrument Control" cambierà da azzurro (modalità di settaggio) (Figura 10) a grigio (modalità di registrazione) (Figura 9) ed i campioni verranno automaticamente salvati nel folder selezionato (procedura 1.2.3.). Salvare, secondo le proprie esigenze sperimentali protocollo, working list, compensazione, analisi.
 1.2.9. In condizioni di normale funzionamento il pannello elettronico risulta come in Figura 11. Le colonne luminose rappresentano i singoli fotomoltiplicatori attivati sul protocollo e mostrano la fluorescenza registrata. L'intensità delle luci delle singole colonne sarà proporzionale all'intensità di fluorescenza emessa dal campione nelle rispettive lunghezze d'onda.



Figura 11

- 1.2.10. Durante l'acquisizione **controllare sempre che il livello della tanica di scarto non superi mai i 2/3 della stessa**; se si supera il limite la tanica non potrà essere scaricata e si dovrà provvedere manualmente a vuotarne parte del contenuto (v. in dettaglio procedura 2.3).

1.2.11. Qualora si raggiunga il livello massimo della tanica di scarto, **completare l'acquisizione del campione, cliccare su "Stop" e, senza spegnere lo strumento, svitare il tappo della tanica in uso e sostituirla con una nuova vuota** (piccola o grande è indifferente) presente nella stessa stanza accanto al frigorifero.

1.2.12. Avvitare il tappo della nuova tanica e continuare l'acquisizione dei campioni non acquisiti cliccando "Acquire" (Figura 9).

1.3. PROCEDURA DI LAVAGGIO.

1.3.1. Al termine di ogni acquisizione effettuare sempre i lavaggi dello strumento utilizzando le worklist ricevute durante il corso di formazione, specifiche per il tipo di campioni acquisiti, ossia:

- Cleaning → per es. dopo acquisizione di linfociti, cellule dendritiche;
- Strong Cleaning → per es. dopo acquisizione di cellule di infiltrato tumorale, batteri;
- Cleaning post-Exo → per es. dopo acquisizione di esosomi e/o microparticelle.

1.3.2. Senza chiudere il programma di acquisizione, cliccare su "Clear worklist" (Figura 12) e poi "Open" (Figura 13).

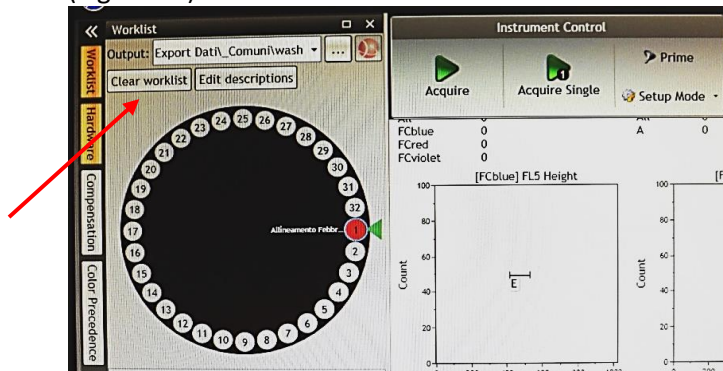


Figura 12

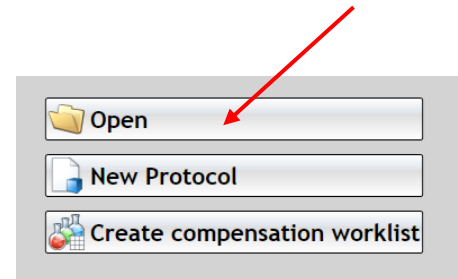


Figura 13

1.3.3. Aprire il protocollo di interesse (per es. "Cleaning.worklist) salvato sul proprio Desktop, o nella cartella "Documenti" o in una nuova cartella denominata (per esempio) *Wash* oppure *Clean*, per una facile e corretta identificazione.



Cleaning.worklist

1.3.4. Sostituire il carosello utilizzato per i tubi sperimentali con quello posto sul bancone di fianco al citofluorimetro Gallios (Figura 14), preparato dal personale tecnico della *core facility* e contenente la sequenza di tubi previsti dal protocollo di lavaggio base "Cleaning".

Qualora fosse necessario, aggiungere in posizione 1 un tubino di HCl 1% oppure in posizione 6 un tubino di PBS a seconda che si voglia effettuare rispettivamente lo "Strong Cleaning" oppure il "Cleaning post-exo", come dalle esigenze di lavaggio richieste dal protocollo sperimentale.



Figura 14

1.3.5. Togliere il coperchio di protezione dei tubini (indicato dalla freccia in Figura 15a), controllare che ci sia sufficiente liquido di lavaggio e/o acqua distillata ($\geq 0,5$ ml); qualora il volume fosse minore

riempire i tubini con 1 ml/liquido/tubo, utilizzando le soluzioni già pronte poste dietro il carosello dei lavaggi, rispettando la sequenza prevista dal protocollo, per esempio “Strong Cleaning”:

- Tubo 1 Ipoclorito 1% = 1 ml di *Ipoclorito 1%*
- Tubo 2 Bleach = 1 ml di *Coulter LH Series Cleaner* (Beckman Coulter #721542, 5 L)
- Tubo 3 H₂O = 1 ml H₂O_{3D}
- Tubo 4 H₂O = 1 ml H₂O_{3D}
- Tubo 5 H₂O = 1 ml H₂O_{3D}

1.3.6. Aprire il vano porta carosello ed inserire il carosello come mostrato in Figura 15b, ossia in modo che la freccetta antecedente la posizione 1 (cerchiata in rosso) sia ad ore 00.00.



Figura 15a



Figura 15b

1.3.7. Chiudere il coperchio del vano porta carosello del citofluorimetro Gallios ed avviare il lavaggio da “Acquire” (Figura 16) in modo da acquisire in sequenza tutti i tubi previsti dalla lista di lavoro del protocollo di lavaggio scelto.

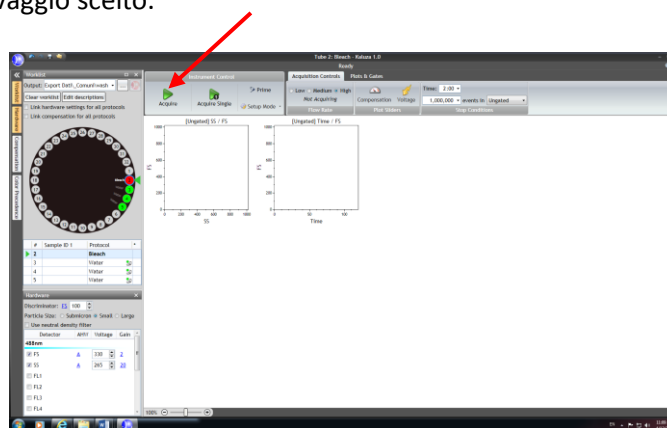


Figura 16

1.3.8. Effettuati i lavaggi dello strumento, **togliere sempre il carosello dei lavaggi e sostituirlo con quello vuoto.**

1.4. PROCEDURA DI CHIUSURA DEL PROGRAMMA (SWITCH USER) E/O SPEGNIMENTO (ULTIMO UTENTE DEL GIORNO).

Tutti gli utenti accreditati, prima di chiudere il programma ed effettuare lo “switch user”, devono sempre controllare il calendario di prenotazione online (consultabile all’indirizzo web <https://prenotazioni.iss.it/cito>, V. POS 06) e procedere come di seguito:

1.4.1. **Se non sono prenotati altri utenti eseguire lo SPEGNIMENTO del CITOFLUORIMETRO:**

1.4.1.1. Al termine del lavaggio, **senza chiudere il programma Kaluza e senza inserire alcun tubo nel carosello**, cliccare l’icona blu di avvio in alto a sinistra e selezionare “Cytometer” → “Clean” (Figura 17).

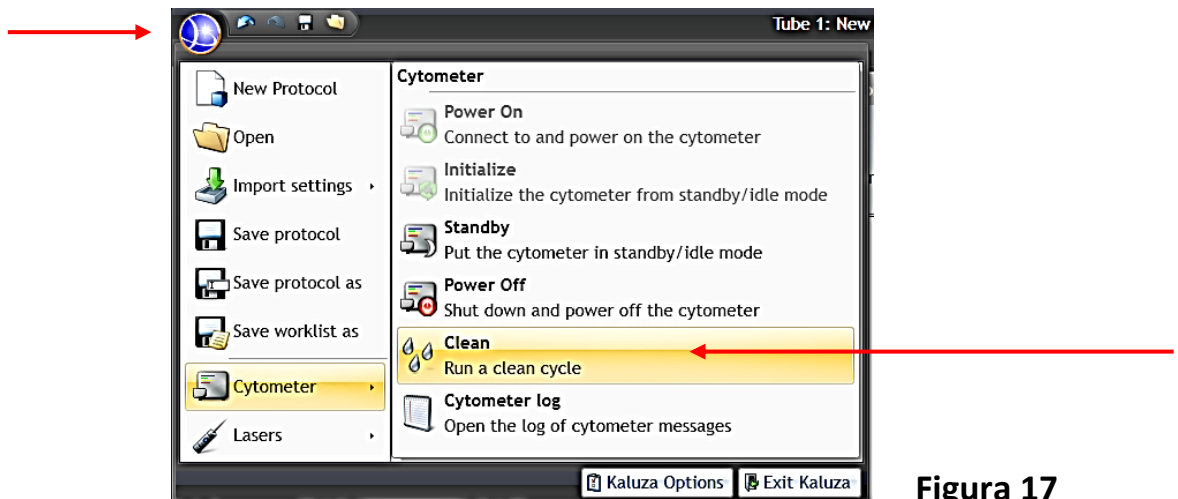


Figura 17

Dopo pochi minuti il lavaggio è completato. Il citometro non segnala il termine di questo lavaggio con alcun messaggio: si ritorna alla schermata in uso come mostrato nella sottostante Figura 18.

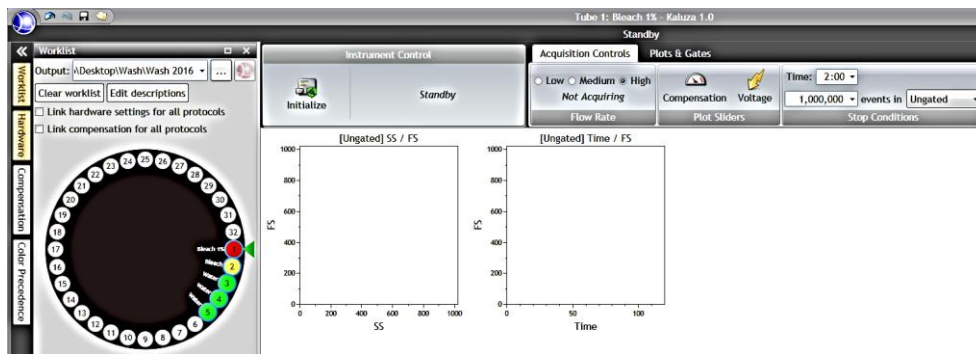


Figura 18

1.4.1.2. NON Inizializzare lo strumento ma cliccare con il tasto sinistro del mouse sull'icona blu in alto a sinistra della finestra di dialogo mostrata in Figura 19, selezionare "Exit Kaluza" in modo da chiudere il programma e consentire agli altri utenti di potere successivamente utilizzare il software di acquisizione.

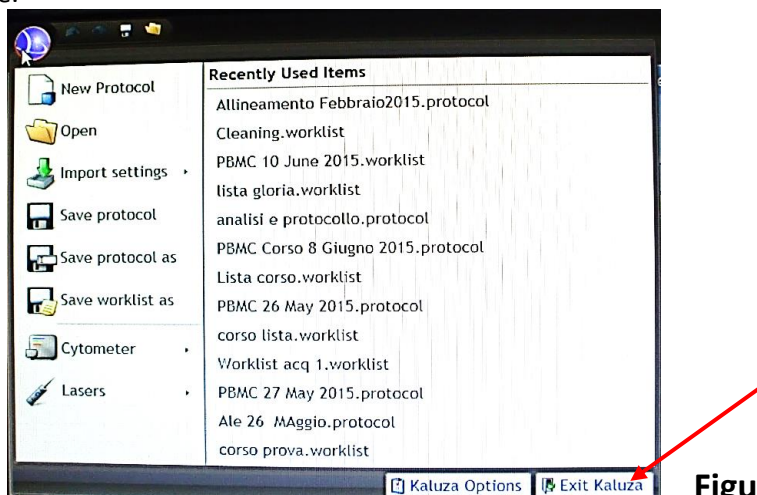


Figura 19

1.4.1.3. Prima di chiudere la vostra sessione di lavoro trasferire i dati sul server di rete utilizzando il folder "Shortcut", oppure una penna USB in modo da effettuare l'analisi in remoto alla propria postazione.

1.4.1.4. Spegnere i laser del citofluorimetro Gallios cliccando sull'icona rossa "Cytometer Off".



1.4.1.5. Si avvierà in automatico un ciclo di lavaggio dei tubi interni di fluidica, terminato il quale si avvertirà un suono di sfiato della valvola. Attendere che il pannello di controllo elettronico sia completamente spento (Figura 5), qualora non si spegnesse cliccare nuovamente sull'icona rossa "Cytometer Off", fino a totale spegnimento dello strumento.

1.4.1.6. Cliccare con il tasto destro sullo START del PC, posto in basso a Sinistra (Figura 20) e dalla finestra di "Shut Down" selezionare "Switch Users" (Figura 20).

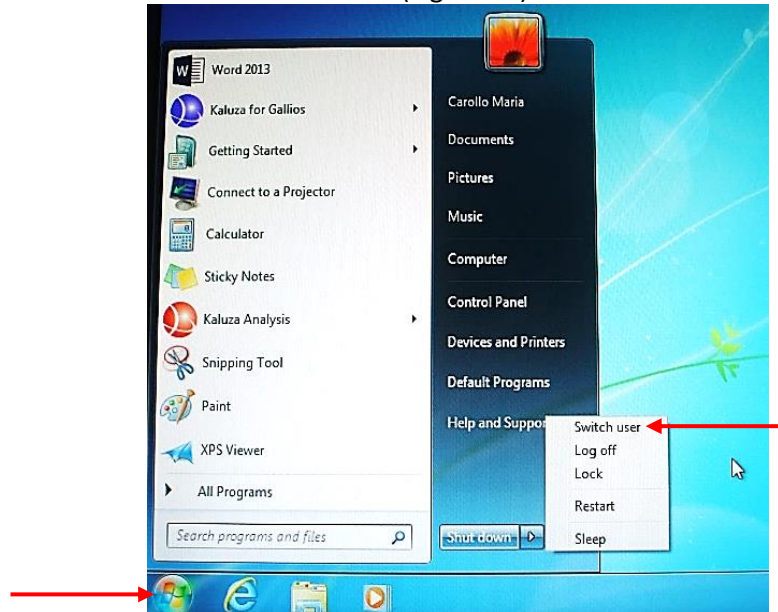


Figura 20

Non eseguire mai né il "Log off" né lo "Shut Down" del computer in modo che la connessione di rete sia sempre attiva.

Spegnendo il computer la connessione al server sarà interrotta e non si potrà accedere alla multi-licenza di attivazione del software Kaluza per l'analisi dei campioni in remoto.

Per accedere nuovamente al servizio si dovrà quindi attendere che il PC venga nuovamente acceso!

1.4.2. **Se sono prenotati altri utenti lasciare accesi i laser del citofluorimetro Gallios ed effettuare semplicemente lo "Switch Users" come da procedura 1.4.1.6.**

1.5. PROCEDURA DI REGISTRAZIONE DELLE ACQUISIZIONI.

Gli utenti devono sempre registrare ogni loro attività sul Registro di Attività degli Utenti (Allegato 1, POS 01 – Registro di attività degli Utenti), completandolo in ogni sua parte, come mostrato di seguito:

- 1.5.1. Data di acquisizione nel formato giorno/mese/anno (colonna 1).
- 1.5.2. Orario di inizio e fine acquisizione (colonna 2 e 3, rispettivamente).
- 1.5.3. Nome e cognome dell'utente che ha acquisito (colonna 4).
- 1.5.4. Sigla relativa al Dipartimento/Centro di appartenenza (colonna 5).
- 1.5.5. Se sono stati effettuati i lavaggi (colonna 6); in particolare specificare con un simbolo se si è effettuato lo "Strong Cleaning" (●) oppure il "Cleaning post-exo" (*), aggiungendo i simboli corrispondenti.
- 1.5.6. In numero di campioni acquisiti, esclusi i lavaggi (colonna 7).
- 1.5.7. Note (colonna 8) da compilare esclusivamente qualora si siano svolte attività straordinarie in assenza del personale, come l'aggiunta di fluidi e/o la sostituzione delle taniche (v. POS 02) o si siano avuti problemi durante l'acquisizione (v. POS 03), descrivendo cosa si è fatto e/o i problemi avuti e se si è contattata l'assistenza tecnica.

Ogni foglio del registro di attività dovrà seguire una numerazione progressiva e non dovranno essere asportati fogli. Non lasciare il registro incompleto, come mostrato nella riga 3 dell'Allegato 1, né cancellare e/o apportare mai correzioni, anche con un semplice taglio, come evidenziato in giallo nell'ultima riga dell'esempio dell'Allegato 1.

