

Modulo 2

IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Il laboratorio di diagnostica molecolare in anatomia patologica:
aspetti pratici ed organizzativi

Il laboratorio di diagnostica molecolare

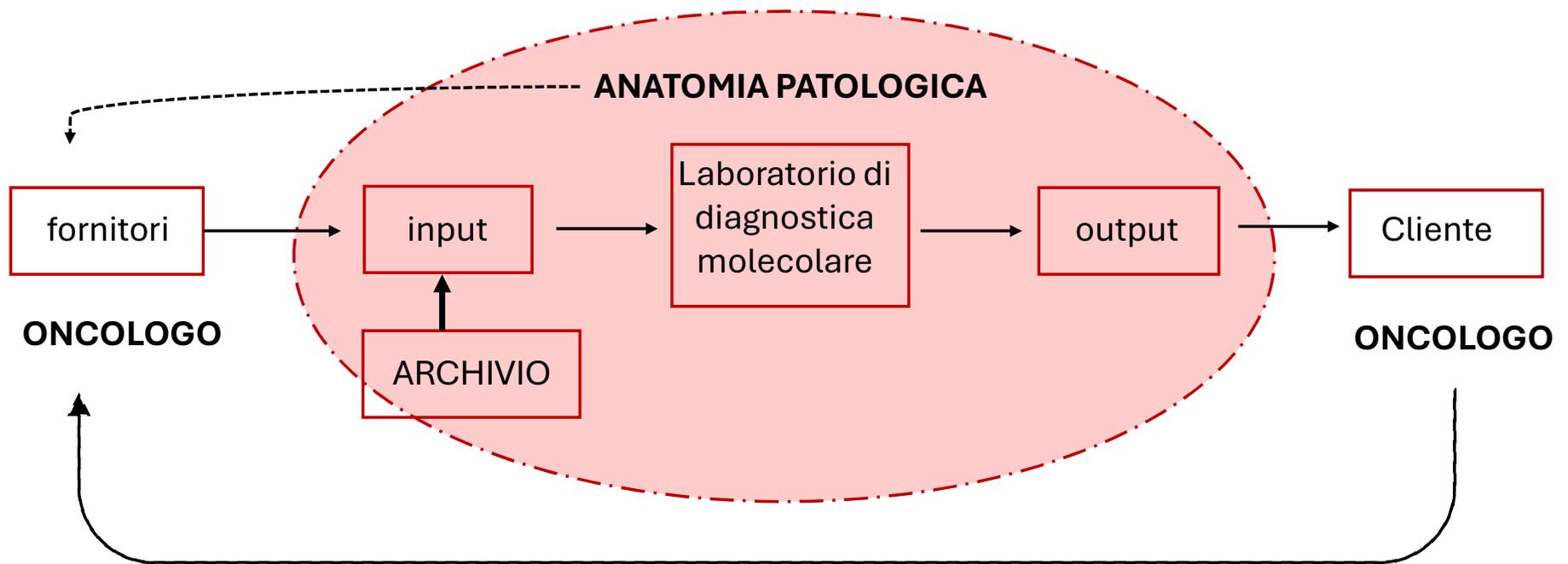
La diagnostica molecolare ha assunto un ruolo fondamentale, permettendo di effettuare una diagnosi **più accurata e adeguata** agli sviluppi clinici attuali, al fine di un corretto **inquadramento del paziente ai fini della prognosi e predittivi** del trattamento, in particolare con farmaci di nuova generazione per terapie personalizzate.

Il laboratorio di **patologia molecolare diagnostica** è da considerarsi parte **integrante** della struttura e dell'attività di una moderna **anatomia patologica**:

- 1) il materiale su cui si effettua tale analisi è a disposizione e custodito dalla Anatomia Patologica (es. liquidi biologici, biopsie o pezzi anatomici)
- 2) il controllo pre-analitico di tale materiale è esclusiva competenza del patologo;
- 3) i risultati di tali analisi/il referto molecolare integra il referto anatomopatologico.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

Il laboratorio di **diagnostica molecolare** è parte integrante della comunità biomedica a cui afferisce.



Il laboratorio di diagnostica molecolare

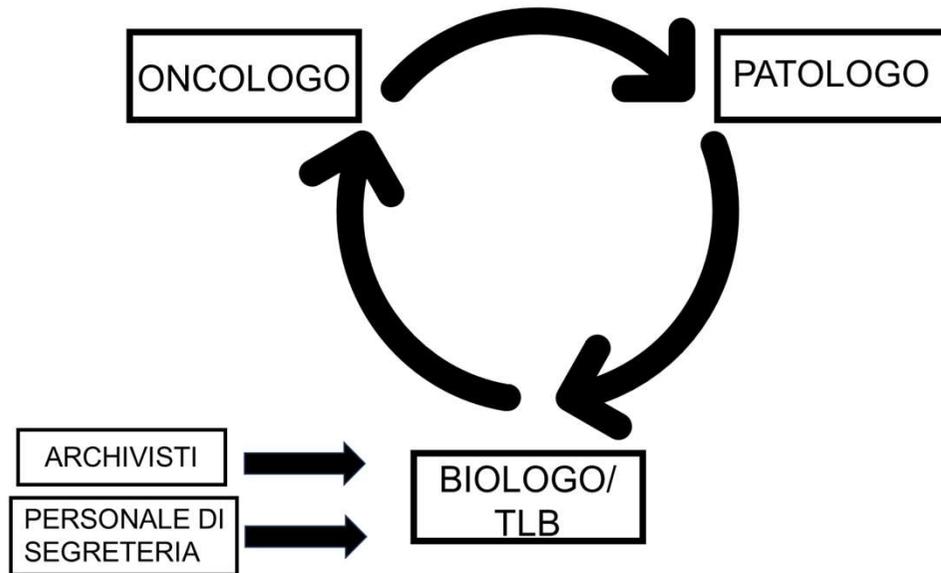
Il flusso di lavoro

L'allestimento e il corretto funzionamento di un laboratorio di diagnostica molecolare nell'ambito di una anatomia patologica è articolato: richiedendo ampi spazi dedicati, strumentazione adeguata e aggiornata rispetto alle innovazioni tecnologiche, personale con competenze specifiche in ambito medico, biologico e tecnico.

Il flusso di lavoro considerare diversi aspetti che sono fondamentali per ottenere risultati ottimali:

- 1) la **fase preanalitica** che deve essere concepita sin dall'inizio in funzione delle attività diagnostiche sia morfologiche e immunoistochimiche che molecolari (percorsi dedicati);
- 2) la **fase analitica** che deve prevedere l'utilizzo delle più innovative ed adeguate tecnologie per la diagnostica degli specifici marcatori;
- 3) I **controlli di qualità**, sia esterni, condotti da enti riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale, sia interni al laboratorio, eseguiti allo scopo di mantenere nel tempo i livelli di qualità adeguati;
- 4) la stesura del **referto molecolare diagnostico** deve rispettare criteri di refertazione internazionali e deve riportare i risultati in modo facilmente interpretabili ed applicabili nella pratica clinica.

Il laboratorio di diagnostica molecolare



Il laboratorio richiede l'integrazione delle attività di personale con competenze diverse e complementari:

- Personale medico: effettua la diagnosi, seleziona il campione da analizzare e controlla l'adeguatezza qualitativa/quantitativa del tessuto lesionale
- Personale tecnico sanitario: provvede al taglio del materiale dai blocchetti di paraffina e alla colorazione delle sezioni di controllo; effettua le analisi molecolari
- Biologi/biotecnologi: analizza i risultati delle analisi molecolari

Tali attività devono essere svolte in spazi adiacenti o comunque connessi in maniera adeguata.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

SPAZI DEDICATI

I laboratori dedicati all'analisi degli acidi nucleici prevedono **l'amplificazione di frammenti di DNA mediante PCR**, e la natura esponenziale delle reazioni di amplificazione del DNA pone seri rischi di **contaminazione** con possibili conseguenze sull'esito finale.

⇒ È essenziale quindi che ogni laboratorio di diagnostica molecolare abbia a disposizione uno spazio dedicato, di dimensioni idonee, per consentire la distribuzione degli ambienti funzionale alla separazione delle varie fasi del percorso analitico.

Questa impostazione, da un lato riduce al **minimo la possibilità di contaminazione**, dall'altro favorisce spazi ergonomicamente corretti facilitando al personale l'accesso agli strumenti, influenzando così **positivamente la qualità del lavoro**.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

Una separazione dei percorsi e/o degli ambienti durante lo svolgimento di queste attività è essenziale per ridurre al minimo il rischio di due tipi di **contaminazione**:

- A. la **cross-contaminazione tra campioni**, cioè contaminazione da DNA genomico (target template contamination), associata alle fasi **Pre-PCR**. Questo rischio si presenta prevalentemente nelle attività di anatomia patologica, per la presenza di microparticelle di tessuto o di microgoccioline di acidi nucleici, specialmente durante le ripetizioni di allestimento dello stesso tipo di campione.
- B. la **contaminazione da riporto o da precedenti amplificazioni** (carryover contamination), cioè contaminazione da prodotti di DNA amplificato, associata alle fasi **Post-PCR**, dovuta alla aerosolizzazione degli ampliconi: rappresenta la forma di **contaminazione più rischiosa** in quanto gli ampliconi non possono essere identificati prima che si verifichi la contaminazione. Il rischio è legato alla frequenza con cui un dato amplicone viene prodotto e alla sua concentrazione.
esempio: l'apertura di una provetta contenente l'amplificato può dar luogo ad un effetto aerosol che rende l'ambiente inutilizzabile per l'allestimento di ulteriori reazioni di PCR

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

La distribuzione degli ambienti nel laboratorio deve considerare 4 attività distinte → scopo di garantire gli **obiettivi di specificità, sensibilità e riproducibilità**



Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

Sono dunque da prevedere aree separate per **attività Pre-PCR e Post-PCR**, con strumenti e consumabili (pipette, puntali, piastre, provette etc.) dedicati per i seguenti spazi:

AREA “NO TEMPLATE” (PRE-PCR):

- Area sempre **libera da acidi nucleici e ampliconi** dedicata alla **preparazione e stoccaggio dei reagenti e preparazione del campione**.
- Se possibile questa area dovrebbe avere una ventilazione a pressione leggermente positiva, per prevenire contaminazione da materiale e acidi nucleici estranei ambientali.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

AREA “NO TEMPLATE” (PRE-PCR):

Aree destinate al **trattamento pre-analitico dei campioni (Pre-PCR)**, dove il materiale da analizzare viene processato, gli acidi nucleici estratti e conservati, e dove - se necessario viene prodotto cDNA.

Queste aree consistono di spazi distinti per:

- 1. allestimento delle reazioni:** preparazione delle mastermix per amplificazione del DNA e preparazione alle analisi di sequenza.
- 2. Preparazione del campione :**
 - i) dissezione del materiale biologico, paraffinato o meno;
 - ii) estrazione degli acidi nucleici;

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

AREA “NO TEMPLATE” (PRE-PCR):

Ambiente per la preparazione della Master Mix nel quale si compiono le operazioni di:

- suddivisione in aliquote e stoccaggio dei reagenti di amplificazione. E' necessario aliquotare e stoccare i reagenti utilizzati per la PCR (tampone, primer, nucleotidi, enzima) in quest'area.
- Preparazione della miscela di reazione (master mix) e allestimento dei tubi per l'amplificazione.

Area pre-PCR: dotazione ambiente per la preparazione della Master Mix



- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

AREA “NO TEMPLATE” (PRE-PCR):

Ambiente per la preparazione del campione nel quale si compiono le operazioni di:

- preparazione e conservazione del campione: i campioni di DNA o RNA devono essere preparati in un'area distinta da quella in cui vengono manipolati i reagenti e da quella in cui vengono analizzati gli amplificati.
- Lisi ed estrazione degli acidi nucleici + quantificazione degli acidi nucleici
- Fase conclusiva dell'allestimento delle reazioni di PCR: → aggiunta del DNA o dell'RNA e dei controlli negativo e positivo alla miscela di reazione (PCR o retro trascrizione)

Area pre-PCR: dotazione ambiente per la preparazione del campione



- cappa a flusso laminare
- centrifughe
- vortex
- blocco termostato
- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

AREA POST-PCR

con separazione della zona dedicata alle **reazioni di amplificazione** con quella dedicata **all'analisi degli ampliconi**.

- ✓ Nella prima zona di **reazioni di amplificazione** si trovano strumenti quali dispositivi per elettroforesi, termociclatori;
- ✓ nella seconda zona di **l'analisi degli ampliconi** si trovano le piattaforme di sequenziamento o di real-time PCR o per expression profiling.

È preferibile avere almeno una stanza dedicata per gli strumenti: la stanza dev'essere ben areata o a temperatura controllata, gli strumenti non troppo ravvicinati (per evitare il surriscaldamento) e collegati a un gruppo elettrico di continuità. Se possibile queste aree dovrebbero avere una ventilazione a pressione leggermente negativa, per prevenire la disseminazione ambientale di ampliconi aerosolizzati.

É essenziale che nessun oggetto o reagente della zona post-PCR passi nella zona pre-PCR.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

AREA POST-PCR

Area PCR/post-PCR: dotazione ambiente



- thermal cycler e real-time cycler
- sequenziatore
- cella elettroforetica e transilluminatore
- centrifughe
- vortex
- blocco e bagno termostato
- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

STRUMENTI, REAGENTI, PIPETTE E PUNTALI DEDICATI NELLE DIVERSE AREE

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

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

- Cappa a flusso laminare
- Microcentrifuga
- Vortex
- Blocco termostato a secco e stufa
- Fotometro
- Frigorifero, congelatore -20 °C: adibito alla conservazione rispettivamente di:
 - ✓ reattivi per le reazioni di amplificazione;
 - ✓ campioni, prodotti estratti, reagenti per l'estrazione;
 - ✓ ampliconi e reagenti per la rivelazione.
- Thermal-cycler • Sistema elettroforetico (zona post-PCR)

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

- Timer
- Pipette variabili per diversi volumi (0,5-1000 µL) con supporti
le normali pipette per puntali monouso usate comunemente in laboratorio sono fonte di contaminazione. Si possono formare infatti aerosol contenenti frammenti di DNA che possono essere trasportati in campioni negativi. Per eliminare questa cross-reatzione è necessario l'uso di pipette con **puntali contenenti un filtro** (barriera tra campione e pipetta)

N.B.: E' ASSOLUTAMENTE INDISPENSABILE UTILIZZARE SET DI PIPETTE DISTINTI NELLE DIVERSE AREE.

- Puntali con filtro in portapuntali
- Tubi di biologia molecolare (0.2/0.5/1.5/2.0 ml)
- Rack porta tubi (anche refrigerati)
- Guanti
- Reagenti aggiuntivi (alcool etilico - isopropilico - tamponi ipoclorito)

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

BUONA PRASSI DI LABORATORIO (BPL)

In tutte le varie fasi:

- Cambio frequente guanti
- Apertura attenta provette per minimizzare aerosol
- **Aggiungere il campione come ultimo ingrediente della mix**
- **Chiudere la provetta** dopo aver dispensato il campione e prima di passare al successivo
- Pulire le superfici di lavoro con prodotti detergenti specifici.

Il laboratorio di diagnostica molecolare

GLI SPAZI

NORME DI SICUREZZA



In laboratorio bisogna utilizzare sempre:

- ✓ guanti monouso
- ✓ camici;
- ✓ adeguata ventilazione dei locali;
- ✓ manutenzione delle apparecchiature;
- ✓ addestramento specifico del personale;
- ✓ adozione, aggiornamento e divulgazione dei **protocolli per la sicurezza.**