

Organizzazione, controllo di qualità e flussi di lavoro in medicina molecolare

L.Collini





Cosa è la medicina molecolare

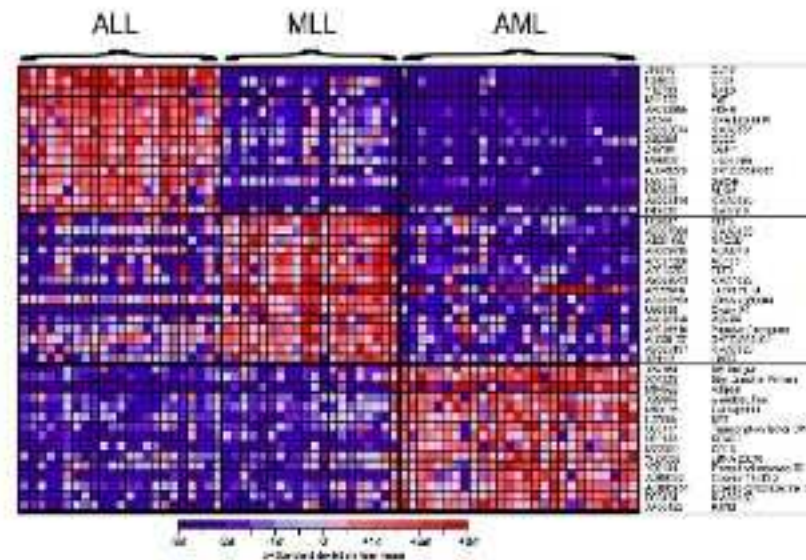
La medicina molecolare
è un nuovo modo di visualizzare la Medicina

E' ampiamente dimostrato che la conoscenza dei geni che causano e modulano la manifestazione di malattie, sia congenite sia acquisite, porta ad innovazione nella diagnosi e alla ottimizzazione nella terapia



medicina molecolare: diagnosi piu' precoci e piu' precise

- Analisi genomiche
- Bio-marcatori
Diagnosi, Risposta alla
terapia
- Test Genetici
Identificazione del rischio
genetico di malattia



medicina molecolare: personalizzazione del trattamento



Classificazione Genomica di ogni malattia (Farmacogenetica)



scelta del farmaco molecolare idoneo per quel tipo di malattia

Valutazione della suscettibilita' individuale ai farmaci
(Farmacogenomica)



scelta del farmaco/dosaggio piu' idoneo per quella persona



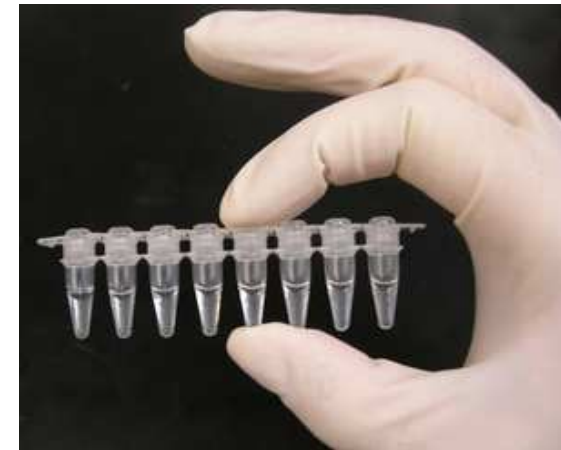
Organizzazione

Linee guida: gestione tecnica operativa

Un corretto utilizzo della tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (PCR) richiede l'uso di specifici accorgimenti

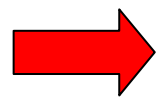


per minimizzare il rischio di contaminazione

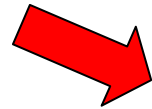


per aumentare la sensibilità del saggio che potrebbe essere inficiata dalla degradazione dell'acido nucleico

La possibilità di introdurre la tecnologia PCR in un laboratorio è condizionata dalle pre-esistenti attività



necessità di una riorganizzazione del lavoro e di conciliare



le particolari esigenze delle tecniche di biologia molecolare



Il bisogno di non stravolgere totalmente le rimanenti attività

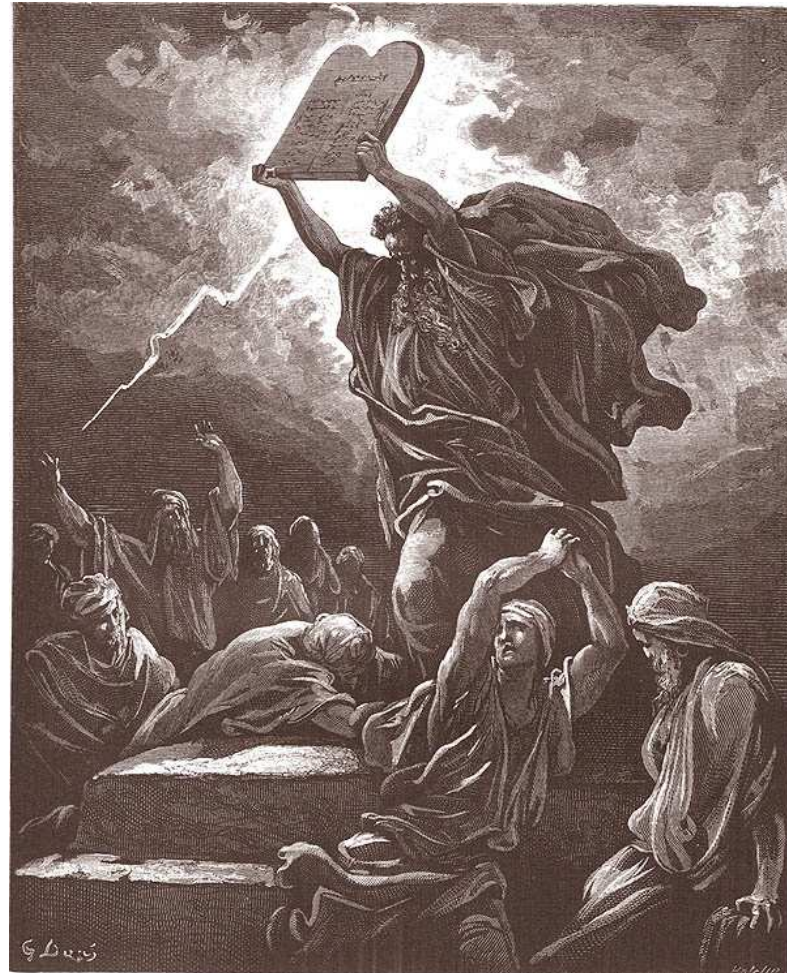


Si tratterà il più delle volte di mediare, di caso in caso, tra l'obiettivo del “*laboratorio ideale di PCR*” e le condizioni logistiche di ciascuna realtà.

Organizzazione

Linee comportamentali minime
per la esecuzione di indagini di biologia molecolare

**Esistono, tuttavia,
alcuni principi base
a cui nessun
laboratorio di
medicina
molecolare deve
derogare.**



“tavole della legge”



- Identificare, preparare e conservare correttamente i campioni.

A tale scopo ogni laboratorio deve dotarsi di un protocollo scritto che contenga le norme di preparazione ed estrazione del campione biologico da esaminare ai fini della massima standardizzazione e, quindi, di una più precisa riproducibilità dei risultati.

Analogamente appare indispensabile una corretta identificazione e conservazione dei campioni, aliquotati negli appositi tubi di raccolta sterili, in frigo e/o congelatori, che faccia anch'essa riferimento a procedure scritte.

-Consentire un corretto e agevole spostamento dell'operatore nelle aree di lavoro.

-Cambiare frequentemente i guanti in lattice.

A tal proposito va detto che è *consigliabile* cambiare i guanti in lattice per lo meno ogni volta che si accede all'area pulita. Questo semplice accorgimento consente di ridurre le possibilità di trasferimento di DNA amplificabile dalle aree contaminate e dai campioni aumentando la specificità del test.

-Suddividere i reagenti in piccole aliquote. Scongellare e ricongellare ripetutamente nucleotidi, enzimi e *primers* porta, inevitabilmente, o al loro deterioramento o allo smaltimento con perdita di materiale.

È, pertanto, intuitivo il vantaggio di aliquotare i reagenti in maniera adeguata.

-Aprire ed etichettare con attenzione i tubi di reazione sterili DNAsi e RNAsi free. È consigliabile, a tal riguardo, mettere in opera un efficace sistema di controllo scorte sia dei materiali d'uso che dei reagenti al fine di evitare interruzioni dell'attività o "soluzioni d'emergenza" con utilizzazione di reagenti o materiali non destinati alla PCR e di cui non è garantita la conservazione e/o l'utilizzazione in condizioni PCR.

-Preparare in maniera completa il mix di reazione (“premix”) prima dell’aggiunta del DNA o cDNA.

-Chiudere sempre il tubo di reazione, dopo l’aggiunta del campione prima di passare al campione successivo.
Esistono in commercio tubi di reazione con tappo a vite o con tappo a pressione attaccato ad un lato della parete per facilitare questa manovra.

-Usare pipette ad erogazione positiva dedicata nelle due aree di manovra e per ognuna disponi di idonei portapipette.

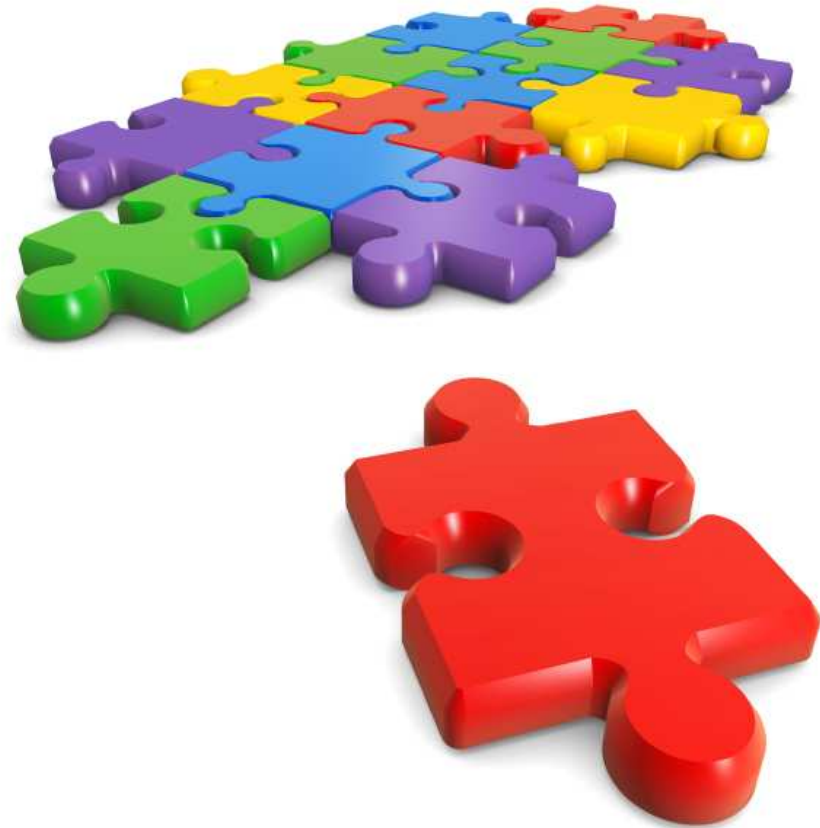
-Usare puntali con filtro posti su supporti portapuntali.

-Pulire le superfici di lavoro con prodotti specifici (ipoclorito di sodio 10% e alcool etilico al 70%).

E' opportuno organizzare uno specifico programma per la pulizia del laboratorio (ad eccezione di quella dei banconi e degli strumenti che è di pertinenza dell'operatore) al fine di evitare che questa possa divenire fonte ed occasione di contaminazione degli amplificati.

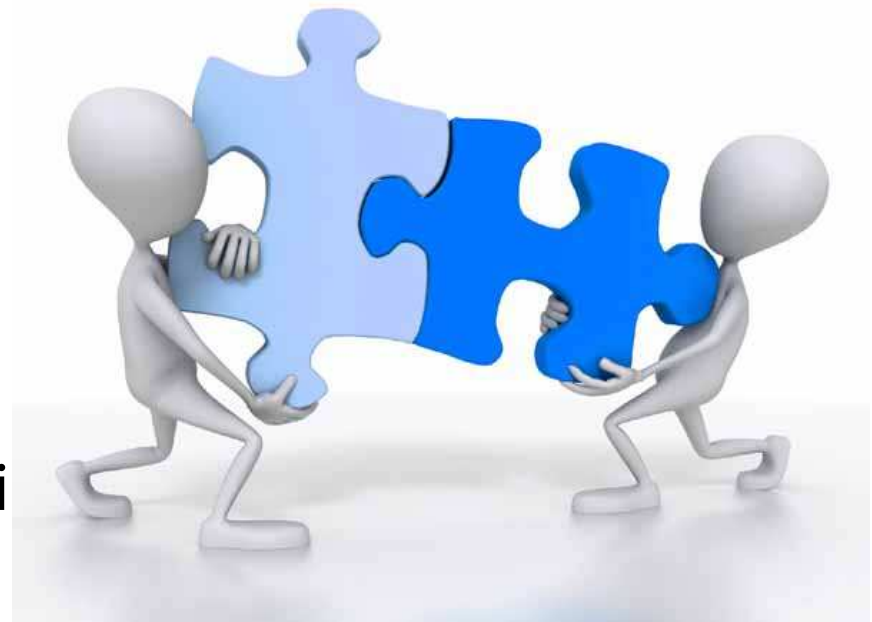
Organizzazione di un modello base: proposta di linee guida

La organizzazione di un modello base di Laboratorio di Biologia Molecolare può essere paragonato alla costruzione di un puzzle, nel quale ogni figura è composta da più elementi che rappresentano le fasi elementari di una reazione PCR.



Ogni singolo passaggio dovrà quindi incastrarsi con il successivo in maniera sequenziale, fino a completare ciascuna fase costituente la procedura di PCR.

In ciascuna operazione sono previsti prerequisiti fondamentali ai quale *bisogna* attenersi ed altri ai quali è sempre *consigliabile* attenersi. L'osservazione di questo procedimento, in ciascuna sua componente, consente di raggiungere gli obiettivi di specificità, sensibilità e riproducibilità necessari ai fini di una perfetta resa della reazione.



I principali fattori che influenzano una reazione di polimerizzazione a catena sono:

1) Specificità (falsi positivi)

- scelta dei *primers*
- condizioni della reazione
- contaminazioni

2) Sensibilità (falsi negativi)

- eterogeneità genomica
- presenza inibitori
- efficienza reazione

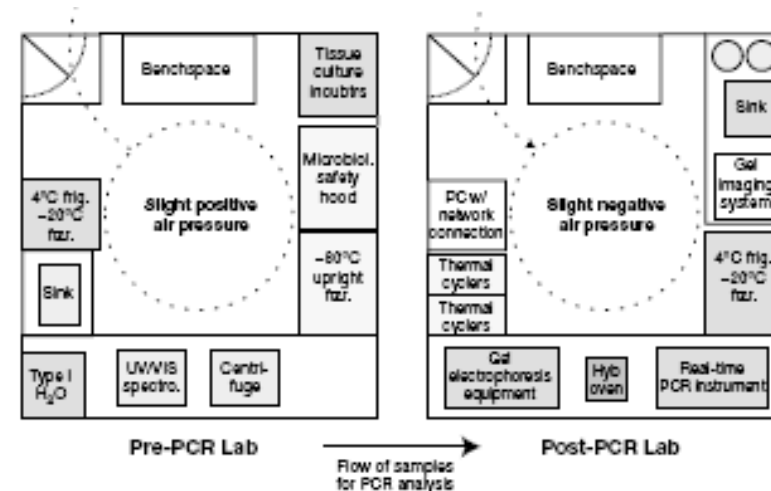
3) Riproducibilità (standardizzazione)

- protocollo PCR
- preparazione campione
- metodo di rivelazione

Un modello base di Laboratorio di Medicina Molecolare deve prevedere la disponibilità di **2 differenti zone**:

A) Zona “pulita” o area di pre-PCR nella quale si compiono le operazioni di:

- preparazione del campione
- estrazione degli acidi nucleici
- preparazione della reazione.



B) Zona “sporca” o area PCR e post-PCR nella quale sono portate a termine le operazioni di:

- amplificazione
- rivelazione
- gestione dati e archiviazione.

Preparazione campione (es.: da sangue intero)

- centrifugazione
- aliquotamento nei tubi sterili
- isolamento linfociti (o delle cellule nucleate)
- lisi cellulare.

Area A

Estrazione acidi nucleici

Possono, come abbiamo già visto, adoperarsi tecniche diverse:

- sistema di Boom con particelle solide di silice
- sistema di precipitazione con solventi organici
- sistema di colonne filtranti con membrana di silice
- sistema di cattura mediante biglie magnetiche.

Preparazione della reazione

- aliquotamento reagenti
- preparazione premix
- allestimento reazione PCR.

Amplificazione

Dopo la fase di amplificazione e prima di passare alla fase successiva, *si consiglia* una centrifugazione per evitare l'effetto aerosol che può osservarsi sui tappi dei tubi di amplificazione (5 sec) per effetto dei cicli termici.

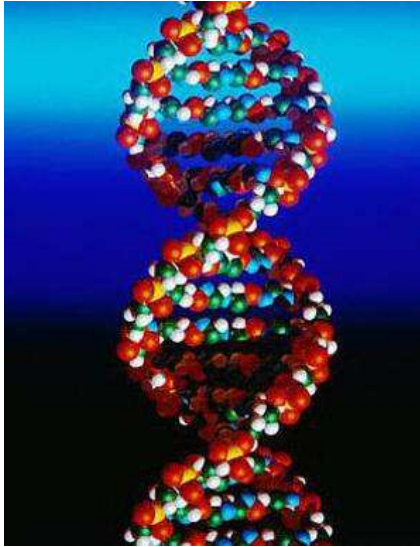
Rivelazione

Come abbiamo già accennato si possono adottare tecniche diverse di analisi degli amplificati, tra le quali:

- elettroforesi su gel di agarosio con etidio bromuro
- tecniche di ibridazione su micropiastre (ad es. DEIA)
- elettroforesi capillare
- sequenziamento.

Gestione dati e archiviazione

In questa fase è *consigliabile* prevedere anche le procedure per la gestione del magazzino scorte.



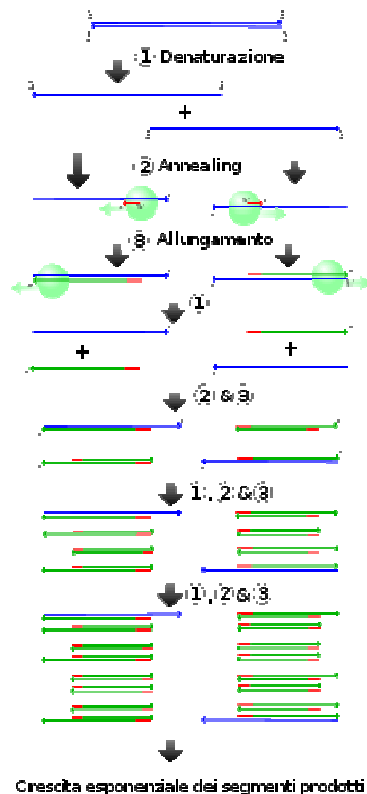
Errore pre-analitico

- **Errore introdotto:**
 - contaminazione crociata (falsi positivi)
 - frammentazione DNA per errata manipolazione
- **Errore non eliminato:**
 - inibitori della reazione di amplificazione

Inibitori della reazione di amplificazione

In quasi tutti i campioni biologici sono presenti sostanze che possono inibire la PCR

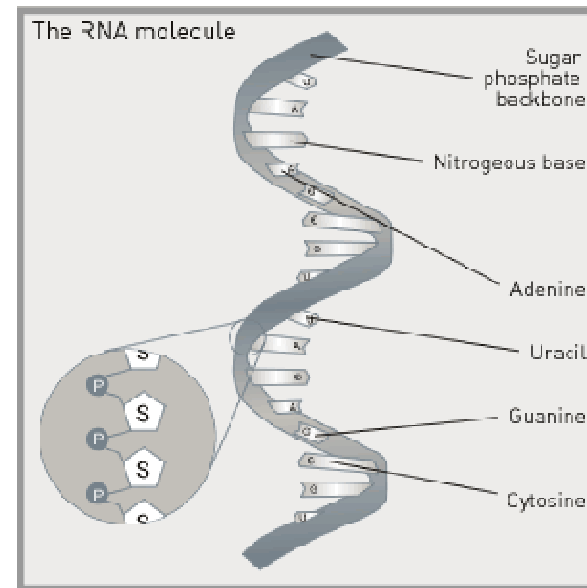
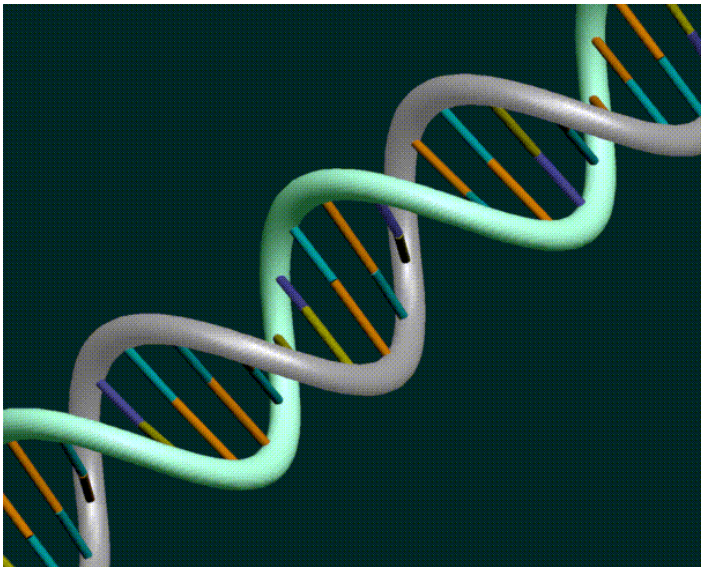
Devono essere eliminate nella fase di preparazione del campione.



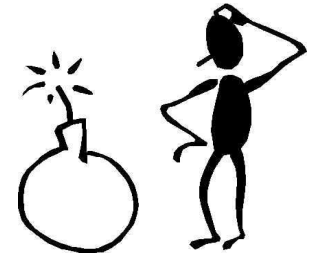
- Hb e suoi prodotti di degradazione
- Metalli pesanti (Fe^{++})
- Proteine
- Lactoferrina
- Complessi polisaccaridici
- Eparina

Fase pre-analitica

La rigorosa applicazione delle corrette modalità di prelievo, trasporto, trattamento (estrazione acidi nucleici) e conservazione (temperatura e tempo) del campione è condizione preliminare ed essenziale per garantire l'attendibilità dei risultati ottenuti con le tecniche di biologia molecolare.



Problemi



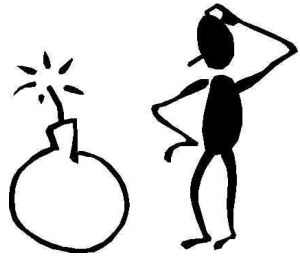
Rischio di generare **falsi positivi** per:

“carry-over”: contaminazione con prodotti delle amplificazioni precedenti: l'apertura di una provetta contenente l'amplificato può dar luogo ad un aerosol (*short spin*) che rende l'ambiente inutilizzabile per l'allestimento di una nuova reazione.

DNA esogeno: nel caso in cui vengano amplificate regioni del genoma umano anche l'operatore può essere fonte di contaminazione (cell. di desquamazione, capelli...).

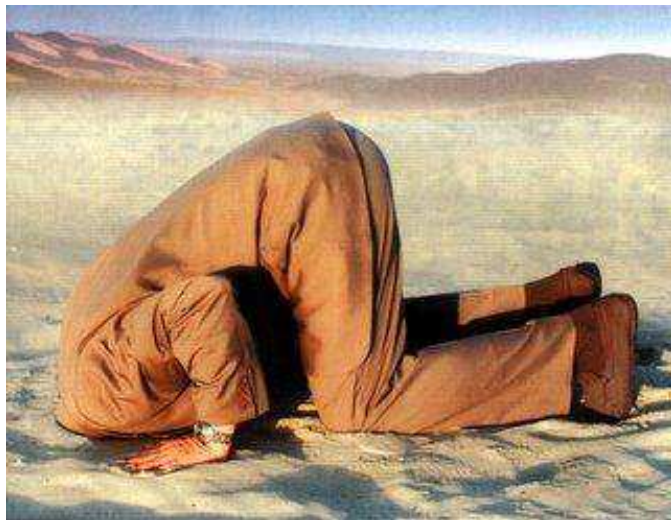
Cross-contaminazione: si verifica durante l'allestimento della reazione, un campione positivo ne contamina uno negativo generando quindi un falso positivo.

Misure precauzionali (mantenimento della sterilità dell'ambiente e dei reagenti) e analisi dei controlli negativi in parallelo ai campioni clinici e analisi dei campioni in doppio

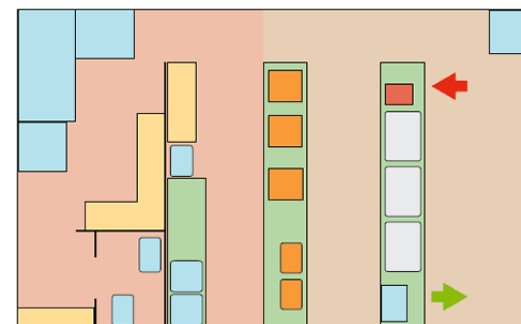


Problemi

Rischio di generare **falsi negativi** (elevata specificità) per inibitori della reazione di amplificazione. Molecole standard a concentrazione nota misurano la quantità di acido nucleico (rappresentano il riferimento) e controllano l'efficienza di amplificazione



Prevenzione della contaminazione - 1



- **Suddivisione fisica aree di lavoro**

1. Area di preparazione del campione
2. Area di preparazione della reazione della PCR
3. Area di amplificazione e analisi degli amplificati

- **Comportamenti operatore**

- muoversi secondo il flusso area1--->area2--->area3
 - mai entrare nell'area 1 o 2 con prodotti amplificati
 - lavorare con i guanti
- (che vanno cambiati quando si cambia area)



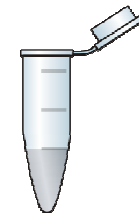
Prevenzione della contaminazione - 2

- **Organizzazione del lavoro**

- distribuzione materiale in funzione del tipo di lavoro (pipette, puntali, accessori differenti per ogni area)
- strumentazione dedicata per ogni area
- vetreria sterilizzata, materiale usa e getta
- puntali con filtro (contaminazione canale pipette con aerosol contenenti a. nucleici)
- soluzioni suddivise in piccole aliquote
- pulizia superfici lavoro e apparecchiature con soluzioni decontaminanti (ipoclorito 2%)



IPOCLORITO
DI SODIO LIQUIDO



Raccomandazioni finali

Ogni stanza o zona dedicata deve essere attrezzata con tutto ciò che necessita (strumenti e materiale) al completamento della procedura prevista in quella stanza o zona.

Per nessuna ragione strumentazione o materiale dedicato ad una stanza o area, va trasportato o utilizzato in un'altra.

Nei frigoriferi e nei congelatori è consigliabile una separazione fisica fra:

- kit reattivi, aliquote reagenti
- prodotti estratti
- prodotto della reazione di amplificazione



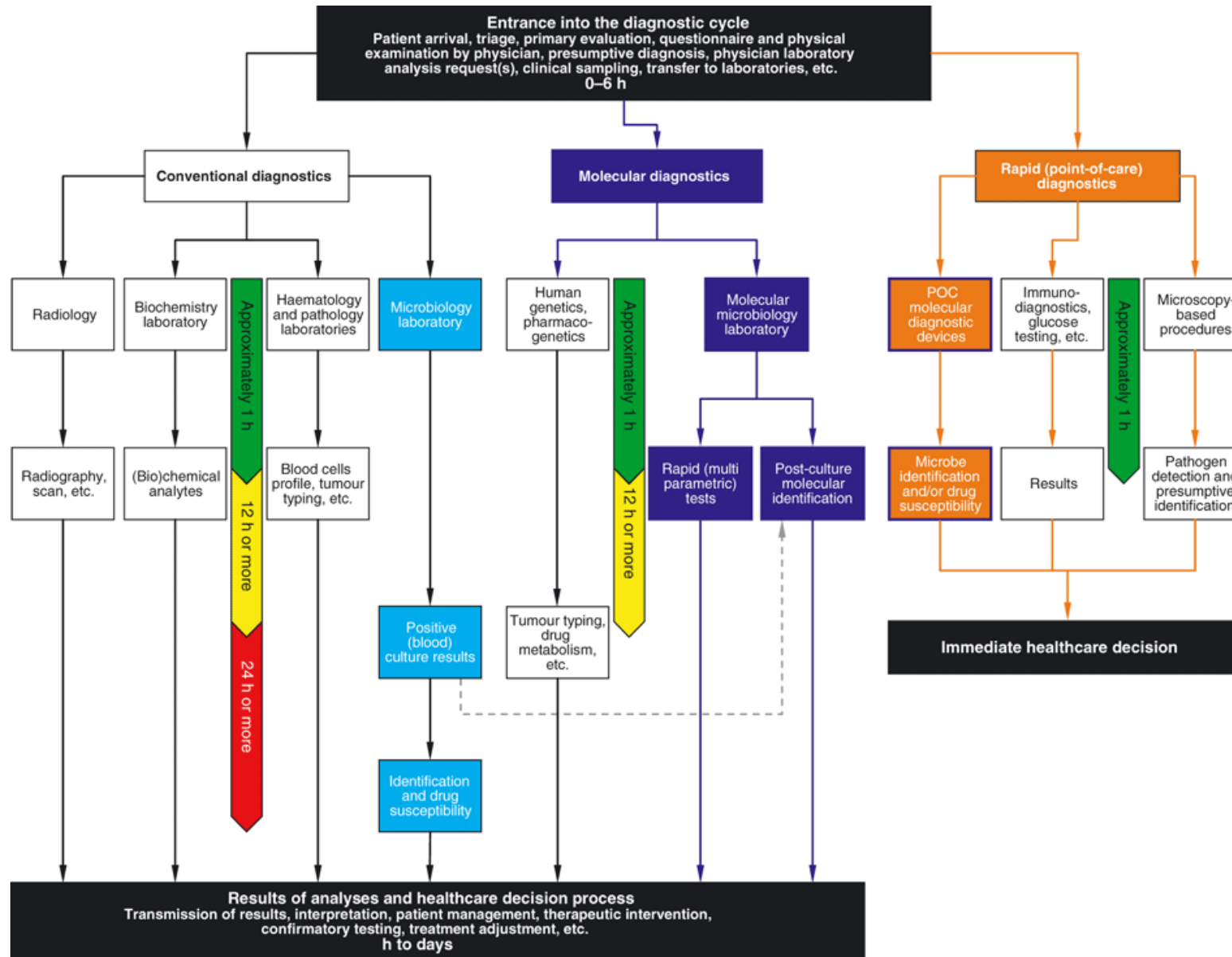
Norme di sicurezza

Le norme di sicurezza per il Laboratorio di Medicina Molecolare sono sovrapponibili a quelle previste per un qualsiasi laboratorio a rischio biologico e che utilizza sostanze chimiche. Come misure preventive sono indicate l'uso di protezione personale costituita da:

- guanti monouso
- occhiali di protezione (sempre ben puliti)
- camici
- adeguata ventilazione dei locali
- manutenzione attenta della apparecchiatura
- addestramento specifico
- adozione, aggiornamento e divulgazione del protocollo per la sicurezza.

Particolari requisiti e autorizzazioni a norma di legge sono indispensabili nel caso si utilizzino materiali radioattivi.

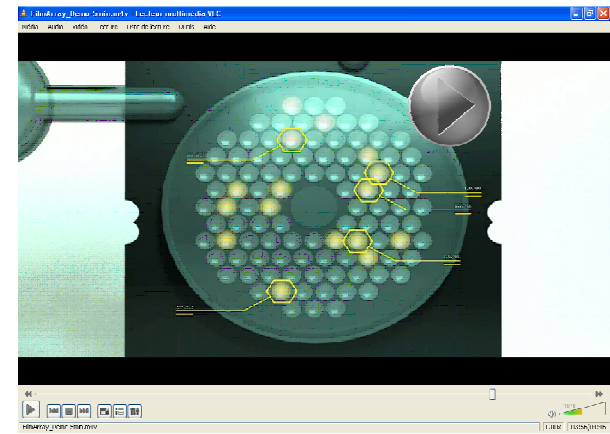
flusso di lavoro



Nuove frontiere

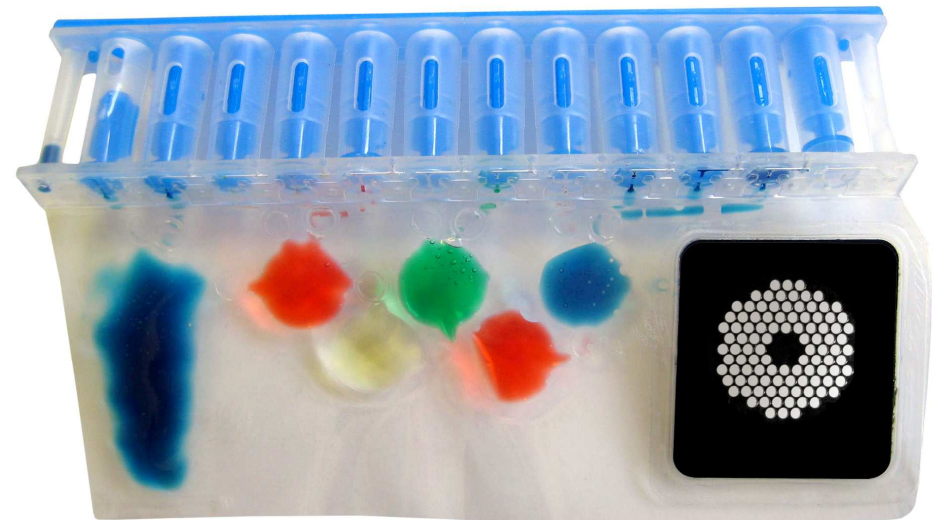


Film array



Two minutes are enough to set up your sample and to start the process, results are available within one hour.

The panel of detection proposed allows you to identify simultaneously up to 15 different respiratory virus. You can get a very quick diagnosis in order to set up an early and suitable treatment for the patient who has a severe respiratory disease.



The film array® of IDAHO technology inc.

Nuove frontiere

GeneXpert technology:

Real Time PCR

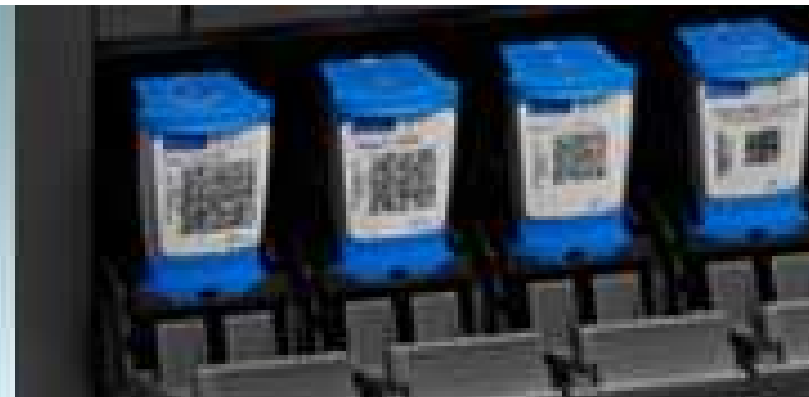
Random Access

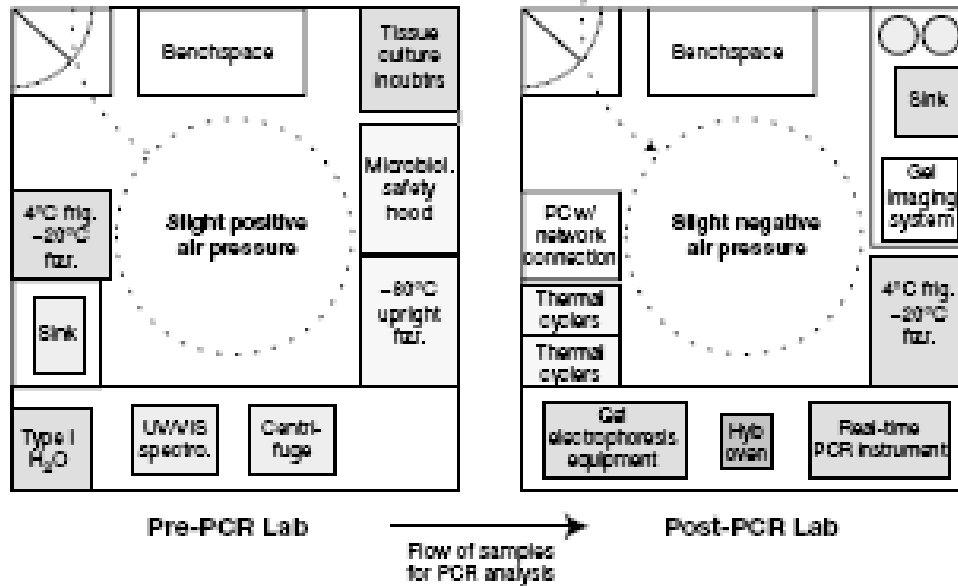
Full automation

Monouse cartridge

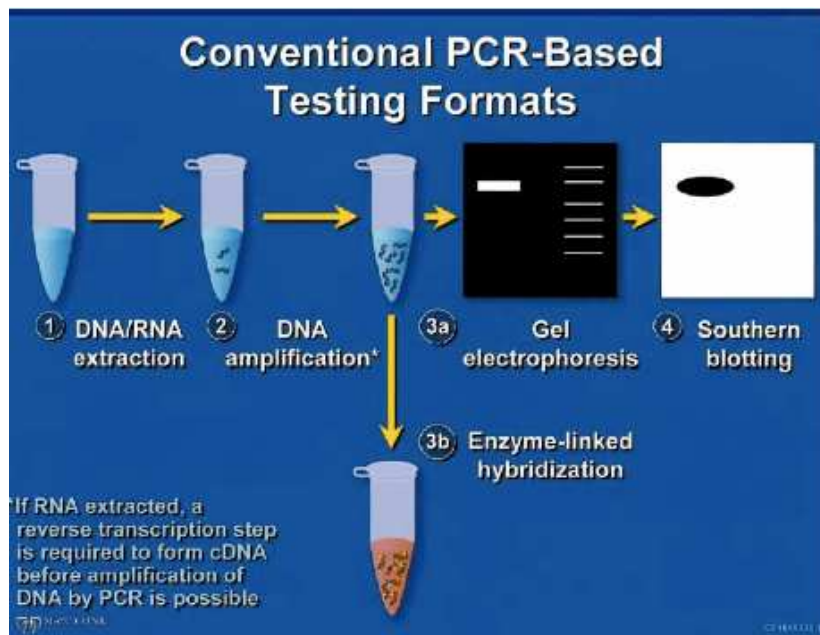
Integrated sample processing

Modular amplification system





Laboratory Tools and Techniques a lot !



Only one cartridge !

Quando si progetta un laboratorio di Biologia Molecolare bisogna rispettare criteri di sicurezza che tutelino l'OPERATORE e che garantiscano l' EFFICIENZA DEI RISULTATI

controllo di qualità

Controllo di Qualità Interno

Valutazione Esterna (VEQ)



Controllo di Qualità Interno

- **Procedure per la realizzazione della qualità**
 - Organizzazione del lab (aree pre- e post-amplificazione separate)
 - Controllo delle contaminazioni (guanti, materiali monouso)
 - Strumentazione (manutenzione periodica)
 - Reagenti (per biologia molecolare, piccole aliquote, data scadenza)
 - Metodiche (protocollo di lavoro scritto e dettagliato)
- **Strumenti per la verifica della qualità (controlli)**
 - Controlli positivi
 - Controlli negativi
 - Bianco di PCR
 - Controlli di estrazione (campione da paziente noto)
 - Controlli di amplificazione (a. nucleico già estratto)

Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)

Il programma VEQ “Verifica Esterna di Qualità in Medicina Molecolare” è articolato in due livelli:

LIVELLO 1 studiato per verificare l’efficienza qualitativa, a partire da una specifica matrice biologica, e valutare fenomeni di carry over nei processi di:

- Estrazione del DNA
- Amplificazione in PCR
- Elettroforesi su gel di agarosio

LIVELLO 2 rivolto ai laboratori di Medicina Molecolare che operano in aree specifiche, consente la verifica del metodo diagnostico utilizzato dal singolo laboratorio sia in termini di specificità, cioè la capacità di individuare correttamente l’acido nucleico bersaglio (Livello 2A) che di sensibilità, limite di rilevazione rispetto a diluizioni note di clonato (Livello 2B).

VEQ



Partecipare alla VEQ consente di:

- a) utilizzare campioni di controllo no biohazard, prodotti in un unico lotto;
- b) valutare l'efficienza del metodo di estrazione in uso a partire da una matrice biologica;
- c) valutare fenomeni di *carry over* durante le varie fasi del processo;
- d) valutare l'efficienza dei reagenti e della strumentazione utilizzata;
- e) valutare la specificità e sensibilità del singolo metodo diagnostico;
- f) ottenere uno “*score di performance*” del laboratorio rispetto a tutti i centri partecipanti al programma VEQ

VEQ

Tappe essenziali

- Ente organizzatore che predispone la VEQ
- Partecipanti (laboratori che aderiscono alla VEQ)
- Spedizione di materiali e programma ai partecipanti
- Analisi dei materiali da parte dei laboratori
- Invio dei risultati
- Elaborazione dei dati

Diagnostica virologica

Disponibili VEQ per alcuni patogeni di rilevanza clinica e larga diffusione e per i quali sono disponibili kit commerciali e parziale automazione, ad es. VIRUS NEUROTROPI.



Grazie per l'attenzione



IS SO COOL! ↓



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: Organizzazione,

STACK:

```
(2)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20120508095315+02'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20120508095315+02'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```