

## The automation and the traceability of the analytical process in genetics: the Novara experience.

Roberta Rolla<sup>1,2</sup>, Maurizio Sciancalepore<sup>2</sup>, Simona Mellone<sup>2</sup>, Mara Giordano<sup>1,2</sup> and Umberto Dianzani<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Department of Health Sciences, Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont, Novara, Italy.

<sup>2</sup>Clinical Chemistry Laboratory, Maggiore della Carità Hospital, Novara, Italy.



**KEY WORDS:** Genetic tests; automation; traceability.

### BACKGROUND.

Presso S.C.D.U. Laboratorio di Biochimica Clinica, Settore di Genetica e Biologia Molecolare, A.O.U. “Maggiore della carità” di Novara, vengono eseguite analisi genetiche per la diagnosi di: (1) trombofilia ereditaria (mutazione FV Leiden e mutazione gene della protrombina G20210A); (2) emocromatosi (mutazioni gene HFE: C282Y\_H63D\_S65C); (3) emoglobinopatie (analisi geni  $\alpha$  e  $\beta$  globinici: pannello da 22 e 38 mutazioni/delezioni rispettivamente); (4) fibrosi cistica (pannello da 67 mutazioni a carico del gene CFTR); (5) microdelezioni del cromosoma Y; (6) farmacogenetica (analisi polimorfismi geni TPMT e DPD); (7) intolleranza al lattosio. Per tali indagini vengono utilizzate le tecniche di Real Time PCR o Reverse Dot Blot e i kit commerciali della Nucler Laser Medicine s.r.l. Inoltre, il Settore di Genetica e Biologia Molecolare esegue ulteriori indagini mediante Array CGH, sequenziamento Sanger e pannelli di geni in Next Generation Sequencing su numerose patologie genetiche.

Le indagini genetiche per sospetta trombofilia ereditaria ed emocromatosi rappresentano un'alta percentuale dei test genetici richiesti. In particolare, nel 2018 sono stati eseguiti 1500 indagini genetiche per sospetta trombofilia ereditaria e 200 indagini genetiche per sospetta emocromatosi, su un totale di circa 3000 indagini genetiche eseguite nel 2018.

Le indagini genetiche per sospetta trombofilia ereditaria ed emocromatosi vengono eseguite mediante Real Time PCR e prevedono diversi passaggi: estrazione del DNA da campioni di sangue intero, impostazione della PCR, amplificazione e analisi dei risultati.

Le procedure manuali non garantiscono la tracciabilità del campione durante l'intero processo analitico e richiedono l'impiego di personale tecnico dedicato a tempo pieno ed altamente specializzato. Ad oggi, sono disponibili diversi analizzatori per automatizzare la fase di estrazione, mentre pochi sono in grado di garantire l'automazione dell'intero flusso di lavoro, incluso l'invio dei risultati dei test genetici su LIS (Laboratory Information System), con sistema di validazione integrato.

A dicembre 2018 è stata acquisita una nuova strumentazione, OMNIA LH 75 (Masmec Biomed), che, in combinazione ai kits in Real Time PCR della Nuclear Laser Medicine s.r.l. (AA 831/50A, AA 832/50A, AA 1493/50A; NLM) e al software interpretativo "Real Gene" (DO022, NLM) garantisce l'automazione dell'intero processo.

Nel presente lavoro abbiamo pertanto riportato la nostra esperienza di automazione dei test genetici richiesti per sospetta trombofilia ereditaria ed emocromatosi, riferita ai primi 6 mesi del 2019.



## MATERIALI E METODI.

Da gennaio 2019, presso S.C.D.U. Laboratorio di Biochimica Clinica, Settore di Genetica e Biologia Molecolare, dell'A.O.U. "Maggiore della carità" di Novara, per la valutazione delle Trombofilie ereditarie (mutazioni gene Fattore V: FV Leiden, R506Q; mutazione gene della protrombina: G20210A) e per la valutazione delle mutazioni più frequenti che causano l'Emocromatosi ereditaria di tipo I (mutazioni gene HFE: C282Y\_H63D\_S65C) è stata utilizzata la strumentazione OMNIA LH 75 (Masmec Biomed) in combinazione ai kits in Real Time PCR della Nuclear Laser Medicine s.r.l. (AA 831/50A, AA 832/50A, AA 1493/50A; NLM), allo strumento CFX96 Real-Time System (Biorad) e al software interpretativo "Real Gene" (DO022, NLM).

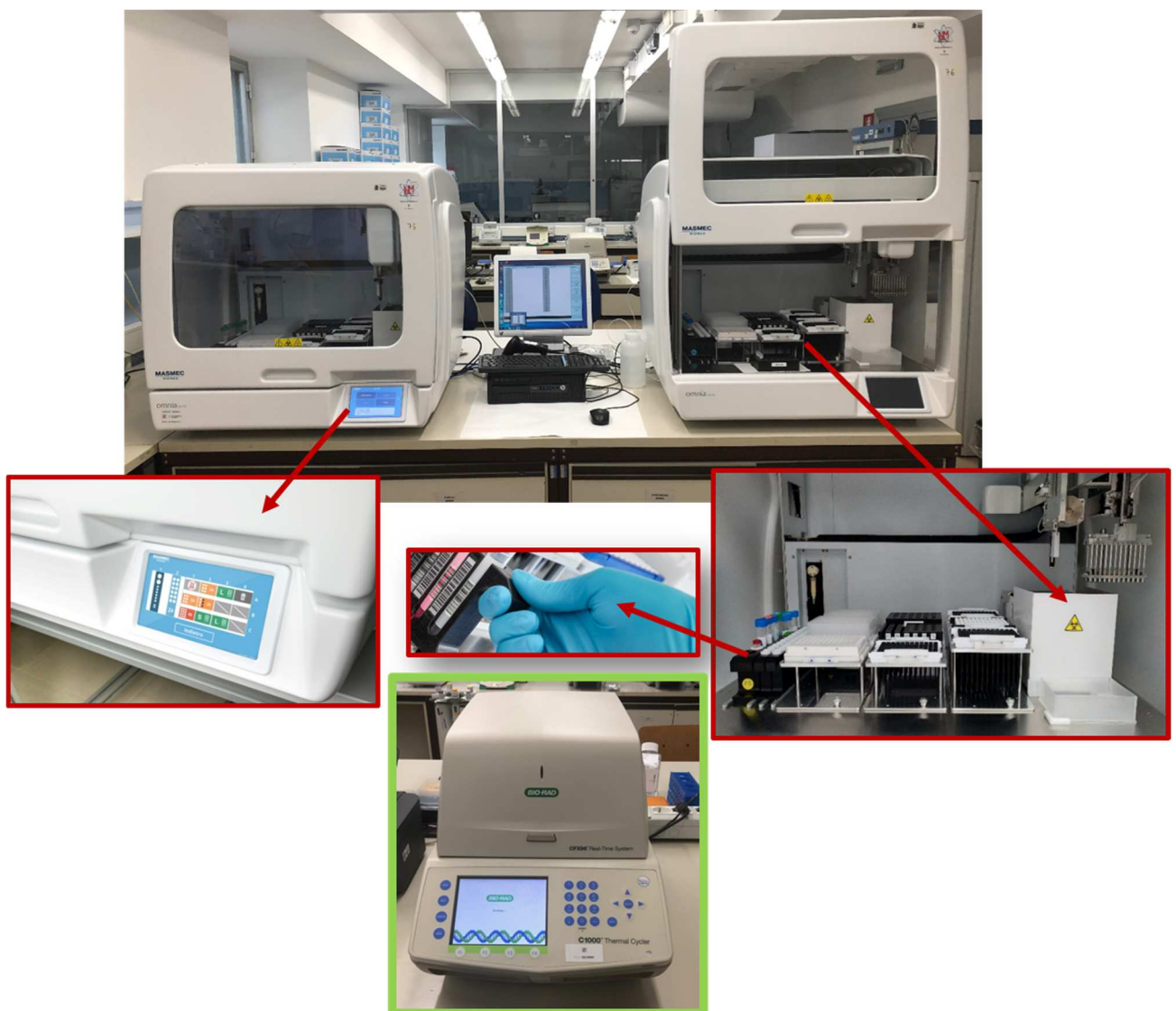


Figura 1. Estrattore OMNIA LH 75 (Masmec Biomed) e CFX96 (BioRad).

## RISULTATI.

Nei primi 6 mesi del 2019 sono stati eseguiti 135 analisi del gene del fattore V, 570 analisi del gene del fattore II e 80 analisi per valutare 3 differenti mutazioni a carico del gene HFE, responsabili dell'Emocromatosi di tipo I (C282Y, H63D e S65C).

Le sessioni analitiche erano di 24 campioni/seduta.

Il tempo\_uomo dedicato dal personale tecnico per la preparazione di ciascuna sessione analitica su OMNIA LH 75 è stato stimato essere pari a 30 minuti, comprensivo di alloggiamento reattivi, puntali con filtro, materiale di consumo dedicato; caricamento campioni; preparazione lista di lavoro; selezione programma PCR. In mezz'ora di lavoro manuale viene organizzato un flusso di lavoro che va dall'estrazione del DNA fino a 24 campioni, all'allestimento in automatico fino a 96 reazioni di PCR, alla preparazione della lista di lavoro e dei profili termici della PCR, grazie all'utilizzo di un software molto semplice ed immediato.

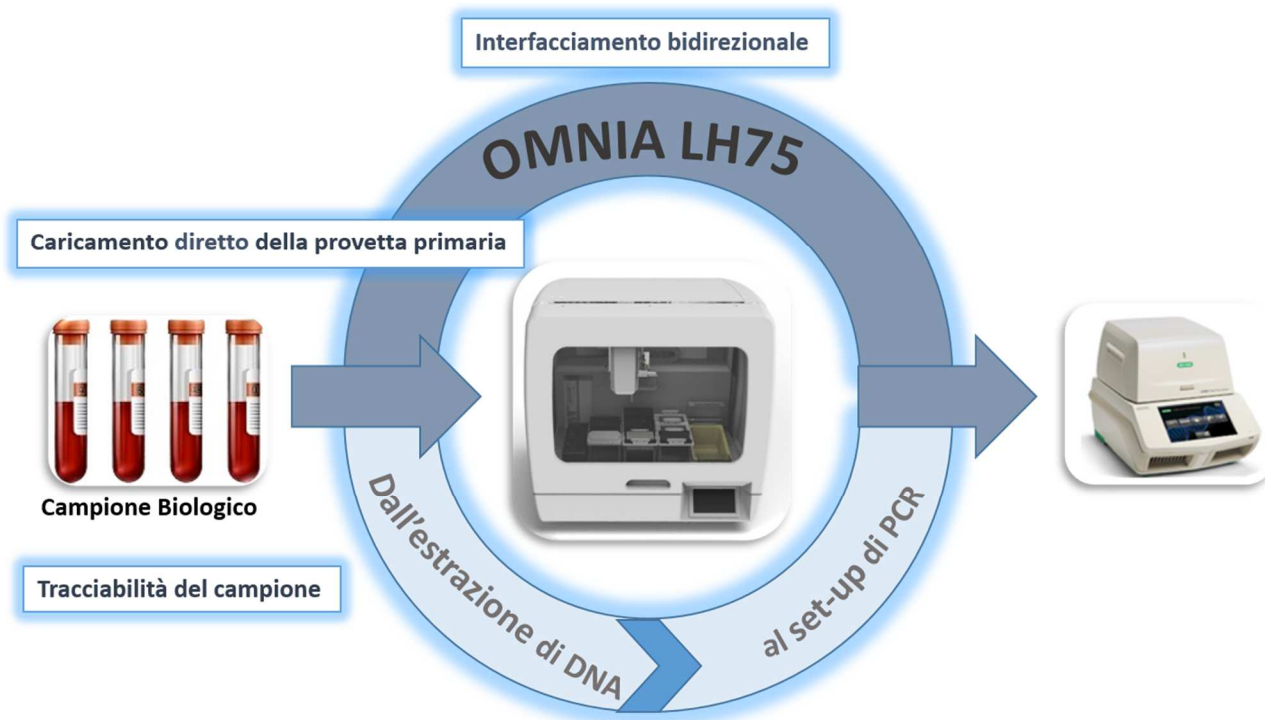


Figura 2. Flusso di lavoro con OMNIA LH 75 (Masmec Biomed).

Nel 2018, il tempo\_uomo necessario per la sola fase di estrazione, utilizzando una strumentazione semiautomatica (estrattore "Maxwell® 16 Clinical Instrument- Maxwell® 16 Blood DNA Purification System) è stato stimato essere pari a 1 ora.

Se invece viene calcolato il tempo\_uomo necessario nel 2018 per l'intero flusso di lavoro in manuale: (1) allestimento fase di estrazione con metodo semi-automatico; (2) preparazione in manuale sotto cappa della mix di reazione PCR per ogni campione analizzato (24 campioni); (3) impostazione manuale della seduta di PCR su termociclatore; il tempo stimato è pari a 2 ore.

## CONCLUSIONI.

Nel Settore di Genetica e Biologia Molecolare, presso S.C.D.U. Laboratorio di Biochimica Clinica, A.O.U. "Maggiore della carità" di Novara, l'impiego di OMNIA LH 75 (Masmec Biomed) in associazione all'utilizzo dei kit della Nuclear Laser Medicine s.r.l. dedicati alla diagnostica della Trombofilia ereditaria e dell'Emocromatosi, ha permesso di automatizzare l'intero flusso di lavoro, riducendo significativamente i tempi dedicati dal personale tecnico di laboratorio per le operazioni manuali.

L'uso di OMNIA LH 75 è estremamente semplice, grazie alla presenza di un'interfaccia guidata e consente di eseguire diversi test in una singola sessione analitica.

Inoltre, grazie all'utilizzo di puntali con filtro, di superfici in acciaio di facile pulizia e alla presenza di lampada UV per la sterilizzazione, garantisce un ottimo sistema di prevenzione delle contaminazioni. La presenza del lettore di codici a barre garantisce invece la tracciabilità dei campioni per l'intero percorso diagnostico e la minimizzazione dell'errore umano.

Infine la connettività dello strumento CFX96 Real-Time System (Biorad) con il LIS di gestione del Laboratorio garantisce la completa automazione del processo, dalla fase preanalitica (preparazione del campione) al momento della validazione del referto finale.

