

*Dott. ne lavoro
per seguito e
compilare*

**U.O.C Biochimica Clinica
UOC Batteriologia Virologia**

Direttore Dott. Luigi Atripaldi

Prot. Lab. 81

Napoli, 05.12.2017

 AORN Ospedali dei Colli
07/12/2017 15.19.10
AOC/0028838/2017

Spett.le

**Direttore Generale Dr. G. Matarazzo
Direttore Amministrativo Dr. G. Perito**

La direzione della U.O.C. di Microbiologia Virologia e della UOC di Biochimica Clinica dell'Azienda Ospedaliera dei Colli chiede la pubblicazione sul sito aziendale di un bando finalizzato a verificare la manifestazione di intenti da parte delle aziende del settore della diagnostica di Laboratorio a contribuire singolarmente o in associazione alla realizzazione di uno o più progetti di seguito descritti mediante contributo volontario

Progetto N.1

Descrizione Progetto:

"Valutazione sistema diagnostico Quantiferon TB Plus"

Valutazione del sistema diagnostico Quantiferon TB Plus nei soggetti con tubercolosi latente. Scopo del lavoro è testare il Quantiferon-Plus in pazienti con basso e alto rischio di sviluppare la malattia afferenti all'ambulatorio dell'Ospedale Cotugno e dell'Ospedale Monaldi, con l'obiettivo di discriminare i pazienti con diversa risposta ai linfociti CD4+ e CD8+, confrontare i risultati con i dati clinici e verificare se effettivamente pazienti che producono più IFN- γ da parte dei linfociti T suppressor rispetto ai linfociti T helper svilupperanno la malattia tubercolare. Gli IGRA possono essere utilizzati in tutte le situazioni in cui si usa il TST, ma trovano particolare indicazione nei seguenti casi:

- Aumentato rischio di progressione a TB attiva in soggetti immunodepressi noti o presunti;
- Operatori Sanitari ad alto rischio di infezione perché:
 - a stretto contatto con pazienti bacilliferi o con materiali biologici ad alto rischio (laboratoristi);
 - esposti senza protezione a pazienti con TB bacillifera, prima della diagnosi;
- Soggetti vaccinati con BCG;
- Sospetta infezione da NTM;
- Soggetti clinicamente dubbi, ma negativi al TST;
- Soggetti esposti con TST positivo noto;
- Pregressa reazione avversa al TST.

I test IGRA nondiscriminano tra infezione latente e tubercolosi attiva, pertanto è necessario mettere in atto tutti i sistemi diagnostici validi, per escludere che il paziente abbia una malattia tubercolare in atto.

Il test QFT-Plus utilizza due provette di antigene TB distinte: la provetta con antigene TB1 (TB1) e la provetta con antigene TB2 (TB2). Entrambe contengono gli antigeni peptidici ottenuti dagli antigeni associati al complesso MTB: ESAT-6 e

CFP-10. Tuttavia, mentre la provetta TB1 contiene i peptidi ottenuti da ESAT-6 e CFP-10 formulati in modo tale da indurre le risposte immuni cellulo-mediate (CMI)

dai linfociti T helper CD4+, la provetta TB2 contiene un ulteriore gruppo di peptidi il cui scopo è indurre le risposte CMI dai linfociti T citotossici CD8+. Nella storia naturale dell'infezione da micobatteri tubercolari, i linfociti T CD4+ svolgono un ruolo centrale ai fini del controllo immunologico, attraverso la secrezione della citochina IFN- γ . Le prove fin qui raccolte dimostrano che i linfociti T CD8+ svolgono un ruolo nella difesa dell'ospite contro i micobatteri tubercolari, attraverso la produzione dell'IFN- γ e di altri fattori solubili che attivano i macrofagi per sopprimere la crescita dei micobatteri tubercolari, uccidere le cellule infettate o lisare direttamente i micobatteri intracellulari. La presenza dei linfociti T CD8+ specifici per

MTB è stata riscontrata nei soggetti con tubercolosi latente e con tubercolosi attiva, condizioni in cui i linfociti T CD8+ che producono IFN- γ possono essere trovati spesso. Inoltre i linfociti T CD8+ specifici per ESAT-6 e CFP-10 sono stati riscontrati con maggiore frequenza nei soggetti con tubercolosi attiva rispetto ai soggetti con tubercolosi latente e ciò suggerisce una possibile associazione con un'esposizione recente a MTB. In più i linfociti T CD8+ specifici per MTB che producono IFN- γ sono stati rilevati anche nei soggetti con tubercolosi attiva e co-infezione da HIV e nei bambini affetti da tubercolosi (6).

- Durata del progetto: 12 mesi

- Risorse da impiegare

- Un dirigente con laurea magistrale in Scienze Biologiche e/o Biotecnologia con dimostrata formazione nel campo dell'utilizzo della diagnostica della infezione e della malattia tubercolare.

- Risultati

Al termine verrà fornita una puntuale e dettagliata relazione circa i risultati raggiunti con verifica degli obiettivi analitici proposti.

Impegno di spesa per le ore di lavoro necessarie alla realizzazione del progetto è valutato

in € 5000,00

Progetto N.2

Descrizione Progetto:

“Risk patient management in Laboratorio Analisi”

Realizzazione di un sistema dedicato capace di rilevare errori durante lo svolgimento delle attività di diagnostica di laboratorio per la gestione del rischio clinico. La sicurezza dei pazienti è uno dei fattori determinanti la qualità delle cure e pertanto è uno degli obiettivi prioritari che le strutture ospedaliere si

pongono. Tale elemento si colloca nella prospettiva di un complessivo miglioramento della qualità e dipende dall'interazioni di molteplici componenti ma alla base di tale processo è fondamentale la responsabilità di tutte le figure professionali che operano in sanità. La normativa nazionale e le disposizioni regionali richiedono alle strutture sanitarie la presenza di unità operative, di funzioni o di una posizione organizzativa (il *risk manager*) dedicate alla gestione del rischio di danni al paziente. La tutela della salute e la sicurezza del paziente vanno contestualizzate nella fase che stanno vivendo il sistema sanitario italiano e i sistemi sanitari regionali. Il tema del contenimento della spesa, la necessità del *buon uso* delle risorse e la ricerca delle possibili modalità di allocazione sono dominanti. Lo scopo di ogni azienda ospedaliera è la scelta dei criteri di allocazione delle risorse e come aumentare la produzione dei servizi senza aumentare le risorse disponibili mantenendo costante e appropriato il livello di qualità dei servizi e di sicurezza del paziente,. Tutto questo vale per i laboratori di analisi della A.O i quali oggi sono sotto pressione da differenti direzioni. Attualmente il laboratorio adotta una strategia di controllo basata sull'EQCP, (Equivalent Quality Control Plan) basata sull'uso di controlli di terza parte, software gestionale della qualità interfacciato ai sistemi analitici, partecipazione ad un gruppo di confronto mondiale continuo, tutto fornito dalla Bio-Rad Laboratories. Lo scopo del presente progetto è quello di effettuare un passaggio graduale della qualità del laboratorio basata sull'EQCP ad una strategia di IQCP (Individualized Quality control Plan) come suggerito dalle nuove normative ISO 9001:2015, EP23-A, ISO 9001:15189. Per attuare questo progetto sarà utilizzato un software volto a ridefinire i programmi di controllo di qualità con l'obiettivo di misurare la capacità di rilevare errori e progettare strategie individualizzate per la gestione del rischio clinico.

- Durata del progetto: 4 mesi

Il raggiungimento di questo obiettivo porterebbe ad una organizzazione ed uno standard della qualità per il laboratorio dell'AO Monaldi all'avanguardia e unica in regione Campania, anticipando notevolmente quello che diventerà nei prossimi anni lo standard richiesto dalle società di accreditamento e dalle nuove normative regionali.

-Risorse da impiegare:

- Software dedicato già in uso nel laboratorio per la valutazione del *risk management*
- Un dirigente con laurea magistrale in Scienze Biologiche e/o Biotecnologia con dimostrata formazione nel campo dell'utilizzo dei sistemi informatici applicati alla gestione della qualità in medicina di laboratorio

-Risultati

Al termine verrà fornita una puntuale e dettagliata relazione circa i risultati raggiunti con verifica degli obiettivi analitici proposti.

Impegno di spesa per le ore di lavoro necessarie alla realizzazione del progetto è valutato

in € 2500,00

Progetto N.3

“Virus dell'epatite C genotipizzazione con tecnica Real-Time Revers Transcription-Polymerase Chain Reaction ”

Descrizione del progetto:

Il progetto è destinato a valutare nuove tecniche in real time per la determinazione del genotipo HCV. I motivi per cui si vuole affrontare lo studio sono legati alla rilevanza che tale progetto ha per l'attività diagnostica legata alle patologie trattate nel nostro Ospedale.

L'infezione causata dal virus C ha raggiunto proporzioni epidemiche, annualmente sono riportati un milione di nuovi casi. Recentemente sono state introdotte terapie con nuovi farmaci (DAA), idonei a contrastare il progredire della patologia associata ad infezione HCV. La formulazione di queste nuove terapie tiene principalmente conto del genotipo di HCV. E' pertanto fondamentale avere la disponibilità di sistemi di genotipizzazione rapidi e sensibili.

- **obiettivi specifici del progetto:** L'obiettivo è di valutare le performance di una possibile nuova tecnica attraverso l'esecuzione di almeno 1000 campioni. La tecnica proposta deve essere basata sulla preparazione automatizzata dei campioni (estrazione e purificazione degli acidi nucleici), seguita da amplificazione e rivelazione mediante Real-Time RT-PCR. Il test deve essere basato sull'analisi delle regioni 5'UTR, Core e NS5B.

Tali osservazioni saranno fatte valutando in particolare il grado di semplicità del test e il suo inserimento nella routine del laboratorio. Inoltre sarà valutata la sensibilità del test in particolare verificando la capacità di genotipizzare le basse cariche virali e la specificità con particolare riguardo alla determinazione della frequenza di riscontro di campioni non genotipizzabili con il metodo oggetto di studio. Tali campioni saranno caratterizzati mediante sequenziamento con il metodo Sanger con metodica in house.

- **durata del progetto: due (2) anni**
- **Risultati** Al termine verrà fornita una puntuale e dettagliata relazione circa i risultati raggiunti con verifica degli obiettivi analitici proposti.
- **Risorse da impiegare** Un dirigente con laurea magistrale in Scienze Biologiche e/o Biotecnologia con dimostrata formazione nel campo dell'utilizzo dei sistemi di diagnostica molecolare
- **Impegno economico presunto per la realizzazione del progetto € 20 000 / 2 anni**

Progetto N. 4

“Realizzazione di un sistema informatico per il monitoraggio e la gestione del TAT dei campioni biologici pervenuti in urgenza nel laboratorio di Biochimica Clinica”

Descrizione del Progetto

Quattro fattori laboratoristici sono determinanti nella gestione delle urgenze: qualità, tempestività, appropriatezza ed efficacia e devono trovare perentorio riscontro nel processo di laboratorio. La maggior parte degli esami eseguiti in laboratorio rientra nella categoria della routine. La differenziazione tra esami di routine e d'urgenza non rappresenta una dissertazione inutile o una esercitazione puramente accademica, ma riveste un valore assolutamente pratico; risulta importante definire e limitare le prestazioni diagnostiche urgenti perché questo permette di ridurre il TAT trasformandolo in STAT e consente il rapido intervento clinico nei casi di vero rischio per il paziente. Inoltre semplifica l'impegno organizzativo inappropriato della struttura e riduce l'elevato carico economico previsto per questa tipologia di prestazioni. Presso il Laboratorio di Biochimica Clinica dell'Azienda Ospedaliera Dei Colli il numero di prestazioni effettuate complessivamente è andato crescendo in maniera rilevante negli ultimi anni, sia per l'aumento della richiesta esterna, ma soprattutto per quella interna e in particolare per la tipologia di prestazioni specialistiche ed

urgenti. E' stato necessario, insieme ad un progetto di riorganizzazione complessiva della Diagnostica di Laboratorio, attuare la revisione nel campo dell'utilizzazione delle urgenze.

Questo comportamento ha portato all'organizzazione di laboratorio notevoli problematiche, tra cui le più rilevanti erano:

1. l'impossibilità di identificare le vere emergenze/urgenze
2. la difficoltà di avere tempi di risposta coerenti con il grado di emergenza/urgenza
3. la necessità di dedicare risorse specifiche (personale e tecnologie) per questa attività

Le possibili soluzioni per organizzare l'esecuzione delle urgenze in laboratorio sono fondamentalmente due:

- A. Istituzione di un laboratorio d'urgenza autonomo (comprendente il così detto "laboratorio a risposta rapida")
- B. Integrazione delle urgenze nella routine.

Obiettivi del progetto:

Nella realtà della diagnostica della Azienda Ospedaliera Dei Colli, la scelta si è rivolta al superamento della gestione autonoma delle urgenze e si è orientata verso la forma integrata, perché questa consente la drastica riduzione delle risorse utilizzate. Per l'ottimizzazione del sistema di gestione delle urgenze ogni giorno nei giorni feriali, verranno monitorati i campioni accettati in modalità urgente in modo da stabilire i criteri e le regole con cui il cruscotto informatico fornito dalla Azienda che ha realizzato l'automazione del laboratorio potrà gestire i tempi di attesa ed inviare un alert nel momento in cui venga superato il TAT stabilito.

Obiettivi specifici:

- Monitorare le urgenze che entrano nel sistema nelle ore di maggiore afflusso di campioni in laboratorio;
- Valutare se i tempi di produzione del referto sono soddisfacenti per la pratica dei reparti;
- Individuare quali sono i punti di criticità nella gestione delle urgenze;
- Trovare delle soluzioni per una migliore gestione del campione in urgenza al fine di ridurre i tempi di produzione del referto;
- Fornire alla Azienda che ha in gestione l'automazione del nostro nosocomio dati che gli permettano di risolvere criticità del sistema.

Il software informatico (Jaspersoft), una volta identificate le regole ed identificati gli elementi di informazione necessari per un corretto funzionamento, permetterà in tempo reale di seguire l'andamento di tutti i campioni che effettuano il loro ingresso in laboratorio tramite il sistema automatizzato in modo tale che gli operatori potranno avere una percezione continua e reale del flusso di campioni. In particolar modo il sistema sarà capace di discriminare i campioni accettati in urgenza dalla routine per avviarli ad una rapida validazione, utilizzando istogrammi di semplice comprensione per un monitoraggio dell'andamento del ciclo lavorativo chiaro.

- **durata del progetto: due (2) anni**
- **Risultati** Al termine verrà fornita una puntuale e dettagliata relazione circa i risultati raggiunti con verifica degli obiettivi analitici proposti.

- **Risorse da impiegare** N. 2 dirigenti con laurea magistrale in Scienze Biologiche e/o Biotecnologia con dimostrata formazione nel campo dell'utilizzo dei sistemi Informatici
- **Impegno economico presunto per la realizzazione del progetto € 15 000/ anno**

Progetto N.5

Progetto: Valutazione della presenza di mutazioni rare dell'Alfa 1 antitripsina in pazienti con patologie polmonari o epatiche idiopatiche non allele S o Z dipendenti.

Introduzione

Descrizione del Progetto

Il deficit di alfa1-antitripsina (AATD) è considerata una patologia genetica rara, avendo in Europa una prevalenza di 1/5000 abitanti, ma è ampiamente sotto-diagnosticata. È un disordine autosomico co-dominante per il quale sono stati identificati più di 100 alleli. Le principali manifestazioni cliniche del deficit di alfa 1-antitripsina sono prevalentemente polmonari (enfisema, bronchite cronica, iperreattività bronchiale, bronchiectasie) ed epatiche (epatite cronica, cirrosi, carcinoma epatico), più raramente dermatologiche o vasculitiche. L'α1-antitripsina (AAT) è una glicoproteina monomerica che appartiene alla famiglia delle Serpine (SERine Protease INhibitors). Essendo una serpina, l'AAT inibisce una serie di serina-proteasi, ma il bersaglio principale è l'elastasi neutrofila (NE), un enzima rilasciato dai neutrofili responsabile della proteolisi di molti componenti della matrice extracellulare, tra cui l'elastina. Quando i neutrofili vengono attivati, l'elastasi neutrofila viene rilasciata nel tessuto polmonare, dove, se non inibita, svolge l'azione proteolitica. Le concentrazioni plasmatiche fisiologiche di AAT (100-200 mg/dL) sono sufficienti per proteggere i polmoni dall'attacco di NE, grazie all'interazione tra i siti attivi delle due proteine che ne determina l'inattivazione (interazione suicida). La patogenesi del AATD è direttamente correlata alle mutazioni del gene SERPINA1, che è altamente polimorfico. Sono state infatti identificate più di 120 varianti genetiche strettamente associate a specifiche concentrazioni plasmatiche della proteina che vengono così ereditate in maniera codominante. La deficienza genetica di alfa1-antitripsina rappresenta un prototipo per le malattie che sono associate con alterazioni delle varie serpine, chiamate collettivamente come serpinopatie, nelle quali l'aspetto prominente è la deficienza della serpina nel sangue, ma il difetto sottostante è la loro instabilità conformazionale (cioè della forma).

Sono state riconosciute due mutazioni principali dell'alfa1-antitripsina, cui consegue una parziale deficienza dell'inibitore. La più comune delle due è la mutazione S (Glu264Val), che negli omozigoti porta a una riduzione del 40% della concentrazione plasmatica della alfa1-antitripsina. Questa mutazione di per se stessa non avrebbe grosse conseguenze per la salute, ma diviene importante se insieme a essa viene ereditata anche la più grave mutazione Z (Glu342Lis). Circa il 4% degli abitanti del nord Europa (e circa il 3% negli Stati Uniti) possiede la mutazione Z; negli omozigoti si verifica una perdita dell'85% dei livelli di alfa1-antitripsina nel plasma. Di conseguenza le concentrazioni plasmatiche di alfa1-antitripsina negli omozigoti ZZ o nei doppi eterozigoti SZ sono insufficienti per assicurare una protezione per tutta la vita, a livello del polmone, dai danni proteolitici, specialmente nei soggetti fumatori.

Le basse concentrazioni di alfa1-antitripsina non derivano da una mancata sintesi della variante della alfa1-antitripsina, quanto da un blocco della sua trasformazione e della sua secrezione. Gli aggregati di alfa1-antitripsina, trattenuti nel reticolo endoplasmico degli epatociti, come inclusioni, vengono facilmente riconosciuti con la colorazione acido periodico-Schiff. Le mutazioni responsabili dell'instabilità molecolare portano all'apertura della molecola che inserendosi rapidamente sulla superficie della successiva molecola, determina la formazione di lunghi polimeri di alfa1-antitripsina Z inattivi. Questi polimeri sono resistenti ai normali processi degradativi del reticolo endoplasmatico, perché le singole molecole mantengono la loro struttura e quindi non sono capaci di elicitare il legame dello chaperon necessario per attivare la

degradazione. Ne risulta un accumulo intracellulare progressivo di alfa1-antitripsina aberrante con conseguente danno epatico. La variabilità nella gravità della malattia epatica e nell'età alla quale essa inizia può essere in parte spiegata anche dalla variabilità individuale nella frequenza degli episodi d'infiammazione, che portano a un aumento della sintesi di alfa1-antitripsina. Va ricordato infatti che l'alfa1-antitripsina è una proteina della fase acuta, che aumenta di molte volte in occasione degli episodi infiammatori.

Punto importante è risultato essere la distribuzione geografica delle varianti dell'AAT. È noto che la prevalenza del gene PI * Z in Europa è maggiore nei paesi del nordovest, con un gradiente decrescente verso il sud-est. Questo gradiente è stato rispettato in Italia, dove la maggior parte degli individui PI * ZZ sono stati trovati nelle aree del nord. Molto più omogenea è invece la distribuzione geografica delle cosiddette varianti rare, RR, nel resto della penisola con una notevole varietà di mutazioni identificate e spesso regione specifiche (picco di presenze in regione come la Sardegna, con prevalenza PI * ZZ inferiore). In particolare, come riportato nel Registro Italiano per la Carenza Severa di alfa1-antitripsina (1996-2013), nelle regioni Italiane del centro-sud sono state riscontrate le varianti rare Mprocida, Mpalermo, M(Malton)/(Cagliari), Q0isola di procida, Q0trastevere con una maggiore prevalenza delle Mmalton e Mprocida la cui diffusione supera quella della variante Z.

Obiettivi specifici

Scopo del lavoro è la ricerca della presenza di mutazioni rare dell'Alfa 1 antitripsina in pazienti con patologie polmonari o epatiche idiopatiche che non possiedono gli alleli S o Z, prestando particolare attenzione alle varianti rare sia per quanto riguarda una più approfondita caratterizzazione molecolare, sia in relazione al fenotipo clinico dei pazienti portatori.

Saranno valutati pazienti dell'Italia centro-meridionale che presentano almeno uno dei seguenti elementi: insorgenza giovanile di BPCO (bronco pneumopatia cronica ostruttiva), anamnesi familiare positiva per BPCO, livelli ridotti di alfa1-globulina all'elettroforesi (coinvolgimento epatico), livelli di AAT nel siero minori di 80 mg/dl o maggiori e uguali a 113mg/dL e genotipo S e Z negativo (con tecnica immunonefelometrica), anamnesi familiare positiva per AATD.

Quindi tutti i campioni verranno genotipizzati sia per escludere le due varianti deficitarie più frequenti (S e Z) sia per evidenziare l'eventuale presenza di varianti rare del gene dell'AAT (con la tecnica della Real Time PCR). Inoltre si considereranno i livelli funzionali delle diverse varianti proteiche.

Conclusioni

L'identificazione delle varianti rare del gene dell'alfa1-antitripsina codificanti proteine aberranti, in pazienti con patologie polmonari ed epatiche di origine sconosciute, diventa importante per poter intervenire precocemente con terapie adatte come la somministrazione di AAT purificata di origine umana (Prolastin®).

- **durata del progetto: 1 anno**
- **Risultati** Al termine verrà fornita una puntuale e dettagliata relazione circa i risultati raggiunti con verifica degli obiettivi analitici proposti.
- **Risorse da impiegare** Un dirigente con laurea magistrale in Scienze Biologiche e/o Biotecnologia con dimostrata formazione nel campo dell'utilizzo dei sistemi di diagnostica molecolare
- **Impegno economico presunto per la realizzazione del progetto € 13 000 / anno**

Dr. Luigi Atripaldi

