



**IL TECNICO DI
LABORATORIO E LA
GESTIONE DEL CAMPIONE
E DELL'ESAME IN
MEDICINA MOLECOLARE**

A. Forlin

ULSS 13 Mirano (VE)

PREMESSE

La Biologia Molecolare e l'applicazione delle sue tecnologie, in particolare quelle che riguardano l'amplificazione genica (PCR), sta incontrando un consenso sempre più ampio nella diagnostica di laboratorio in numerosi campi, con incredibili vantaggi sia per il medico che per il paziente.





BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA ALLA DIAGNOSTICA

**FARMACO
GENETICA**

MICROBIOLOGIA

GENETICA

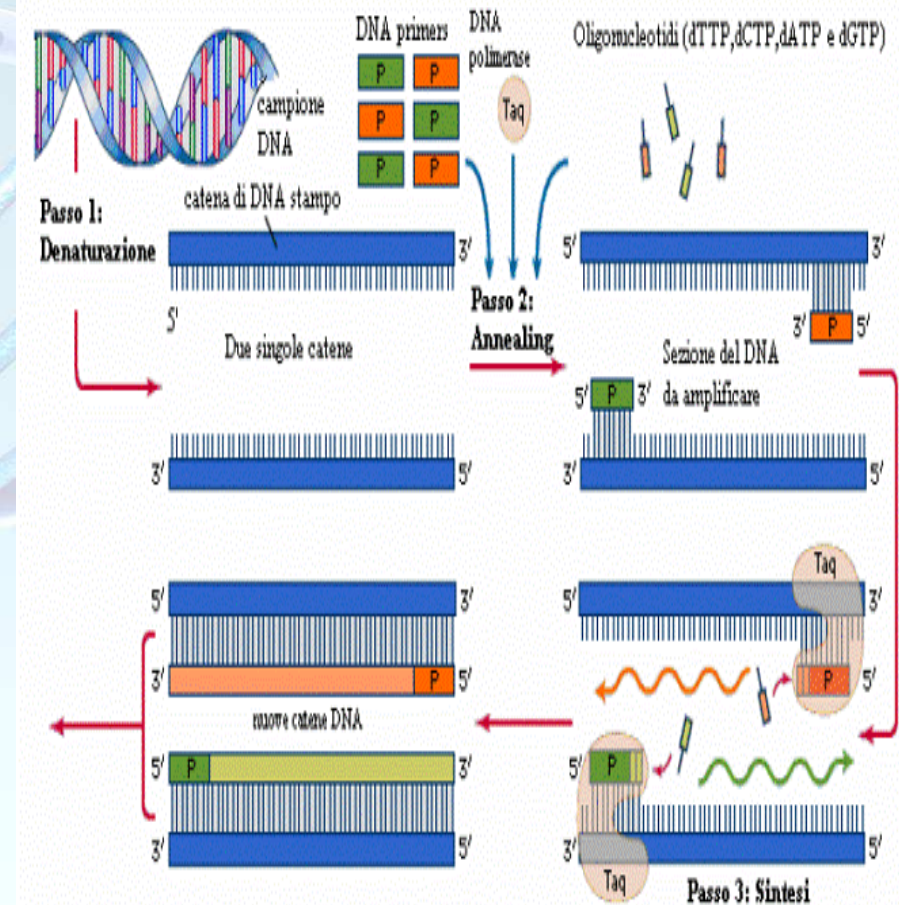
ONCOLOGIA

PERCHÉ

☐ SENSIBILITÀ

☐ SPECIFICITÀ

☐ IN MICROBIOLOGIA:
RIDUZIONE
NEI
TEMPI DI RISPOSTA



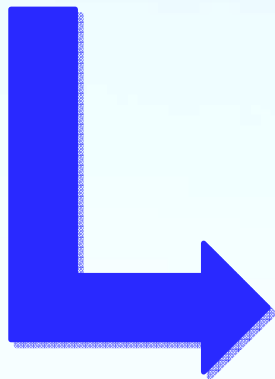
LAVORARE CON LE TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

La biologia molecolare con la sua evoluzione ha, però, contestualmente introdotto nei laboratori che se ne occupano una serie di nuove potenziali problematiche e di "critical point" che il Tecnico di Laboratorio in prima persona deve conoscere per saperli affrontare e gestire correttamente



È QUINDI NECESSARIO

- ❖ **ADEGUATA FORMAZIONE DEL PERSONALE**
- ❖ **STANDARDIZZAZIONE DEI SINGOLI PROCESSI**
- ❖ **ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE LABORATORIO**

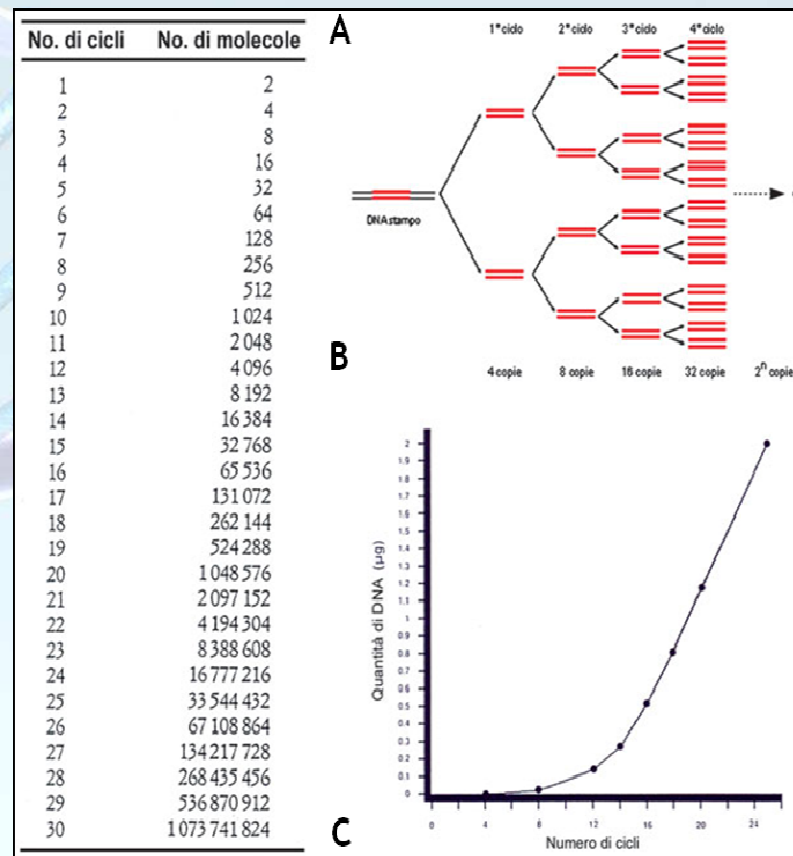


- Aspetto manuale ancora molto presente**
- Substrati analitici facilmente degradabili**
- Rischio contaminazione**

RISCHIO DI CONTAMINAZIONE

L'estrema sensibilità della PCR, in grado di generare, una quantità enorme di ampliconi a partire da una piccolissima quantità di sequenza bersaglio, rappresenta paradossalmente il suo "TALLONE DI ACHILLE"

È da considerare inoltre che la possibilità di contaminazione è tanto maggiore quanto maggiore è la numerosità dei campioni processati e la numerosità dei campioni positivi



MODALITÀ DI CONTAMINAZIONE

❑ CONTAMINAZIONE DERIVANTE DA AMPLIFICAZIONI PRECEDENTI CONSEGUENTI AD UN COMPORTAMENTO SCORRETTO DA PARTE DELL'OPERATORE

Se consideriamo che il prodotto di una PCR può contenere fino a miliardi di copie di materiale genomico, bastano minime quantità per contaminare l'ambiente.

❑ CONTAMINAZIONE CROCIATA

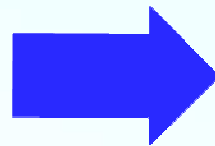
Si verifica quando, durante la preparazione di un campione, durante l'allestimento di una reazione o durante la fase di rivelazione, un campione positivo contamina un campione negativo.

COSA FARE

L'organizzazione strutturale di un laboratorio di biologia molecolare secondo specifiche norme definite dalle Linee Guida (ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ – LINEE GUIDA PER TEST GENETICI – Rapporto del gruppo di lavoro – 19 maggio 1998) rappresenta un aspetto che può condizionare anche in modo critico il rischio di contaminazione.

A questo proposito continua ad essere importante la suddivisione fisica dell'ambiente di lavoro almeno in due blocchi separati.

**ZONA PRE
AMPLIFICAZIONE**



**ZONA POST
AMPLIFICAZIONE**

REGOLE DI COMPORTAMENTO ALLE QUALI CIASCUN OPERATORE SI DEVE ATTENERE

- Muoversi secondo il flusso

AREA
PRE AMPLIFICAZIONE



AREA
POST AMPLIFICAZIONE

- Utilizzare in tutte le fasi manuali una cappa biologica di classe II a flusso laminare
- Non entrare nell'area pre amplificazione con prodotti amplificati
- Utilizzare puntali con filtro



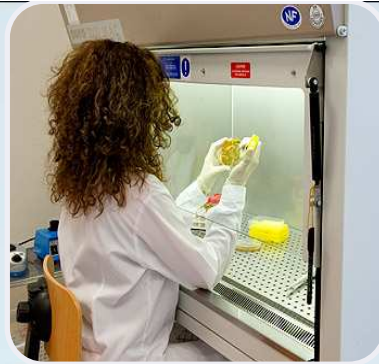
REGOLE DI COMPORTAMENTO ALLE QUALI CIASCUN OPERATORE SI DEVE ATTENERE

- Utilizzare DPI e cambiare spesso i guanti
- **Avere strumentazione dedicata in ciascuna area**
- Non aprire mai più di un campione contemporaneamente
- **Conservare campioni e reagenti in gruppi frigoriferi diversi.**
- Decontaminare superfici di lavoro alla fine di ogni operazione



PROCESSO ANALITICO GLOBALE

Il PROCESSO ANALITICO GLOBALE che porta al dato di laboratorio è caratterizzato da tre fasi



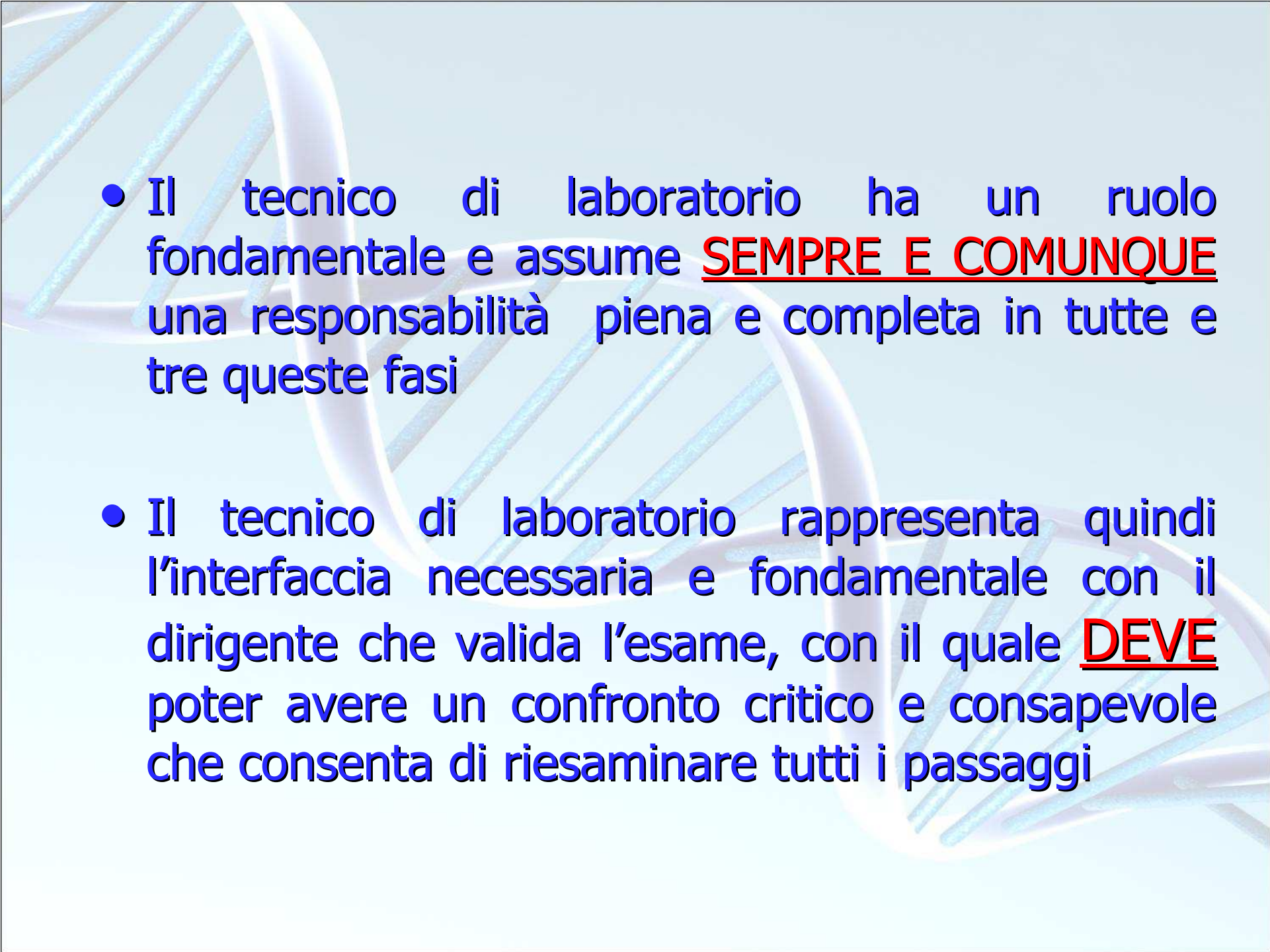
**FASE
ANALITICA**
Esecuzione test



**FASE
PRE ANALITICA**
Raccolta
Trasporto
Conservazione



**FASE
POST ANALITICA**
Validazione
Refertazione
Stoccaggio campioni

- 
- Il tecnico di laboratorio ha un ruolo fondamentale e assume **SEMPRE E COMUNQUE** una responsabilità piena e completa in tutte e tre queste fasi
 - Il tecnico di laboratorio rappresenta quindi l'interfaccia necessaria e fondamentale con il dirigente che valida l'esame, con il quale **DEVE** poter avere un confronto critico e consapevole che consenta di riesaminare tutti i passaggi



□ CONOSCENZA (fondamenti teorici e pratici che stanno alla base di tutte le criticità del processo analitico nel suo complesso)

□ STANDARDIZZAZIONE (definire in modo univoco tutti i processi operativi e i criteri di non accettabilità del campione o del risultato)

FASE PRE ANALITICA

- Ancora oggi una fonte di errore non trascurabile
- Spesso un errore verificatosi in questa fase è difficile se non impossibile da individuare
- Il dato analitico deve essere la rappresentazione più fedele del dato biologico. È importante quindi adottare tutte le precauzioni necessarie a garantire il mantenimento dell' integrità dei nostri substrati analitici

FATTORI PRE ANALITICI CRITICI

1. DEGRADAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI PER AZIONE DI NUCLEASI

- Enzimi che degradano gli acidi nucleici
- Hanno distribuzione ubiquitaria: si trovano infatti nelle mani dell'operatore, nell'ambiente, nel campione
- In particolare le RNasi sono molto resistenti anche alle variazioni di temperatura e di pH

L'AZIONE DI QUESTI ENZIMI PUÒ ESSERE DETERMINANTE NEI CAMPIONI DEBOLMENTE POSITIVI: ANCHE UNA MINIMA DEGRADAZIONE PUÒ PORTARE A DEI RISULTATI FALSI NEGATIVI

IMPORTANTE

- RISPETTARE TEMPI DI CONSERVAZIONE E DI TRASPORTO
- PROCEDERE AD EVENTUALE CENTRIFUGAZIONE DEL CAMPIONE ENTRO I TEMPI STABILITI (EVITARE AZIONE DI NUCLEASI CELLULARI)

FATTORI PRE ANALITICI CRITICI

2. PRESENZA DI INIBITORI DELLA REAZIONE DI PCR

Esempi di inibitori sono l'eparina (importante la scelta dell'anticoagulante), l'emoglobina ed i suoi prodotti di degradazione, la presenza di metalli pesanti (importante usare dei chelanti quali EDTA). Questi inibitori agiscono inibendo la polimerasi coinvolta nel processo di amplificazione.

3. CONTAMINAZIONE DEL CAMPIONE

Importante seguire scrupolosamente le norme di comportamento già descritte dettagliatamente in precedenza



FASE ANALITICA

Una particolare attenzione deve essere posta in questa fase soprattutto per garantire la tracciabilità di tutto ciò che è stato fatto

Un aspetto fondamentale da prendere in considerazione è che il nostro **TARGET** non si trova in una soluzione omogenea ma in una **SOSPENSIONE**

XXXX		XXX	X
	XX	XXXXX	
	X		

UN CASO PARTICOLARE.....

- Campione HCV RNA pos con bassa carica virale: richiesta di quantificazione e genotipizzazione
- Sensibilità dei due metodi molto diversa, in particolare la soglia di sensibilità del metodo quantitativo è molto più bassa di quella del metodo per la determinazione del genotipo
- La carica virale del campione è inferiore alla soglia di sensibilità del metodo di genotipizzazione

COSA FARE??????????????

ULTRACENTRIFUGAZIONE: mi permette di concentrare il campione e di raggiungere la soglia di sensibilità del mio metodo

CONTROLLI PROCESSO ANALITICO



**Controllo
strumentazione**



**Controllo
reagenti e
metodiche.**



**Controllo fasi
analitiche**



1. CONTROLLO STRUMENTAZIONE

La garanzia di qualità di un risultato non può prescindere da un corretto controllo della strumentazione. L'operatore deve provvedere:

- ✓ Corretta manutenzione di tutte le attrezzature (pipette, centrifughe, termostati, strumenti ecc.) presenti, secondo quanto indicato dalle ditte fornitrici
- ✓ Accertarsi che vengano eseguite tutte le manutenzioni esterne programmate previste dal contratto al momento della fornitura
- ✓ Segnalare tutte le anomalie riscontrate provvedendo qualora necessario alla richiesta di una manutenzione straordinaria



2. CONTROLLO DEI REAGENTI E DELLE METODICHE

- ✓ La qualità dei reagenti è garantita dal monitoraggio dei prodotti in corso di fornitura, dai controlli al ricevimento, dalla conservazione in condizioni idonee
- ✓ È importante, all'arrivo dei reagenti, che il tecnico controlli ed eventualmente metta in atto eventuali aggiornamenti nelle metodiche

3. CONTROLLO DELLE FASI ANALITICHE

In tutte le fasi del processo analitico è necessario introdurre dei controlli, solitamente forniti con il kit, positivi e negativi, necessari alla validazione del test

CONTROLLO NEGATIVO: assenza sequenza bersaglio

CONTROLLO POSITIVO: presenza sequenza bersaglio

CONTROLLO INTERNO: caratterizzato da una sequenza genomica che coamplifica in modo non competitivo con l'eventuale target presente. Mi permette di seguire l'intero processo analitico nel singolo campione



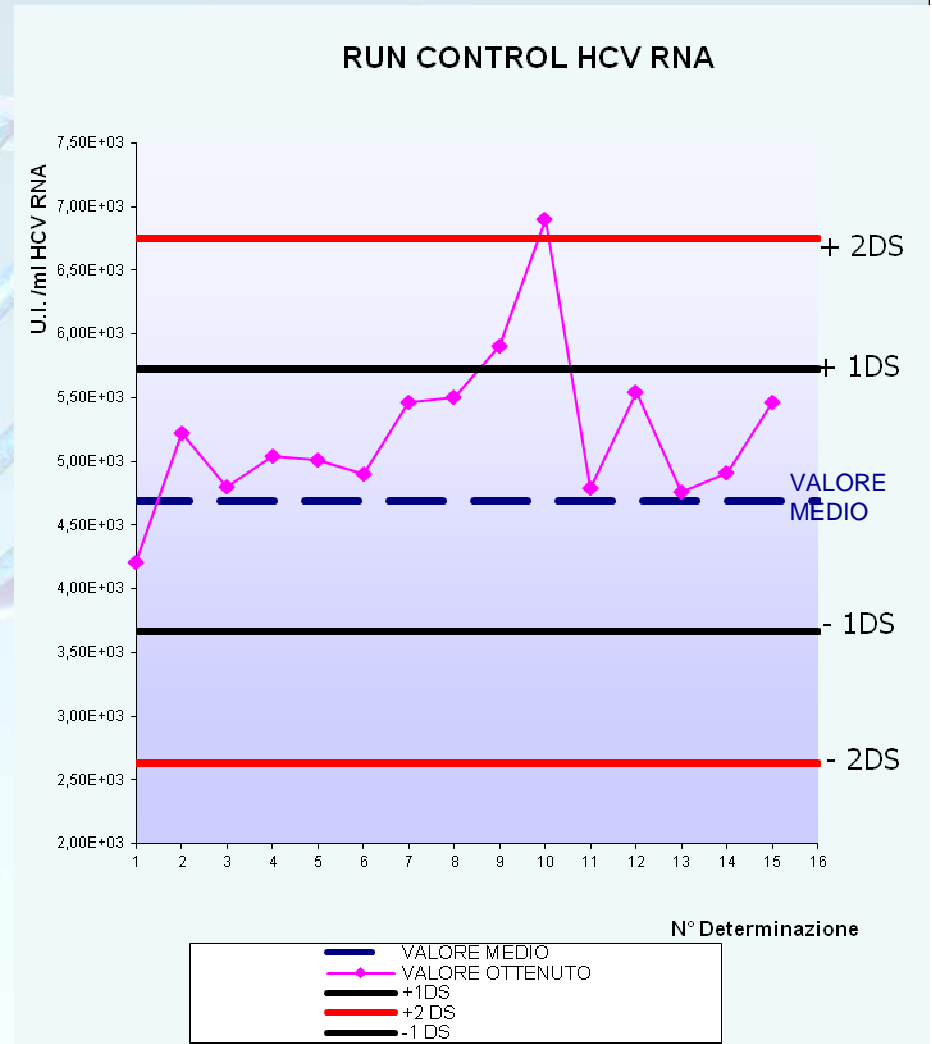
**UN MAGGIORE CONTROLLO
DEI PROCESSI E DELLE
PERFORMANCE DI
REAZIONE SI PUÒ
OTTENERE.....**

RUN CONTROL

- Controllo positivo interno al laboratorio precedentemente tipizzato**
- Importante perché mi permette di avere un controllo complessivo, da un lato sui reagenti e dall'altro sulle fluttuazioni nel tempo della carica virale dopo congelamento.**

PREPARAZIONE

- ✓ Vengono eseguite un numero adeguato di determinazioni su un campione positivo noto: questo mi permette di calcolare la media e la deviazione standard e di riportare tali valori su un grafico.
- ✓ Il campione viene suddiviso in aliquote e congelato.
- ✓ Ad ogni routine viene inserito uno di questi run control ed il valore ottenuto viene riportato sul grafico. QUESTO MI PERMETTE DI EVIDENZIARE FLUTTUAZIONI.



VERIFICA ESTERNA DI QUALITÀ



**L'ADESIONE AD UN PROGRAMMA DI VEQ È
MOLTO IMPORTANTE IN QUANTO MI
PERMETTE DI FARE UN CONFRONTO SIA
CON ALTRI LABORATORI SIA CON
METODOLOGIE DIVERSE CHE RIGUARDANO
LA STESSA TIPOLOGIA DI INDAGINE**

FASE POST ANALITICA

- **VALIDAZIONE:** la prima valutazione del risultato complessivo dell' esame e della sua validità viene eseguita proprio dal tecnico
- **VALIDAZIONE DI CONGRUITÀ INTERNA:** verifica dei risultati in relazione ai dati storici.
- **REFERTAZIONE**

FASE POST ANALITICA

- **STOCCAGGIO CAMPIONI:** eseguito secondo le modalità di conservazione previste per quella tipologia di campione e per il tempo definito dalle linee guida per test di Biologia Molecolare
- **ARCHIVIAZIONE INFORMATICA E DEL MATERIALE CARTACEO:** secondo linee guida

CONCLUSIONI

Solo la conoscenza teorico/pratica di ogni singolo atto che caratterizza il **PROCESSO ANALITICO GLOBALE** può consentire al tecnico di porsi le domande giuste e quindi di formulare delle ipotesi per spiegare eventuali risultati contraddittori o dubbi



CONCLUSIONI

Questo sforzo, che deve essere continuativo e che richiede sicuramente una certa fatica, sarà comunque ripagato da quella soddisfazione professionale che dovrebbe sempre guidare ed ispirare il lavoro di ognuno di noi!!!

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



PROCESSO ANALITICO BIOLOGIA MOLECOLARE

TUTTE LE PRESTAZIONI DI AMPLIFICAZIONE GENICA HANNO IN COMUNE TRE FASI

ESTRAZIONE ACIDO NUCLEICO

- Rompere parete e/o membrana cellulare
- Deproteinizzare campione lisato
- Separare acidi nucleici dagli altri componenti cellulari

AMPLIFICAZIONE GENICA

- Amplificazione esponenziale acido nucleico target.

RIVELAZIONE PRODOTTO AMPLIFICAZIONE

- End point (gel elettroforesi, enzimi di restrizione, reverse dot blot)
- Real Time (amplificazione genica e analisi del prodotto in tempo reale sulla stessa piattaforma analitica.



Linee Guida

Le norme procedurali sono mutuuate da quelle impiegate in generale nei laboratori diagnostici, però, vista anche la criticità di alcuni aspetti, esistono delle linee guida specifiche per indagini di Biologia Molecolare . La conoscenza di queste linee guida può essere molto utile perché ci troviamo spesso di fronte sia ad **un'ampia variabilità di comportamento** sia ad **una carenza di letteratura specifica.**

Linee Guida

A questo proposito alcuni riferimenti sono:

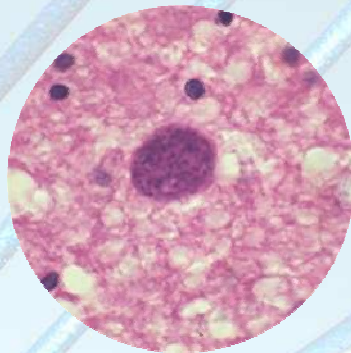
- ❖ Good Laboratory Practice for Molecular Genetic Testing for Heritable Disease and Conditions(CDC-2009)
- ❖ ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ – LINEE GUIDA PER TEST GENETICI – Rapporto del gruppo di lavoro – 19 maggio 1998
- ❖ SOCIETÀ ITALIANA DI VIROLOGIA- Linee Guida per il CQ e la standardizzazione in Virologia – (2011)

ALCUNE CONSIDERAZIONI.....

- In ambito microbiologico la tipologia di campioni è estremamente varia quindi è importante conoscere gli eventuali pretrattamenti che deve subire un campione piuttosto che un altro prima di essere introdotto nel processo analitico vero e proprio

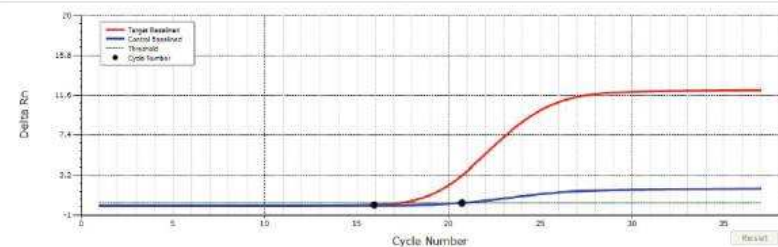
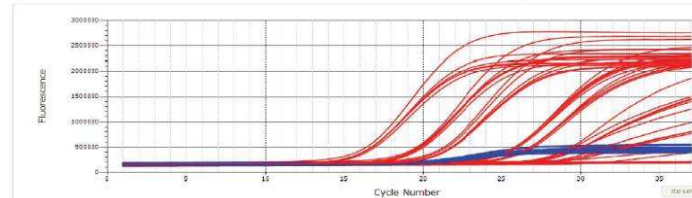
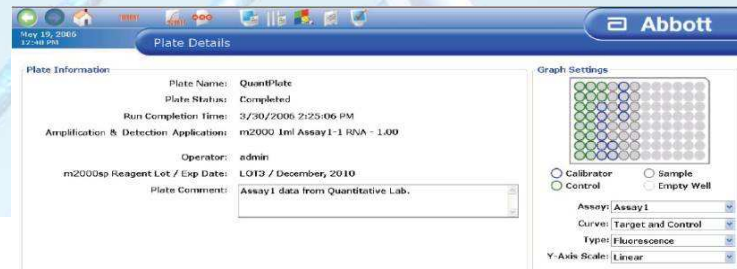
APPLICAZIONE TECNICHE BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICROBIOLOGIA

1 - IDENTIFICAZIONE DI BATTERI, VIRUS, FUNGHI, PARASSITI.



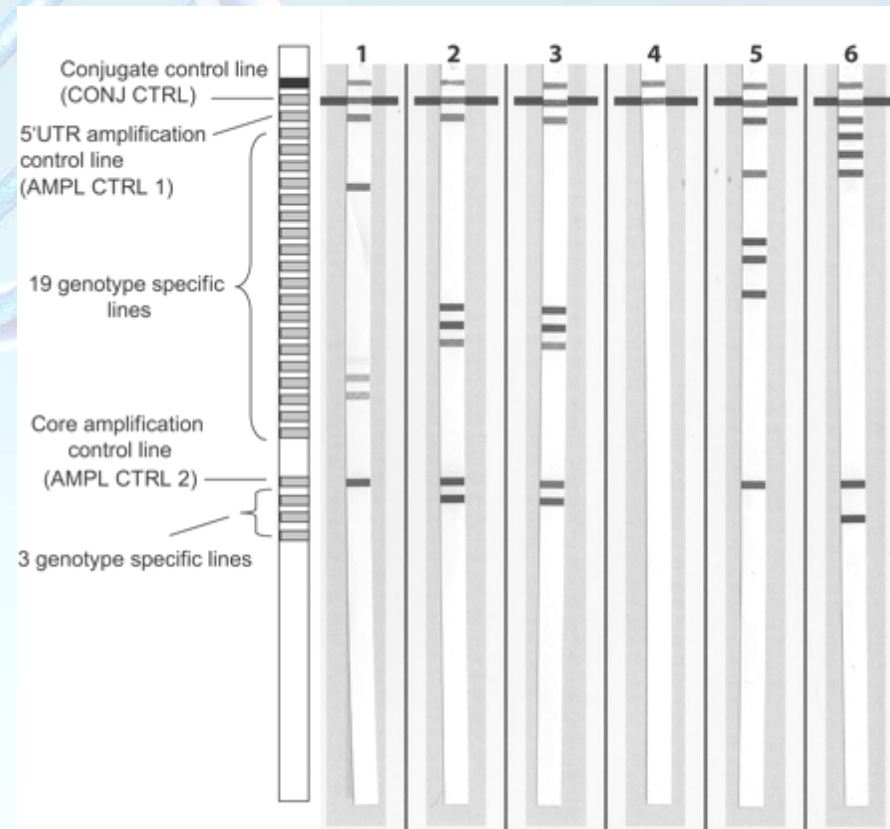
APPLICAZIONE TECNICHE BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICROBIOLOGIA

2 - QUANTIFICAZIONE DEL MICRORGANISMO (introduzione real time PCR). Soprattutto nella diagnostica virale la quantificazione consente di stabilire la progressione della malattia e l'efficacia della terapia



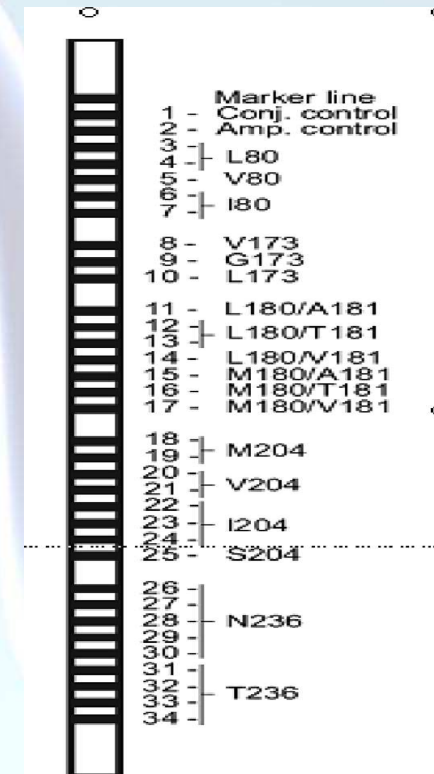
APPLICAZIONE TECNICHE BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICROBIOLOGIA

3 – GENOTIPIZZAZIONE DEL MICRORGANISMO: importante nelle infezioni virali dove la risposta farmacologica è strettamente correlata al genotipo di appartenenza del virus (es. HCV)



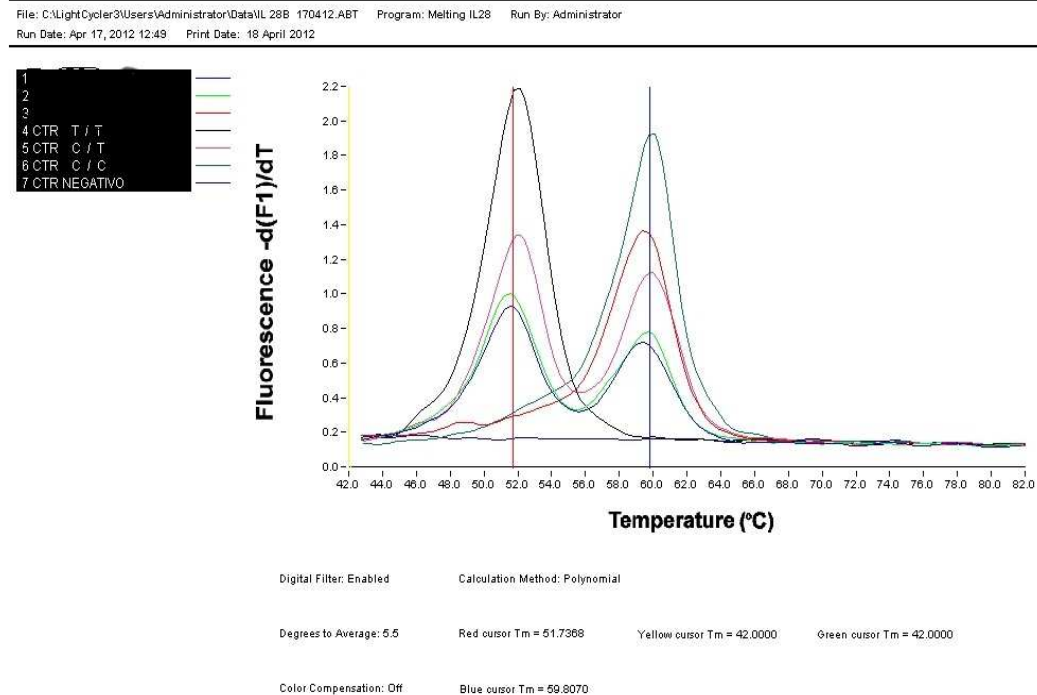
APPLICAZIONE TECNICHE BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICROBIOLOGIA

4 – IDENTIFICAZIONE DI FARMACORESISTENZA SIA NEL CASO DI INFEZIONI BATTERICHE CHE VIRALI : MRSA; VRE; resistenza alla Lamivudina in pazienti infetti con HBV.



APPLICAZIONE TECNICHE BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICROBIOLOGIA

5 – RISPOSTA INDIVIDUALE ALLA TERAPIA FARMACOLOGICA: un esempio importante a questo proposito è rappresentato dall'identificazione di alcuni polimorfismi nel gene IL28B (codifica per IFN- λ -3) i quali correlano con una migliore clearance naturale del virus ed una migliore risposta alla terapia farmacologica nel caso di infezione da HCV.



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: I1

STACK:

```
(4)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20120508095839+02'00' )  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20120508095839+02'00' )  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```