



Tecniche molecolari nella valutazione del donatore di organi e tessuti

19-21 gennaio 2011

Cantine Ferrari -Trento

Cogliati Elisa

Vian Elisa



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

che cos'è una Banca dei Tessuti...

***Una struttura sanitaria pubblica o
accreditata, senza attività di lucro,
individuata dalla regione di competenza
che ha il compito di conservare e
distribuire tessuti omologhi***



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

Dove siamo

**Sorta presso l'Ospedale di Treviso
nel 1985 è stata deliberata come
Banca Regionale nel 2000**





La Banche dei tessuti in Italia





Norme

Lo sviluppo delle banche ha portato alla necessità di normare attraverso linee guida nazionali ed europee gli aspetti organizzativi e procedurali volti alla sicurezza.

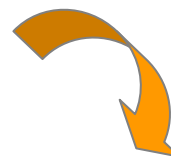
Coordinamenti
(legge 91/99)



Conferenza Stato-Regioni
“linee guida” 23/09/2004



“Linee guida” 19/06/2007



Decreto legislativo n. 16 “qualità
e sicurezza” 20/01/2010



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

Certificazioni ed accreditamenti

L'accREDITAMENTO e la certificazione contribuiscono ad accrescere la sicurezza del donatore, garantendo tramite le verifiche esterne di Enti indipendenti la trasparenza del lavoro svolto



**Il processo e il trattamento è stato certificato
UNI EN ISO 9001:2008 IQ-NET IT/25398**



La Banca lavora in conformità alle linee guida nazionali per i tessuti ed è stata accreditata dal Centro Nazionale Trapianti



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

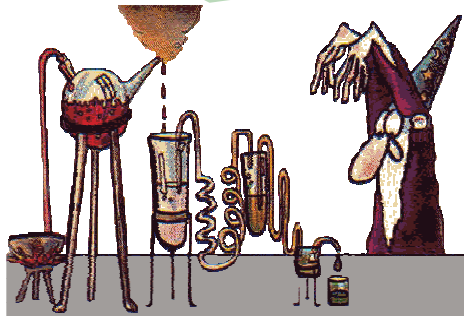
Banca dei Tessuti: MISSION



**Migliorare la qualità della vita nei pazienti
che necessitano di tessuti omologhi
attraverso il reperimento di tessuti per il
trapianto**

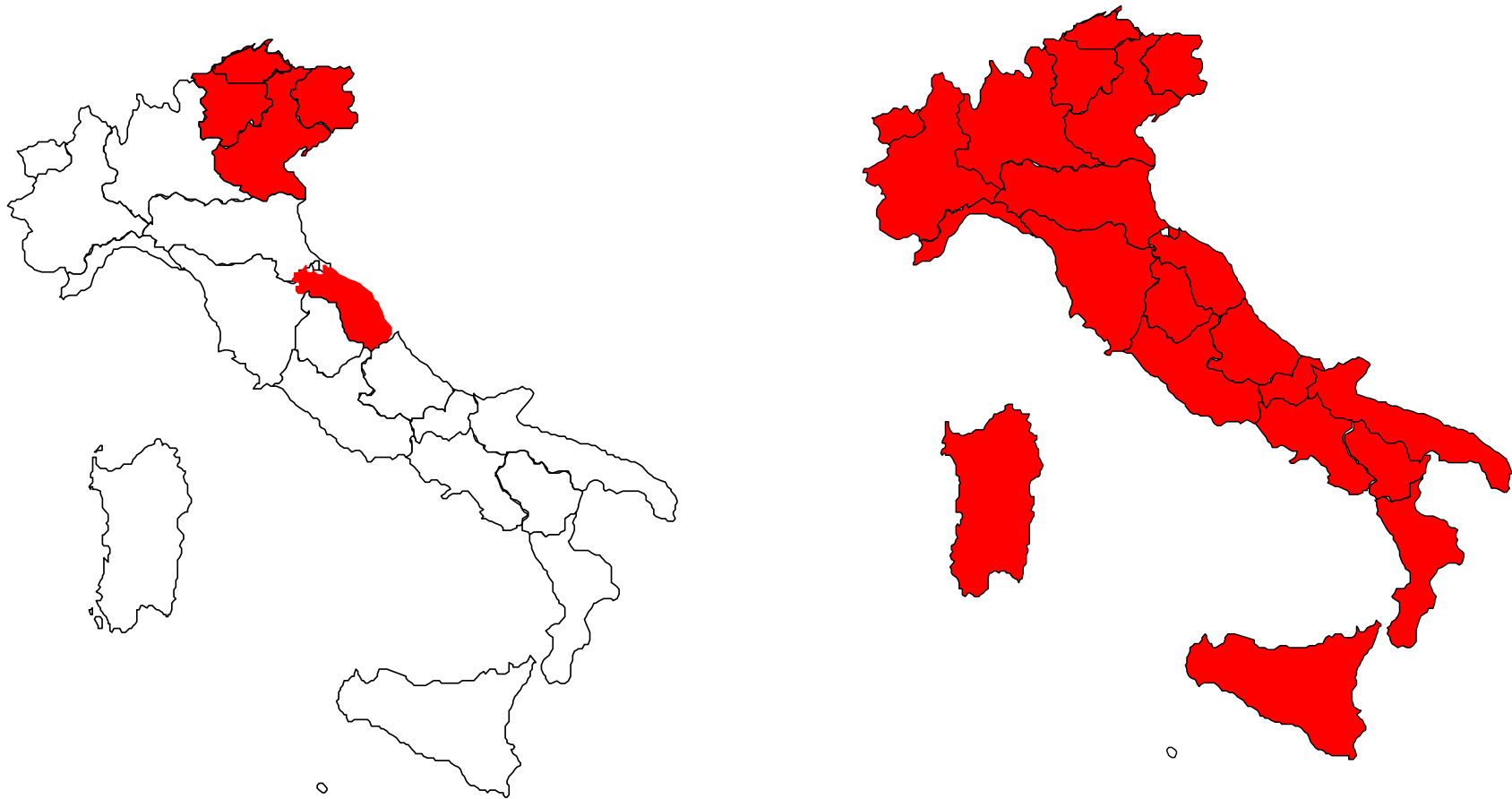


**Favorire e promuovere la donazione
come scelta consapevole fornendo
servizi e interventi a carattere educativo
e formativo**



**Promuovere iniziative di ricerca e
innovazione**

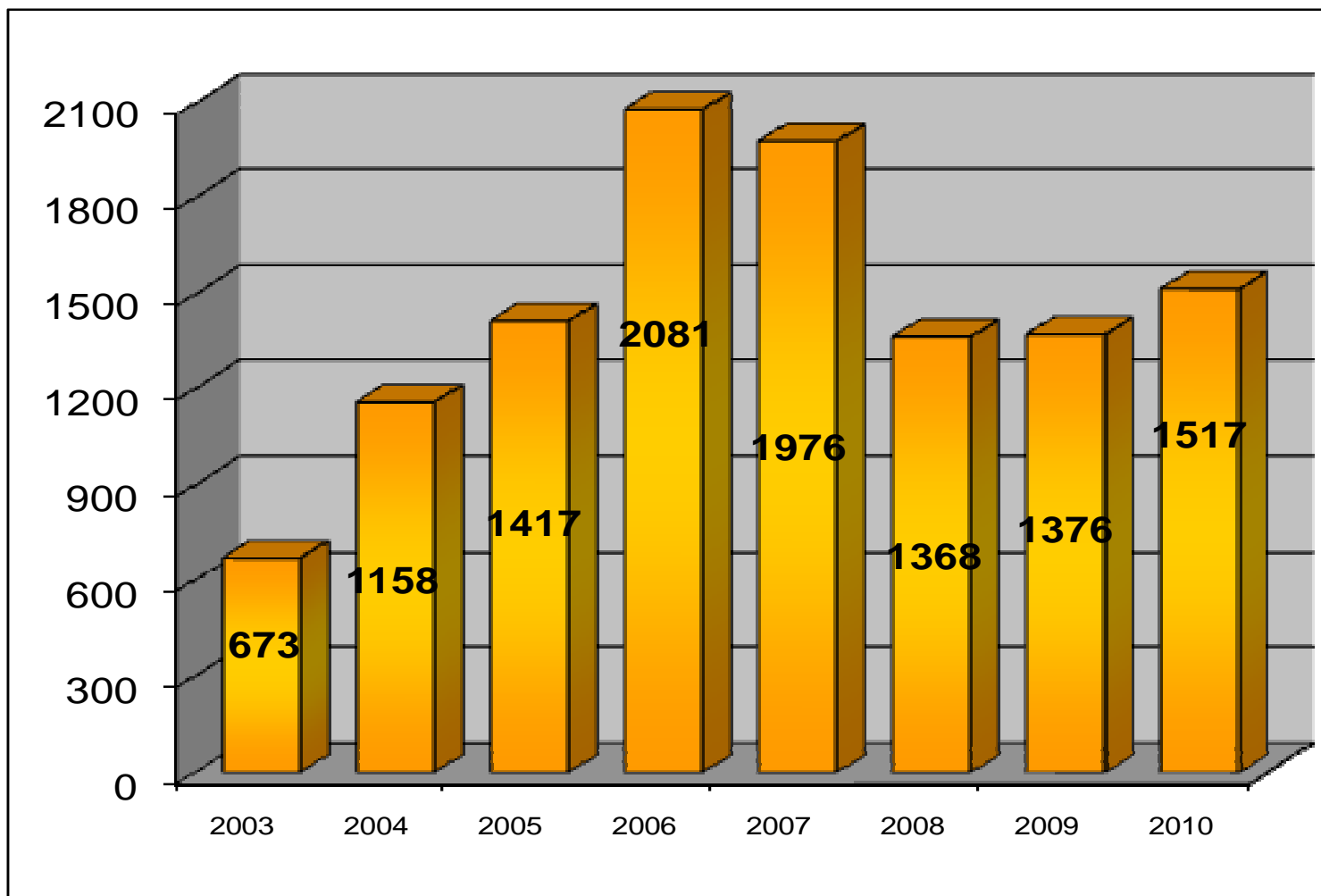
Zone di attività di raccolta e distribuzione





Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

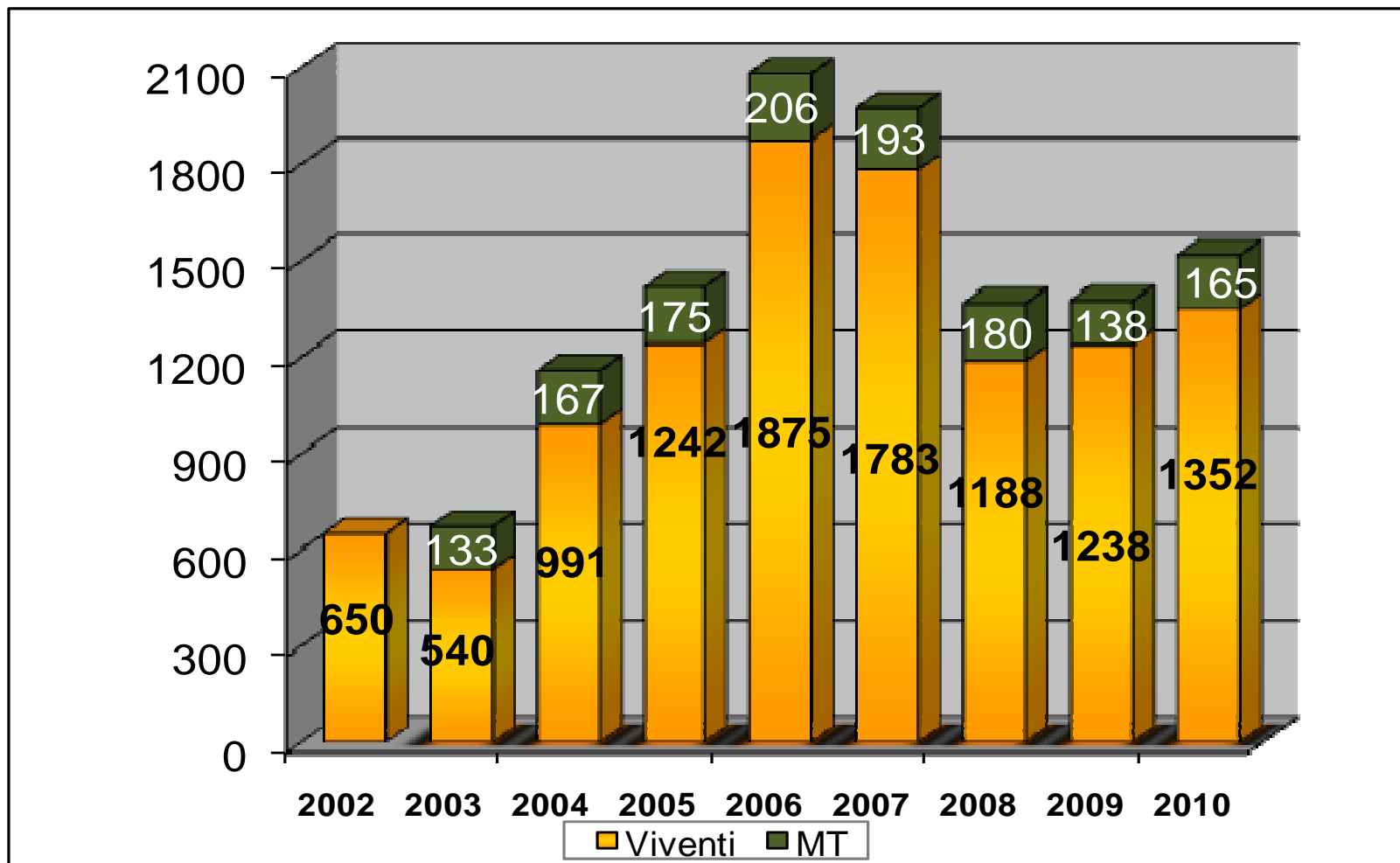
n. donatori





Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

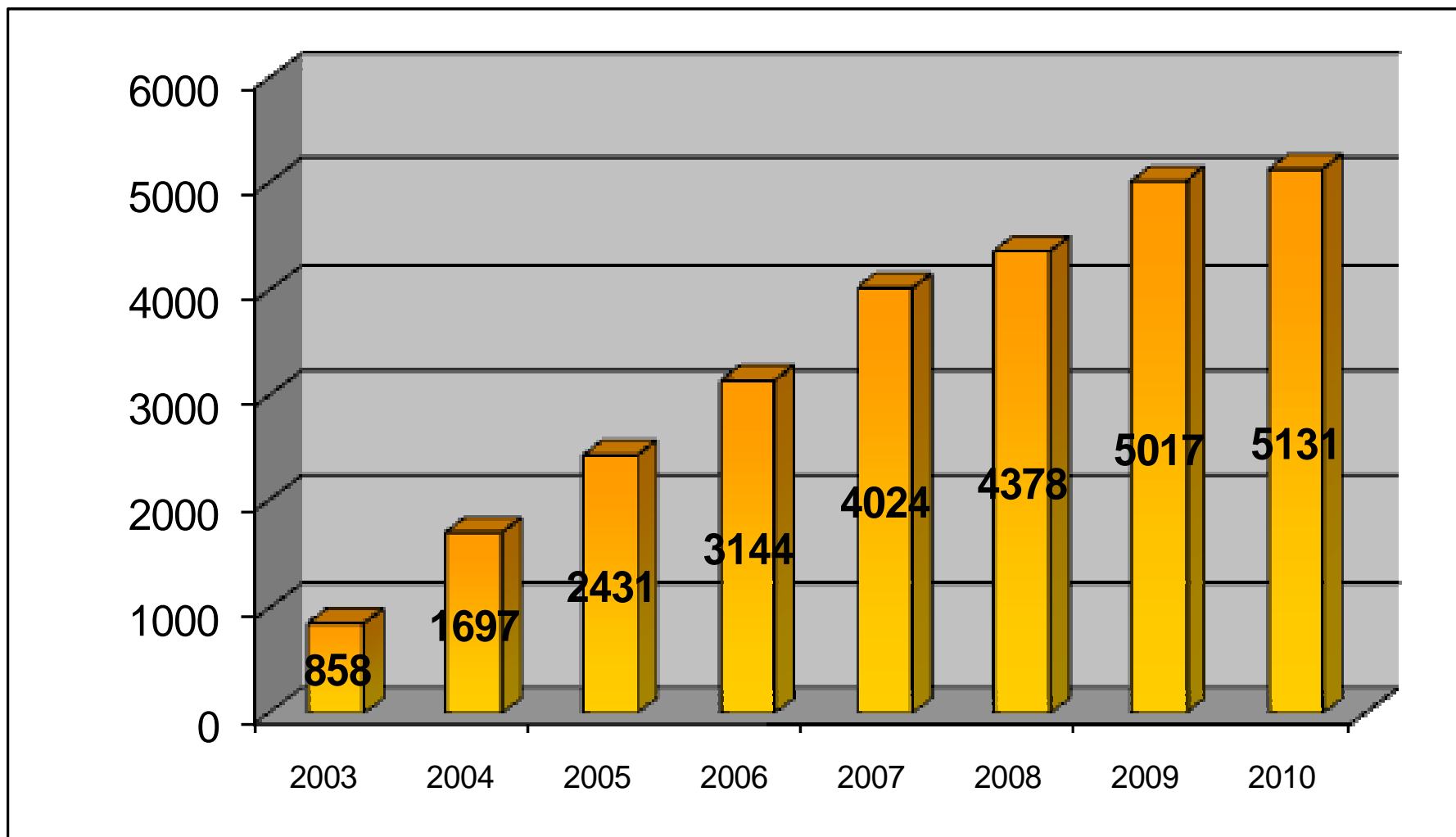
n. donatori





Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

n. tessuti distribuiti





Donatori di tessuti

Donatori Heart-beating (HB)

Donatori Non heart-beating (NHB)



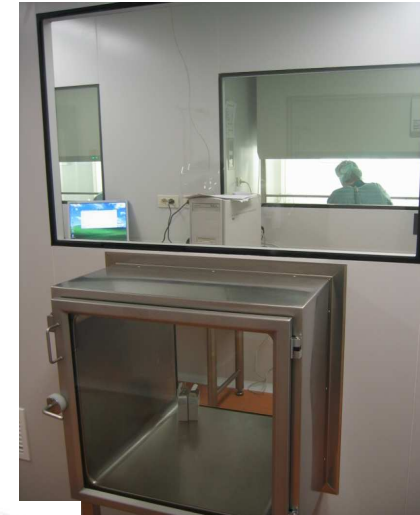
Donatori viventi





Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

Processiamo...



Microrganismi per deposizione mediante
campionamento passivo dell'aria mediante
piastre (ogni fase di lavorazione)



col-S Columbia 5% SB

Microrganismi per contatto mediante
campionamento su piani di lavoro mediante
piastre (ogni fase di lavorazione)



Piastre a contatto TSA+inattivante



Controllo del tessuto...

- valutazione morfologica attribuendo al tessuto un grading strutturale
- controllo microbiologico



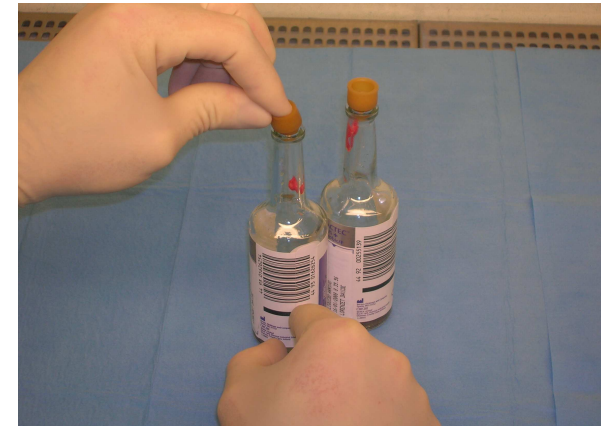
Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

Controllo microbiologico

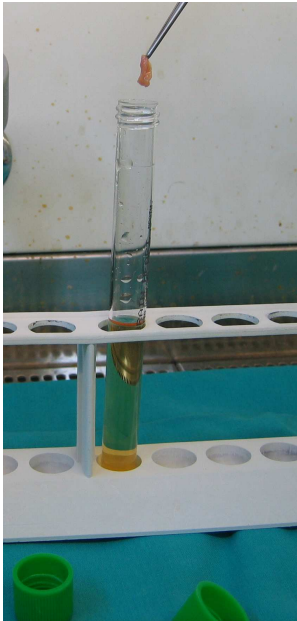
Il processo viene monitorato microbiologicamente mediante prelievi istologici e di liquidi in ogni fase del processo

Test per la ricerca di:

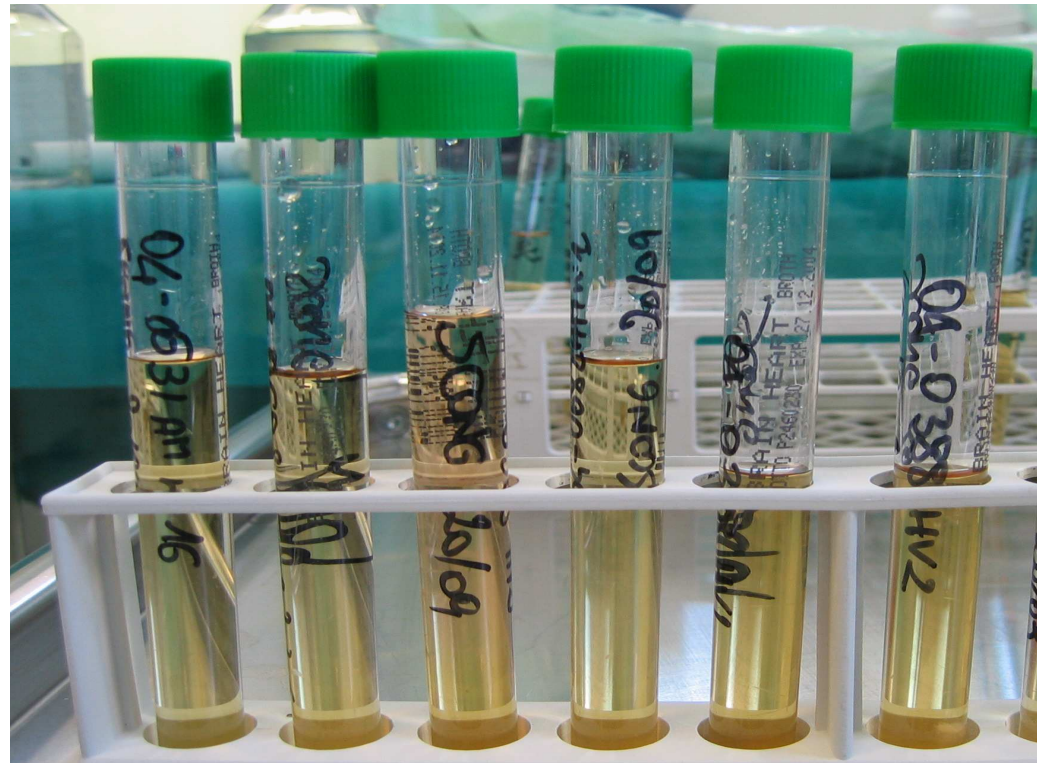
- Batteri aerobi
- Batteri anaerobi



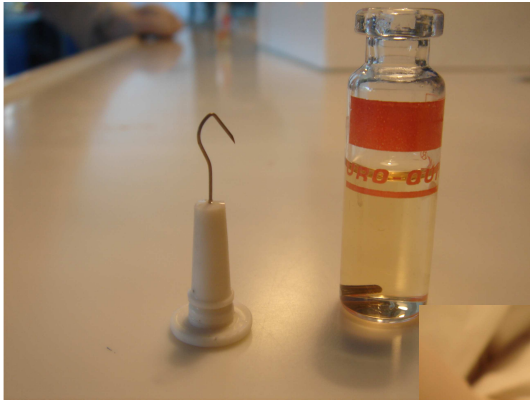

Banca dei Tessuti
della Regione Veneto



...il passato



...il futuro



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto

Selezione del donatore...

1. SIEROPOSITIVITA' PER HIV, HCV, HBV, HTLV, Lue
2. INFEZIONI O MALATTIE SISTEMICHE IN ATTO AL MOMENTO DELLA DONAZIONE
3. MALATTIE NEUROLOGICHE
4. MALATTIE GENETICHE
5. NEOPLASIE MALIGNI IN ATTO O PREGRESSE
6. MALATTIE AUTOIMMUNI E DEL COLLAGENE
7. INGESTIONE ED ESPOSIZIONE PROLUNGATA A SOSTANZE TOSSICHE E/O METALLI PESANTI
8. MALATTIE EMOPOIETICHE
9. MALATTIE E/O INFEZIONI RESPIRATORIE
10. TRATTAMENTI CON..(trasfusioni, chemioterapia, terapia radiante..)
11. COMPORTAMENTI SOCIALI A RISCHIO
12. VACCINAZIONI (negli ultimi 12 mesi)
13. ANAMNESI SOCIALE E/O PATOLOGICA
14. CAUSE DI MORTE
15. TEMPISTICA DI DONAZIONE



Banca tessuti esegue...

Ac anti HIV 1/2

Ac anti HCV

HBsAg

Ac anti HBc

Ac anti HBs

Ac anti HTLV I/II

Ac anti Ag TREPONEMICO

Ac anti CMV IgG

Ac anti CMV IgM

Ac anti TOXOPLASMA IgG

Ac anti TOXOPLASMA IgM

HIV-RNA

HBV-DNA

HCV-RNA



NAT

Esami richiesti in Biologia molecolare

HIV-RNA

HBV-DNA

HCV-RNA



COBAS Ampliscreen HCV Test, v. 2.0
COBAS Ampliscreen HIV-1 Test, v. 1.5
COBAS AmpliscreenHBV Test



E' un test qualitativo in vitro per l'identificazione diretta dell'RNA/DNA dei virus nel plasma umano proveniente da donazioni di sangue in vitro e componenti ematici, da plasma destinato alle trasfusioni o a lavorazioni ulteriori e da donatori di organi e tessuti.

E' destinato allo screening di singoli campioni di donatori di plasma umano o di pool di plasma umano comprendenti aliquote equivalenti di donazioni singole; o per lo screening dei donatori di organi a cuore battente o dei donatori cadaverici.



PRINCIPI DELLA PROCEDURA

- Trattamento dei campioni.
- Trascrizione inversa dell'RNA bersaglio per generare DNA complementare (HCV e HIV).
- Amplificazione mediante PCR del cDNA/DNA bersaglio usando primer specifici al virus.
- Ibridazione dei prodotti amplificati mediante sonde oligonucleotidiche specifiche al bersaglio.
- Rilevazione dei prodotti amplificati legati alla sonda mediante determinazione colorimetrica.



Trattamento campioni

I campioni devono essere raccolti in provette contenenti EDTA, CPD, CPDA-1, ACD-A e citrato di sodio al 4%. No in EPARINA che inibisce la PCR.

La procedura MultiPrep viene utilizzata per campioni in pool e singoli campioni di donatori cadaverici (multitessuto).

Una serie comprende 12 campioni ciascuna, includendo un CN MultiPrep COBAS e un CP MultiPrep COBAS.

Estrazione manuale prevede una centrifugazione ad alta velocità del plasma (1ora) seguita da lisi del virus corpuscolato mediante il Reagente di lisi MultiPrep e da precipitazione del DNA/RNA in alcool.



Trattamento dei campioni


- Il controllo interno MultiPrep del virus viene introdotto in ciascun campione assieme al reagente di lisi e funge da controllo dell'estrazione e dell'amplificazione di ciascun campione e controllo trattato.
- Aree distinte per l'estrazione, fase di pre-amplificazione (preparazione della master-mix) e fase di preparazione dei campioni e dei controlli.
- Pipettatori e forniture sono dedicate alla Banca tessuti per evitare qualsiasi rischio di contaminazione.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

- Trascrizione inversa dell'RNA bersaglio per generare DNA complementare (HCV e HIV).
- Amplificazione mediante PCR del cDNA/DNA bersaglio usando primers specifici al virus.
- Ibridazione dei prodotti amplificati mediante sonde oligonucleotidiche specifiche al bersaglio (denaturazione e ibridazione dell'amplicon con sonda specifica biotinilata).
- Rilevazione dei prodotti amplificati legati alla sonda mediante determinazione colorimetrica (coniugato di avidina-perossidasi, complesso colorato, la cui assorbanza è misurata a 660nm).

Sensibilità del test

	PROCEDURA MULTIPREP	PROCEDURA STANDARD
HBV - DNA	5 UI/ ml	20 UI/ ml
HCV - RNA	20 UI/ ml	50 UI/ ml
HIV - RNA	50 copie / ml	100 copie / ml

 AZIENDA ULSS 9 TREVISO	MODULO BANCA TESSUTI Diario AMPLISCREEN – ROCHE SETTORE BIOLOGIA MOLECOLARE U.O. MICROBIOLOGIA VIROLOGIA	Rev. 0 del 15/09/2010 Pagina 1 di 1
---	--	--

SEDUTA ANALITICA DEL

LOTTI REAGENTI:

SCADENZA

ESTRAZIONE DEL

N. Pool	Composizione Pool	Esito		Esito		Esito		Altra seduta
		HCV	CI	HBV	CI	HIV	CI	
1	CTRL POSITIVO							
2	CTRL NEGATIVO							
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

AMPLIFICAZIONE

TEST	HCV	HBV	HIV
A- RING			

NOTE

OPERATORE.....

VALIDAZIONE.....



OPERAZIONE RICHIESTA



Relazione dei risultati dello strumento

```

COBAS AMPLICOR      38-4368      Tu,21.DEC 2010  9:51

SYSTEM INFO
310 system init
V0022.B      Tu,21.DEC 2010   9:51:51

SYSTEM MESSAGE
278 level detection statistic warning
V0022.B      Tu,21.DEC 2010  12:47:57

----- S-LoaCh - Status Loadcheck -----

loadcheck report at last START      21.DEC 2010 12:48      PASSED

reagent survey:
specific #11 loc2 BH      BI      IH      II
status
generics #20      DN      DN      SB      CN      CN
status

SYSTEM INFO
451 TC B cycling finished successfully
V0022.B      Tu,21.DEC 2010  14:36:28

SYSTEM INFO
450 TC B denaturation successfully
V0022.B      Tu,21.DEC 2010  14:39:50

SYSTEM INFO
451 TC A cycling finished successfully
V0022.B      Tu,21.DEC 2010  14:41:53

SYSTEM INFO
450 TC A denaturation successfully
V0022.B      Tu,21.DEC 2010  14:45:17

----- R-Calib - Result Calibration -----

Blank pos15 0.049      21.DEC 10 15:45

273667 1 C      +AIH *.***      21.DEC 10 15:46
273667 2 C      -AIH 0.006      21.DEC 10 15:48
273667 3 S      AIH 0.041      NEGATIVE      21.DEC 10 15:49
273667 4 S      AIH 0.067      NEGATIVE      21.DEC 10 15:50
273667 5 S      AIH 0.012      NEGATIVE      21.DEC 10 15:51
273667 6 S      AIH 0.006      NEGATIVE      21.DEC 10 15:52
273667 7 S      AIH 0.007      NEGATIVE      21.DEC 10 15:54
273667 8 S      AIH 0.006      NEGATIVE      21.DEC 10 15:55
273667 1 C      +AII *.***      21.DEC 10 15:56
    
```

```

V0022.B      1

COBAS AMPLICOR      38-4368      Tu,21.DEC 2010 15:57

273667 2 C      +AII 3.959      21.DEC 10 15:57
273667 3 S      AII *.***      POSITIVE      21.DEC 10 15:58
273667 4 S      AII *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:00
273667 5 S      AII *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:01
273667 6 S      AII *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:02
273667 7 S      AII *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:03
273667 8 S      AII *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:04
273676 1 C      +ABH *.***      21.DEC 10 16:06
273676 2 C      -ABH 0.002      21.DEC 10 16:07
273676 3 S      ABH 0.006      NEGATIVE      21.DEC 10 16:08
273676 4 S      ABH 0.001      NEGATIVE      21.DEC 10 16:09
273676 5 S      ABH 0.005      NEGATIVE      21.DEC 10 16:10
273676 6 S      ABH 0.001      NEGATIVE      21.DEC 10 16:12
273676 7 S      ABH 0.001      NEGATIVE      21.DEC 10 16:13
273676 8 S      ABH 0.004      NEGATIVE      21.DEC 10 16:14
273676 1 C      +ABI *.***      21.DEC 10 16:15
273676 2 C      +ABI 3.960      21.DEC 10 16:16
273676 3 S      ABI 3.960      POSITIVE      21.DEC 10 16:18
273676 4 S      ABI *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:19
273676 5 S      ABI 3.960      POSITIVE      21.DEC 10 16:20
273676 6 S      ABI *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:21
273676 7 S      ABI *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:22
273676 8 S      ABI *.***      POSITIVE      21.DEC 10 16:24

OK
    
```

Interpretazione dei risultati

- ✓ Pool primario negativo: tutti i singoli campioni associati sono “negativi all'RNA/DNA del virus”.
- ✓ Pool primario positivo: si preparano dei pool secondari più piccoli contenenti i campioni dei donatori associati.
- ✓ Le combinazioni positive che diventano negative secondariamente sono di solito dovute a contaminazioni del pool principale.

Interpretazione dei risultati

Interferenza endogena

Livelli elevati di:

BILIRUBINA fino a 20 mg/dl

TRIGLICERIDI fino a 3000 mg/dl

EMOGLOBINA fino a 1,0 g/dl

ALBUMINA fino a 6 g/dl

Non interferiscono con la specificità né con la sensibilità del test

I nostri risultati 2010

655 tests di cui: 3 POSITIVI HIV- RNA

1 POSITIVO HCV-RNA

10 POSITIVI HBV-DNA

165 da MULTITESSUTO

20 POOLS APERTI E RIPETUTI: 5 PER HIV

5 PER HCV

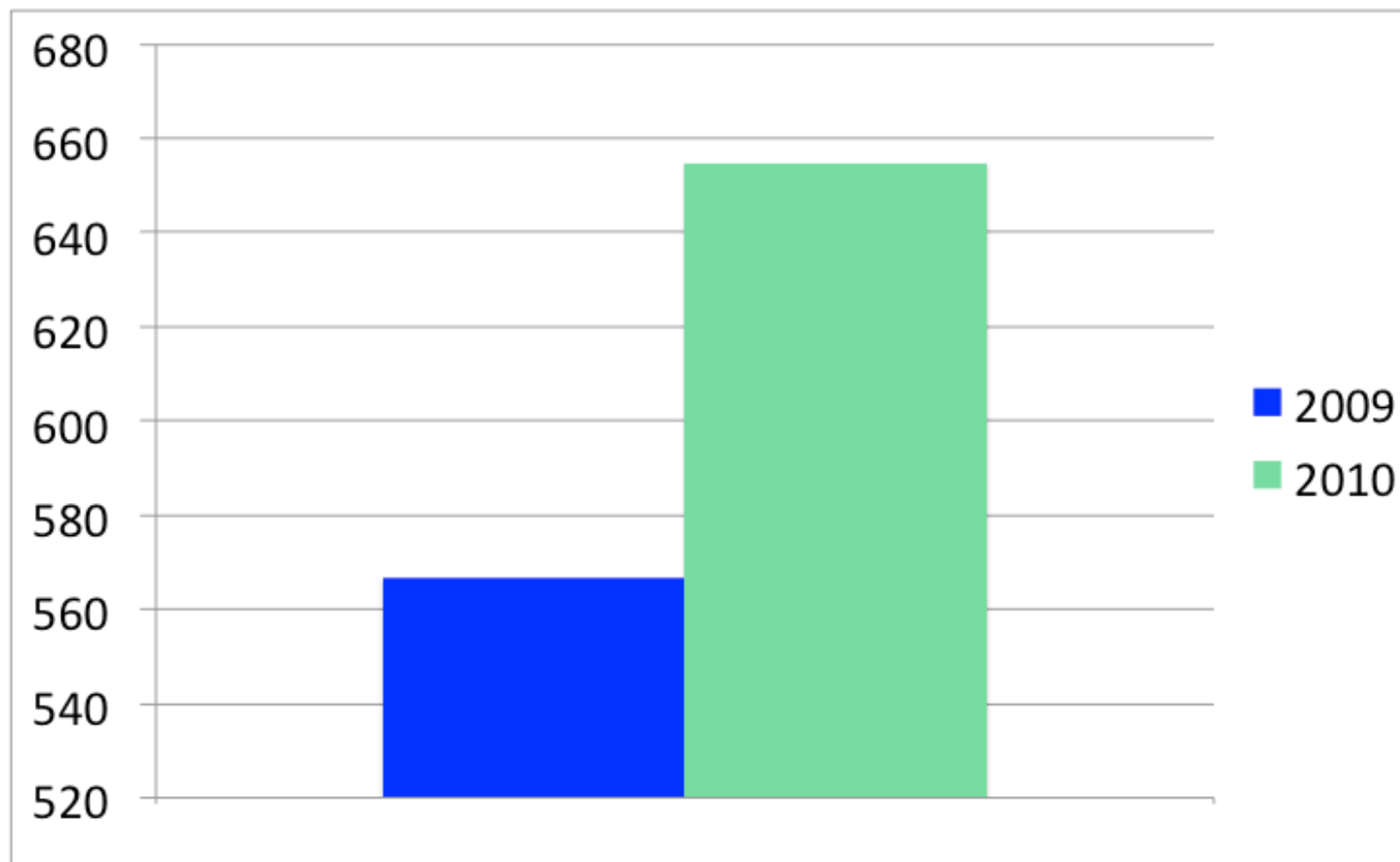
10 PER HBV

SEDUTE RIPETUTE PER CI INVALIDO: 8

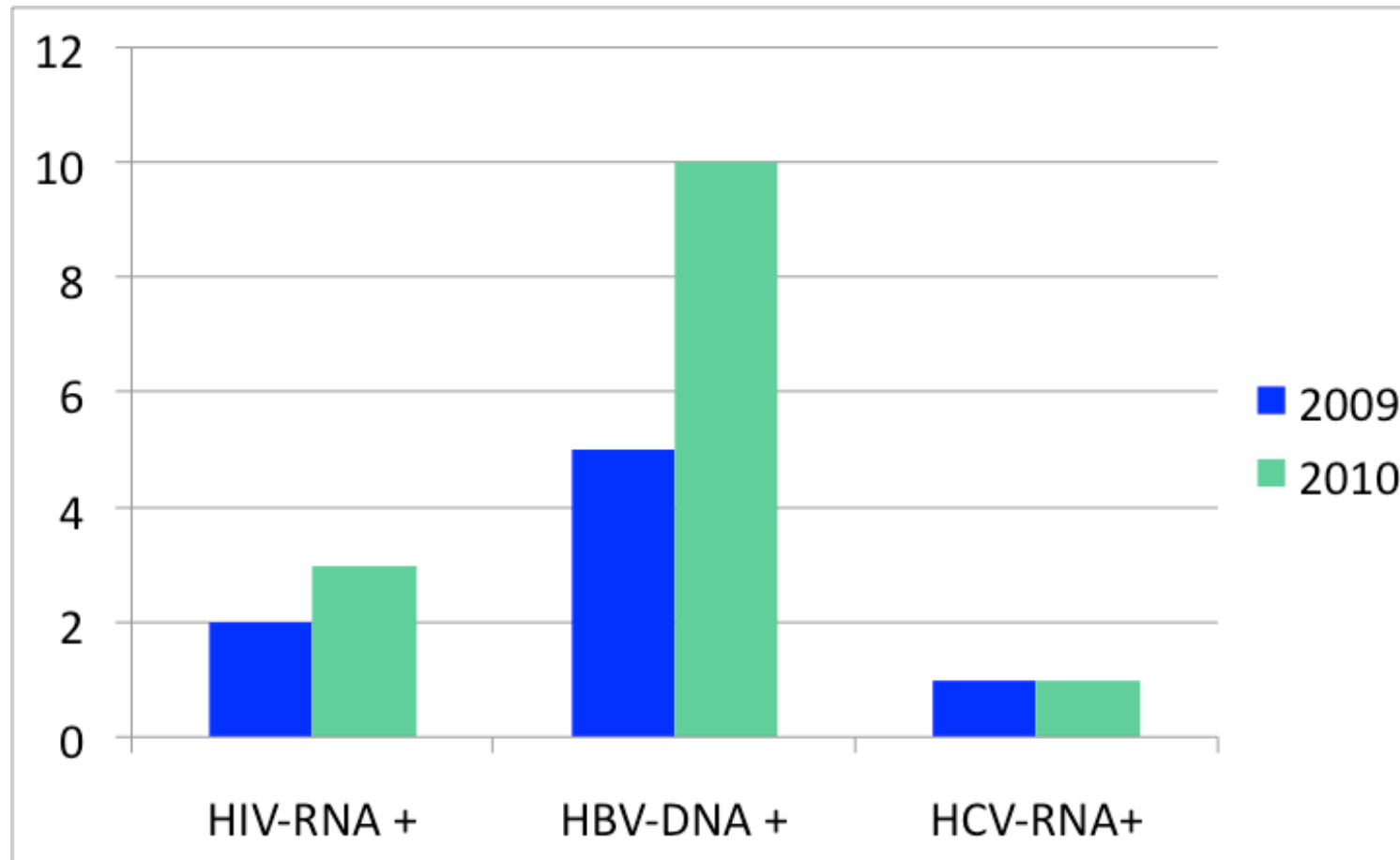
SEDUTE RIPETUTE PER CP/CN INVALIDI: 3

CAMPIONI NON AMPLIFICABILI: 3 PER HBV-DNA

Confronto attività 2009-2010



Confronto attività 2009-2010



GRAZIE DELL'ATTENZIONE



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: COGLIATI-VIAN_Le

STACK:

```
(12)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20110131084537+01'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20110131084537+01'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```