

“Shared Resource Laboratory”: consolidamento della diagnostica citofluorimetrica in Area Vasta Romagna

F. Monti^a, M. Rosetti^a, G. Poletti^a, A. Clementoni^a, A. Zucchini^a, D. Conti^a, P. Masperi^b, R.M. Dorizzi^a

^aU.O.C. CoreLab, Laboratorio Unico di Area Vasta Romagna, Pievesestina di Cesena (FC)

^bDirezione Medica, Centro Servizi, Pievesestina di Cesena (FC)

Riassunto

Premesse. Le biotecnologie diagnostiche sono in continua evoluzione e, data la loro potenzialità, necessitano obbligatoriamente di un corretto utilizzo. Il concetto di condividere al meglio ogni risorsa disponibile per le attività di Laboratorio (Shared Resource Laboratory) è il modello organizzativo e gestionale migliore per assicurare una adeguata formazione di personale altamente specializzato e per disporre di strumentazione tecnologica avanzata al fine di garantire la migliore qualità assistenziale.

Materiali e metodi. Il Laboratorio Unico di Area Vasta Romagna (AVR) è il laboratorio di riferimento subregionale per un bacino di utenza di circa un milione di abitanti.

Nel 2009 la diagnostica citofluorimetrica delle immunodeficienze e delle patologie polmonari delle quattro AUSL Romagnole è stata consolidata. Nel primo trimestre di attività Maggio-Luglio 2009 sono stati analizzati 3338 campioni con ri-

chiesta di analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie (3114 su sangue periferico e 224 su lavaggio bronchiolo alveolare). Tutti i campioni sono stati analizzati con citofluorimetri Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Risultati. Nel periodo preso in esame, il consolidamento della diagnostica ha portato ad un risparmio di 9200 euro nell'acquisizione di anticorpi monoclonali per le analisi eseguite sul sangue periferico e di 3288 euro per le analisi eseguite sui liquidi di lavaggio bronchiolo-alveolare. Il numero dei citofluorimetri è stato ridotto a due rispetto ai sei utilizzati prima della centralizzazione delle analisi con un risparmio in termini di noleggio e manutenzione di 63382 euro.

Conclusioni. Il consolidamento delle attività citofluorimetriche e il conseguente risparmio in termini di spesa per reagenti e strumentazioni, confermano l'efficienza di questo modello organizzativo nei servizi di Medicina di Laboratorio.

Summary

“Shared Resource Laboratory” consolidation of cytofluorimetric diagnostics in Area Vasta Romagna

Background. In the recent years diagnostic biotechnology rapidly evolved and today includes an increasingly sophisticated and complex approach. This required the development of the so called “Shared Resource Laboratory (SRL)”, a “core” laboratory equipped with highly skilled operators and advanced instrumentation in order to enhance the scope and the quality of the laboratory services.

Materials and methods. Central Laboratory of Area Va-

sta Romagna is a subregional reference laboratory providing diagnostic activity for an area with about one million inhabitants. In the present study we describe the results of the consolidation of 4 local Flow cytometry laboratories dealing with immunodeficiencies and lung diseases.

In the first trimester of activity (May-July 2009), 3338 samples have been assayed: 3114 tests for lymphocyte subpopulations in blood and 224 samples in bronchoalveolar lavage fluid (BALf). The assays have been carried out using Cytomics FC 500 cytofluorimeters (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Results. In the investigated trimester we saved 9200 eu-

ros for the monoclonal antibodies required for the testing in blood and 3288 euros for the testing in BALf. The total number of flow cytometry instruments have been reduced from six to two saving 63382 euro.

Conclusions. The consolidation of the cytofluorimetric

testing caused saving in reagents and analyzer rentals confirming the efficiency of the proposed model in diagnostic laboratory service.

Key-words: shared resource laboratory, flow cytometry, immunodeficiency, bronchoalveolar lavage fluid.

Introduzione

L'evoluzione della ricerca biomedica e l'aggiornamento tecnologico avvenuti nell'ultimo decennio, sta radicalmente modificando la struttura organizzativa dei servizi di Medicina di Laboratorio¹.

La realizzazione dello "Shared Resource Laboratory", ossia condivisione di risorse per l'acquisizione della strumentazione più moderna e la formazione di personale altamente specializzato, è il miglior modo per assicurare la qualità delle analisi di alta specializzazione e bassa richiesta e per ridurre i costi²⁻⁴.

La citofluorimetria rappresenta attualmente una delle più complesse tecnologie utilizzate per la diagnostica di laboratorio ed è caratterizzata da livelli analitici diversi: controlli strumentali, disegno e scelta degli anticorpi monoclonali da utilizzare, correzione manuale dei dati in fase di acquisizione, analisi ed interpretazione dei dati, interazione con i medici richiedenti⁵.

Considerata l'elevata spesa dei reagenti e delle strumentazioni citofluorimetriche, molte istituzioni hanno deciso di attuare anche per questa tipologia analitica il concetto di "Shared Resource Laboratory". Nel presente studio sono presentati i risultati della centralizzazione in un'unica sede, il Laboratorio Unico di Area Vasta Romagna, delle analisi citofluorimetriche per le immunodeficienze e per le patologie polmonari dell'intera Romagna.

Materiali e Metodi

Nel primo trimestre di attività (maggio-luglio 2009) sono stati analizzati i campioni provenienti da un totale di 3338 pazienti suddivisi in 3114 con richiesta di analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni linfocitarie su sangue periferico, 224 con richiesta delle sottopopolazioni linfocitarie su liquido di lavaggio bronchiolo alveolare (BAL).

Il primo gruppo di pazienti comprendeva pazienti sieropositivi per HIV, pazienti con sospetto di HIV non confermato dal laboratorio e pazienti con linfocitosi. La sicurezza degli operatori durante la fase analitica, la standardizzazione delle fasi di preparazione dei campioni e la riproducibilità metodologica sono state garantite dall'utilizzo dei preparatori TQ-PREP e PREP-PLUS III (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

Le analisi sono state effettuate mediante l'utilizzo delle miscele anticorpali preconfezionate CYTO-STAT / tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (cod.6607013 Beckman Coulter,

Fullerton, USA) e CYTO-STAT / tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (cod.6607073 Beckman Coulter).

Il secondo gruppo comprendeva pazienti con patologie polmonari; la sicurezza degli operatori e la standardizzazione delle fasi di preparazione dei campioni sono state eseguite secondo l'istruzione operativa elaborata e validata nel settore di citofluorimetria del Laboratorio Unico di AVR.

Le analisi sono state effettuate mediante l'utilizzo di un pannello di 2 provette contenenti singoli monoclonali dispensati manualmente (provetta 1: CD4-FITC, CD8-RD1, CD45-ECD, CD19-PC5, CD3-PC7; provetta 2 : HLA-DR-FITC, CD16-RD1, CD45-ECD, CD3-PC7).

I preparati citologici sono stati ottenuti tramite lavaggio e filtrazione del materiale sotto cappa chimica, successiva citocentrifugazione e colorazione May-Grünwald-Giemsa eseguite con citocentrifuga (Delcon, Arcore, Milano, Italia). La lettura citologica è stata effettuata con microscopio Olympus BX51 (Tokyo, Japan) valutando la conta differenziale percentuale di neutrofili, eosinofili, macrofagi e linfociti presenti in almeno 500 cellule rappresentative del campione.

Per ogni campione si rilevava, inoltre, l'eventuale presenza di altri elementi flogistici, cellule neoplastiche ed agenti infettivi.

Tutti i campioni sono stati analizzati con citofluorimetri Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA)⁶.

Risultati

Le analisi descritte sono state eseguite presso il Laboratorio Unico di Area Vasta Romagna di Pievesestina (Laboratorio Unico AVR) e hanno riguardato i pazienti ambulatoriali e ricoverati presso i presidi ospedalieri delle quattro AUSL della Romagna: Cesena, Forlì, Ravenna (ospedali di Ravenna, Lugo e Faenza), Rimini (ospedali di Rimini, Riccione e Cattolica). Non sono oggetto del presente studio le attività centralizzate relative alla diagnostica oncoematologica e al trapianto autologo di cellule staminali.

Prima del consolidamento in sede unica erano presenti tre diverse modalità di richiesta e di refertazione degli esami relativi alla tipizzazione linfocitaria di sangue periferico e due diverse modalità di richiesta e di refertazione degli esami relativi alla diagnostica dei BAL. Al momento della centralizzazione delle attività i diri-

genti del laboratorio ed i clinici richiedenti hanno concordato istruzioni operative relative a modalità di invio del materiale, processo analitico e refertazione unica per tutte le 4 AUSL di AVR.

Tipizzazioni Linfocitarie su Sangue Periferico

I logigramma diagnostico-operativi concordati ed adottati sono stati i seguenti:

- 1) pazienti senza documentata infezione da HIV, determinazione dei linfociti T CD3+, CD4+ e CD8+, dei linfociti B CD19+ e delle cellule natural killer CD3-CD16+CD56+ (analisi attivabile informaticamente con la richiesta di “tipizzazione linfocitaria”);
- 2) monitoraggio di laboratorio dei pazienti con infezione da HIV documentata, determinazione dei linfociti T CD3+, CD4+ e CD8+ (analisi attivabile informaticamente con la richiesta di “tipizzazione linfocitaria CD4”).

La refertazione della Tipizzazione Linfocitaria ha previsto i valori percentuali ed assoluti di tutte le sottopopolazioni linfocitarie (linfociti T totali CD3+, linfociti T CD4+, linfociti T CD8+, linfociti B CD19+, linfociti natural killer CD16+CD56+CD3-) calcolati in doppia piattaforma e del rapporto percentuale linfocitario CD4/CD8.

La refertazione della tipizzazione linfocitaria CD4 ha previsto i valori percentuali ed assoluti dei linfociti T totali CD3+, dei linfociti T CD4+ e dei linfociti T CD8+ calcolati in doppia piattaforma e del rapporto linfocitario percentuale CD4/CD8. Quest’ultima combinazione di monoclonali e relativa refertazione è stata adottata d’intesa con i colleghi infettivologi che richiedevano, oltre alla refertazione del valore percentuale ed assoluto dei linfociti CD4, anche quella del rapporto percentuale linfocitario CD4/CD8 e dei valori assolu-

ti e percentuali dei linfociti T CD3 e CD8.

La Figura 1 illustra l’andamento delle richieste di tipizzazioni linfocitarie e di tipizzazioni CD4 del primo trimestre di attività del Laboratorio Unico AVR; le analisi effettuate sono state suddivise per AUSL di provenienza.

Considerato il periodo analizzato, si evidenzia che le modalità informatiche di richiesta e di refertazione uniche concordate nel mese di Maggio sono state rese operative nel mese di Giugno e sono entrate a regime in tutte le quattro AUSL nel mese di Luglio 2009. Analizzando le attività svolte in quest’ultimo mese, il numero delle richieste per tipizzazione CD4 è risultato sempre maggiore rispetto alle tipizzazioni linfocitarie, indipendentemente dall’AUSL di provenienza.

La Figura 2 evidenzia l’analisi dei costi relativa alla spesa teorica dei monoclonali prevista senza la introduzione del test “tipizzazione linfocitaria CD4” e la spesa del reale consumo dei monoclonali sostenuta dopo la sua attivazione per tutti i casi provenienti dalle quattro AUSL della Romagna. La suddetta analisi si riferisce al costo dei monoclonali quotati secondo il corrente capitolato di spesa di AVR.

Tipizzazione Linfocitaria su Lavaggio Bronchiolo Alveolare

Il logigramma operativo adottato con il consolidamento delle attività ha previsto la preventiva analisi citologica dei campioni per tutti i casi provenienti dalle quattro AUSL della Romagna.

Un valore uguale o superiore al 10% di linfociti individuati all’analisi microscopica è stato adottato in generale come condizione necessaria per l’approfondimento diagnostico tramite analisi citofluorimetrica, indipendentemente dalla cellularità totale assoluta⁷⁻⁹; nel caso di esplicita richiesta di diagnostica oncoematolo-

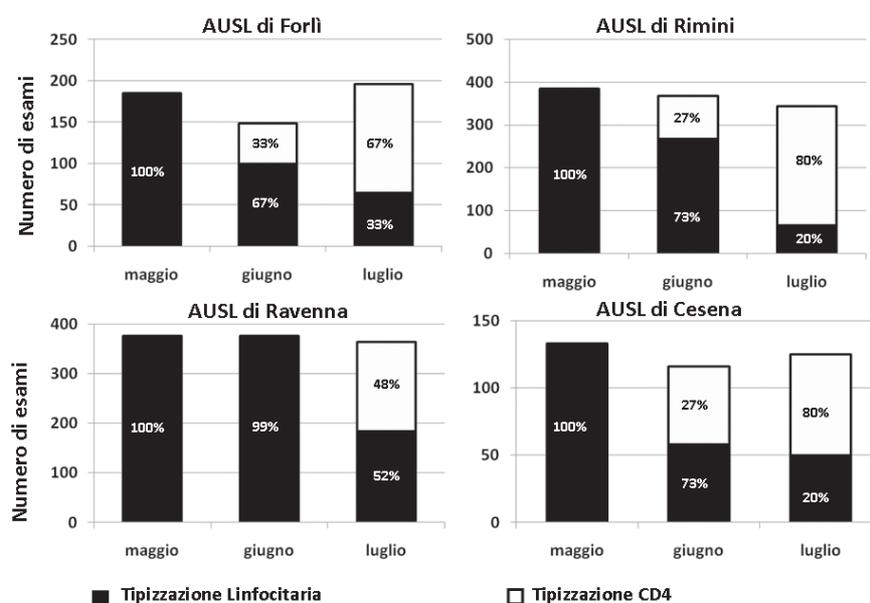


Figura 1. Tipizzazioni linfocitarie di sangue periferico richieste dalle quattro AUSL di Area Vasta Romagna.

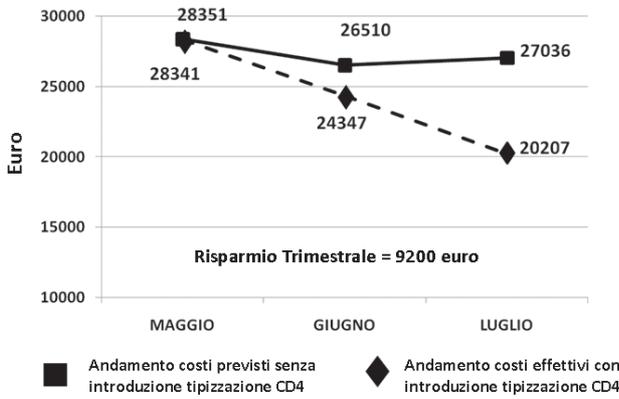


Figura 2. Tipizzazione linfocitaria di sangue periferico: analisi dei costi relativi alla spesa per gli anticorpi monoclonali.

gica, la relativa analisi citologica orientava la scelta di ulteriori anticorpi specifici.

Nel primo trimestre di attività sono stati analizzati 224 campioni; la Figura 3 riporta le prestazioni effettuate divise per singola azienda.

Analizzando tutti i campioni tramite esame morfologico è risultato che 125 campioni (56%) avevano una quota di linfociti < al 10%, 99 casi (44%) una quota di linfociti ≥ al 10%. L'analisi citofluorimetrica eseguita in quest'ultimo gruppo di pazienti è risultata valutabile in 92 casi (93%) e non valutabile in 7 casi (7%) (Fig. 4).

Nella Figura 5, sono confrontati i costi relativi agli anticorpi monoclonali previsti senza la selezione dell'esame citologico e quelli sostenuti con il nuovo logigramma operativo adottato per tutti i casi provenienti dalle quattro AUSL.

Le analisi descritte sono state eseguite presso il Laboratorio Unico di AVR con due citofluorimetri FC500 di ultima generazione allineati quotidianamente con controllo di qualità interno e, periodicamente, tramite verifica esterna di qualità (DigitalPT VEQ 2009, Azienda Ospedaliera Bologna). La disponibilità di due citofluorimetri ha consentito un reciproco back up strumentale in caso di criticità tecnica e di evitare interruzioni dell'attività assistenziale.

Prima del consolidamento delle analisi presso il La-

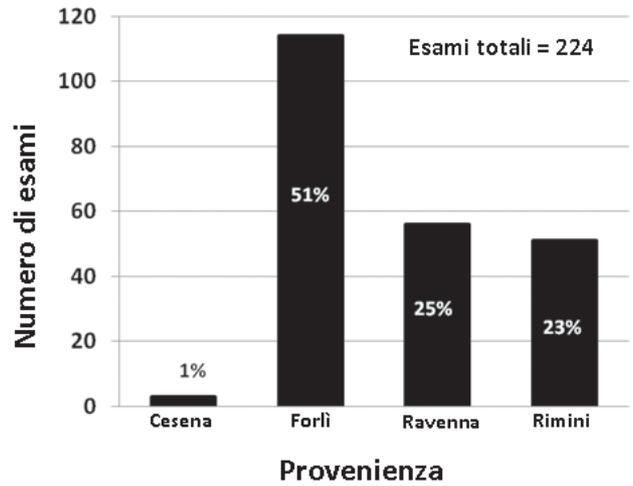


Figura 3. Analisi citofluorimetriche effettuate su Lavaggio Bronchiolo Alveolare (BAL) richieste dalle quattro AUSL di Area Vasta Romagna.

boratorio Unico di AVR, tutte le prestazioni erano garantite da 4 citofluorimetri FC500 di ultima generazione (2 operativi presso l'AUSL di Ravenna, 1 presso l'AUSL di Rimini ed 1 presso l'AUSL di Cesena) e da 2 citofluorimetri EPICS XL di generazione precedente (1 operativo presso l'AUSL di Rimini ed 1 presso l'AUSL di Forlì) per un totale di 6 citofluorimetri presenti in Area Vasta Romagna.

La centralizzazione della diagnostica citofluorimetrica ha comportato un risparmio di spesa in termini di noleggio e contratti di manutenzione. Nel trimestre analizzato la riduzione di 4 unità nel numero delle stazioni citofluorimetriche utilizzate e le nuove condizioni di fornitura su scala di AVR hanno permesso un risparmio 63382 euro.

Discussione

La citofluorimetria rappresenta una branca della Medicina di Laboratorio altamente specialistica ed in continua evoluzione^{10,11}. Considerato l'elevato costo di queste determinazioni e la necessità di personale altamente specializzato e dedicato, modelli organizzativi che realizzano il concetto "Shared Resource Labora-

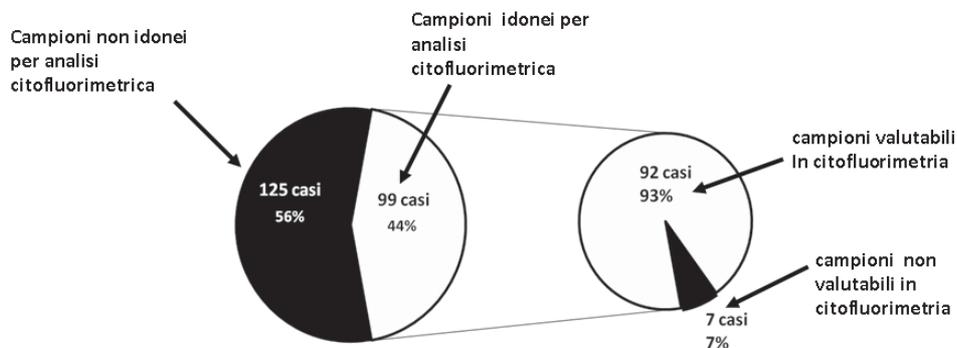


Figura 4. Lavaggio bronchiolo alveolare: idoneità citologica (linfociti ≥ 10%) per la selezione dei casi analizzabili in citofluorimetria.

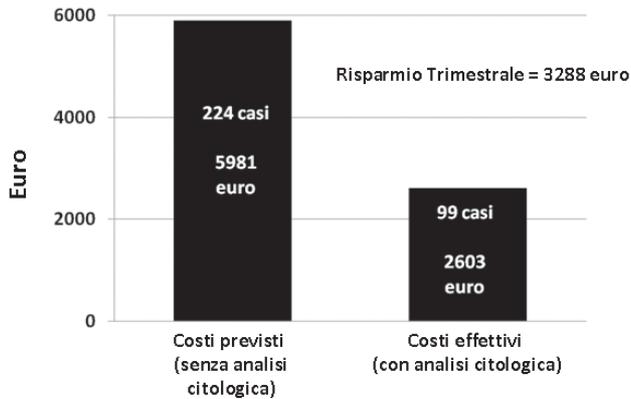


Figura 5. Tipizzazioni linfocitarie su Lavaggio Bronchiolo Alveolare: analisi dei costi relativi alla spesa per gli anticorpi monoclonali.

toro” trovano indicazione quando si impiega questa tecnologia ai fini di ricerca ed assistenziali². Questo approccio prevede la massima condivisione di tutte le risorse disponibili per le attività laboratoristiche in modo da ottimizzare e garantire la migliore qualità assistenziale per uno specifico bacino di utenza.

Le prime esperienze relative a questo modello organizzativo sono avvenute nei servizi di anatomia patologica attraverso la condivisione di supporti informatici e di materiale paraffinato necessari alla diagnosi¹².

Analogo modello è stato adottato e segnalato per le attività di ricerca traslazionale oncologica dove la necessità di competere scientificamente ha portato alla condivisione di strumentazioni sofisticate, formazione di ricercatori qualificati, dotazione dei supporti informatici sempre più adeguati alla complessità delle ricerche svolte¹³.

Il consolidamento delle attività citofluorimetriche, eseguite presso il Laboratorio Unico di Area Vasta Romagna ed il conseguente risparmio relativo alla spesa effettuata in termini di costo reagenti e di strumentazioni, confermano la validità del modello “Shared Resource Laboratory” anche per i servizi di Medicina di Laboratorio. Nella nostra esperienza la costituzione di un pool di specialisti dedicati, costituito da personale dirigente e tecnico in grado di garantire con continuità la qualità della assistenza erogata, conferma ulteriormente l'efficacia operativa di questo modello organizzativo.

Ringraziamenti

Si ringrazia Rimini AIL che finanzia il contratto libe-

ro professionale per lo svolgimento di attività di diagnostica ematologica del Dr. Marco Rosetti.

Bibliografia

1. Kricka LJ, Master SR. Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods. *Mol Biotechnol* 2008; 38:19-31.
2. Moore J, Roederer M. The flow cytometry shared resource laboratory: best practices to assure a high-quality, cost-effective partnership with biomedical research laboratories. *Cytometry A* 2009; 75:643-9.
3. Ogorzalek Loo R, Nicolet CM, Niece RL, Young M, Simpson JT. Association of biomolecular resource facilities survey: service laboratory funding. *J Biomol Tech* 2009; 20:180-5.
4. Knudtson KL, Auer H, Brooks AI, Griffin C, Grills G, Hester S, et al. The ABRF MARG microarray survey 2005: taking the pulse of the microarray field. *J Biomol Tech* 2006; 17:176-86.
5. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A* 2010; 77:410-9.
6. Cytomics FC 500 Manual. Fulleton, CA Beckman Coulter; April 2002.
7. Dauber JH, Wagner M, Brunsvold S, Paradis IL, Ernst LA, Waggoner A. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid: comparison of a two-color technique with a standard immunoperoxidase assay. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 531-41.
8. Ghio P, Martini G, Stacchini A. La gestione del lavaggio broncoalveolare nel laboratorio di citometria a flusso. *Lettere GIC* 2000; 9:75-80.
9. Barry SM, Condez A, Johnson MA, Janossy G. Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease. *Cytometry* 2002; 15:291-7.
10. Alvarez DF, Helm K, Degregori J, Roederer M, Majka S. Publishing flow cytometry data. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298:127-30.
11. Hulspas R, O’Gorman MR, Wood BL, Gratama JW, Sutherland DR. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry* 2009; 76:355-64.
12. Patel AA, Gupta D, Seligson D, Hattab EM, Balis UJ, Ulbright TM, et al.; Shared Pathology Informatics Network. Availability and quality of paraffin blocks identified in pathology archives: a multi-institutional study by the Shared Pathology Informatics Network (SPIN). *BMC Cancer* 2007; 7:37-51.
13. De Paoli P. Institutional shared resources and translational cancer research. *J Transl Med* 2009; 7:54-8.