



Ufficio di Staff Biotecnologie

Centro di referenza nazionale per gli organismi geneticamente modificati (CROGM)

post. 2/E del 05/06/2017

- Alla Responsabile della
Direzione Acquisizione Beni e Servizi
dr.ssa Silvia Pezzotti

- p.c. al Direttore Sanitario
dr. Andrea Leto

Oggetto: trasmissione dei documenti:

- 1) Elenco prodotti infungibili Life Technologies
- 2) Relazione infungibilità prodotti Life Technologies
- 3) Capitolati tecnici per "plasticheria biologia molecolare"

Come da oggetto, si trasmette la documentazione tecnico/scientifica necessaria all'espletamento delle gare per l'acquisizione di beni infungibili "Life Technologies" e per l'acquisizione di beni consumabili in materiale plastico, per l'esecuzione di protocolli di biologia molecolare.

Raniero Lorenzetti



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Ufficio di Staff Biotecnologie

Oggetto: Relazione per acquisto beni infungibili Life Technologies

*l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (di seguito I.Z.S.L.T.) "Mariano Aleandri" "opera di concerto con il Ministero della salute, con le due Regioni di riferimento e a stretto contatto con i servizi veterinari regionali e delle AA.SS.LL, per fornire attività e prestazioni per la tutela della salute dei consumatori, della qualità e della sicurezza alimentare, del benessere animale, della sanità veterinaria. I compiti istituzionali assegnati all'Ente, sia nell'ambito di attività pianificate sia in situazioni di natura emergenziale prevedono, tra l'altro, il controllo e la diagnosi delle malattie infettive degli animali e delle zoonosi (come brucellosi, salmonellosi, rabbia, leishmaniosi, influenza aviaria ecc.), delle tossinfezioni alimentari, delle contaminazioni di natura chimica (diossine, mercurio, residui di antibiotici)" etc. Per l'assolvimento di tali compiti, l'I.Z.S.L.T. considera il sistema qualità "una vera e propria strategia competitiva e parte della missione aziendale" e, conseguentemente, ha organizzato la gestione di tutte le sue attività istituzionali uniformandosi, per quanto attiene le procedure di laboratorio, alle prescrizioni della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, che stabilisce i "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura". La necessità per l'I.Z.S.L.T. di operare in base alle prescrizioni di tale norma è stabilita anche dal Regolamento CE 882/2004 del 29 Aprile del 2004 "relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali", che recita, all'Art.12, par. 2(a): "le autorità competenti possono designare soltanto i **laboratori che operano, sono valutati e accreditati conformemente alla norma europea UNI CEI EN ISO/IEC 17025.** Anche il nuovo Regolamento (UE) 2017/625 sui controlli ufficiali (che si applica a decorrere dal 14 dicembre 2019 in abrogazione del Regolamento CE 882/2004) rafforza tale requisito all'art. 37, par. 4 (e), estendendone l'applicazione a tutte le prove utilizzate nell'ambito del controllo ufficiale (Art. 37, par. 5(a)). Quindi, anche sulla base della normativa vigente, è necessario che i metodi di laboratorio impiegati nell'I.Z.S.L.T., perlomeno nell'ambito dei controlli ufficiali, siano valutati ed*



accreditati dall'organismo nazionale autorizzato dallo Stato a svolgere attività di accreditamento che, nella fattispecie, è *ACCREDIA*.

Ciò premesso, l'accREDITamento delle procedure di laboratorio prevede, in particolare, un processo di "**validazione del metodo**" che consiste nella "*conferma attraverso esame e apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti*" (paragrafo 5.4.5.1 UNI CEI EN ISO/IEC 17025); tale processo comprende la programmazione, la conduzione e la documentazione di un'articolata e complessa serie di attività a cui è inevitabilmente associato un rilevante impegno in termini economici, di tempo e di risorse umane: per una maggior cognizione circa i flussi di lavoro ad esso collegati, può essere consultata, ad esempio, la guida "Eurachem" sull'"*Idoneità per lo scopo dei metodi analitici*" (Raporti ISTISAN 16/39; ISSN:1123-3117). Poiché l'introduzione di cambiamenti in un metodo di laboratorio, ad esempio attraverso l'impiego di **prodotti alternativi con funzione equivalente**, può determinare importanti deviazioni nei parametri misurati in fase di validazione, è necessario procedere, in questi casi, con una parziale o una totale rivalidazione del metodo stesso, così come esplicitato al punto 5.4.5.2 delle "*Prescrizioni per l'accREDITamento dei laboratori di prova*" – RT-08, Revisione 03 del 27-10-2015 licenziate da Accredia.

Alla luce delle considerazioni appena espresse, diviene quindi logico, necessario e strategico garantire la **stabilità dei metodi di laboratorio** impiegati nell'ambito dei controlli ufficiali, non solo al **fine di valorizzare i costi non recuperabili (*sunk cost*)** sostenuti per la loro validazione, ma anche e soprattutto per garantire la **continuità diagnostica** dell'Istituto; ovviamente, la stabilità dei metodi richiede necessariamente la continuità nella fornitura dei beni previsti per la loro esecuzione. Nella fattispecie, tale fornitura riguarda beni di consumo **Appiled Biosystems - Life Technologies** (elencati in calce al presente documento) che nell'I.Z.S.L.T sono impiegati in circa 200 metodi di laboratorio validati e/o accreditati per la conduzione di protocolli di indagine biomolecolare, per la coltivazione di linee cellulari continue eucariotiche e per l'impiego dei sequenziatori "classici" di DNA. La necessità di garantire la fornitura di questi beni, oltre che per le motivazioni appena



espresse, è legata anche ad altre valutazioni, alcune delle quali di carattere generale, che possono essere così riassunte:

1) i metodi biomolecolari prevedono la conduzione di reazioni biochimiche allestite *in vitro* le cui prestazioni analitiche (ad es: Accuratezza, Precisione, Specificità, Limite di rilevabilità, Limite di quantificazione, Linearità, Robustezza etc) sono preminentemente determinate dalla natura dei “reagenti” utilizzati (in particolare degli enzimi), dai rapporti stechiometrici e dalla risposta che questi forniscono rispetto alle condizioni chimico/fisiche di reazione, dalla natura e dalla qualità della matrice biologica esaminata. La definizione degli equilibri tra tutti questi elementi è un processo complesso e quasi sempre caratterizzato, almeno per i metodi sviluppati internamente, da una serie di tentativi e fallimenti che solo l’esperienza del laboratorista, unitamente al confronto con il lavoro già svolto da altri, riesce a limitare prima di poter giungere ad un risultato definitivo. L’inevitabilità di tale percorso è sottolineata anche nella guida “Eurachem” dove, al paragrafo 3.3 sull’*“Idoneità per lo scopo dei metodi analitici”* (Rapporti ISTISAN 16/39; ISSN:1123-3117) si afferma, a proposito dello sviluppo di un metodo: *“...il chimico analitico può partire da alcune idee sommarie e ricorrere a competenza ed esperienza per progettare un metodo idoneo. Ciò chiaramente comporta un bel po’ di lavoro in più e qualche dubbio sul buon esito del metodo definitivo. Nella fase di sviluppo di un metodo non è insolito lavorare contemporaneamente a differenti progetti, per arrivare alla fine a scegliere il migliore...”*. D’altronde, è proprio sulla base di tali considerazioni che in presenza di un metodo normativo il laboratorista è tenuto al rispetto delle indicazioni tecniche riportate, anche per quanto attiene i consumabili da utilizzare, al fine di assicurare le prestazioni analitiche attese. Si deve quindi concludere che sulla base del principio di “scienza e coscienza”, il laboratorista individua il percorso migliore, anche nel rapporto costo/beneficio, per giungere allo sviluppo di un metodo di laboratorio e ciò, in considerazione della primaria necessità di assolvere al mandato istituzionale che, nel caso dell’I.Z.S.L.T., è di tutelare la salute umana ed animale;



2) Nel settore della coltivazione di linee cellulari continue eucariotiche, impiegate nell'I.Z.S.L.T. per la ricerca e la diagnosi di diversi virus, vi è un aspetto del tutto peculiare che rende stringente la continuità nella fornitura di determinati beni e, cioè, la necessità di mantenere in vita, in condizioni artificiali ricostituite *in vitro*, elementi cellulari che in natura sopravvivono soltanto in forma di aggregati (tessuti ed organi). Il percorso che in laboratorio consente di individuare le condizioni in grado di garantire l'omeostasi di entità biologiche altrimenti destinate ad una rapida alterazione patologica, è complesso e continuamente messo in discussione dai potenziali rischi derivanti da insulti ed aggressioni esterne, sia di natura chimico/fisica (pH, temperatura, umidità) sia di natura microbiologica (in particolare: micoplasmi); questo delicato equilibrio può essere messo in discussione anche dall'introduzione di reagenti, metaboliti, additivi, supplementi di crescita e terreni, diversi da quelli individuati nel corso di anni di mantenimento in vita delle colture stesse (anche sulla base dell'esperienza del Centro di Referenza Nazionale per i Substrati Cellulari dell'IZS Lombardia ed Emilia Romagna). A rendere ancora più delicato il compito vi è poi la constatazione che, non di rado, l'alterazione del metabolismo ed il conseguente decadimento delle caratteristiche delle linee cellulari continue eucariotiche, come ad esempio la sensibilità a determinati virus, può avere luogo con tempi medio-lunghi ed in forma latente, per poi manifestarsi all'improvviso e a scapito di importanti attività, come ad esempio, la diagnostica per il virus della rabbia;

3) Presso l'I.Z.S.L.T. vengono correntemente impiegati sistemi analitici "completi", che le aziende propongono come pacchetti "strumento - consumabili dedicati". Alcuni esempi in questo senso sono il "2100 Bioanalyzer Instruments" (Agilent Genomics), il "QIAxcel (QIAGEN)", il "QX100 Droplet Digital PCR" (BioRad) etc. Indipendentemente dal contenuto tecnologico dei sistemi considerati, da un punto di vista tecnico, funzionale e gestionale è opportuno che la fornitura dei consumabili per tali strumenti sia quella originale, non solo a garanzia delle prestazioni analitiche ma, in alcuni casi, anche dell'integrità degli strumenti stessi. Si ritiene pertanto necessario adottare questo approccio, in particolare, anche per due sistemi **Applied Biosystems - Life Technologies** presenti in Istituto: il fluorimetro QUBIT per la quantificazione degli acidi nucleici ed i



sequenziatori (capillari) di DNA. Per quanto riguarda il sistema QUBIT, oltre alle considerazioni di carattere generale appena espresse, occorre aggiungere che il suo impiego, come “sistema *all in*”, è previsto anche in diversi protocolli di *Next Generation Sequencing* per il sequenziamento massivo del DNA e che una piattaforma per l’applicazione di questa tecnologia è in via di acquisizione presso l’I.Z.S.L.T. Per quanto concerne i sequenziatori (capillari) di DNA, occorre invece sottolineare l’elevato contenuto tecnologico che caratterizza tali strumenti, le cui prestazioni analitiche dipendono dalla fine calibrazione tra funzione e caratteristiche di elementi come: sorgente *laser* per l’eccitazione dei fluorofori; *Charge-Coupled Device* (CCD) camera per il rilevamento delle emissioni dai fluorofori; frequenze ed ampiezza degli spettri di eccitazione ed emissione dei fluorofori; qualità e potere risolutivo della matrice (gel) impiegata per la separazione elettroforetica dei frammenti marcati; qualità del capillare per l’elettroforesi; ingombro sterico e caratteristiche elettroforetiche dei fluorofori; *software* di sequenza per la correzione e l’interpretazione dei segnali di emissione dei fluorofori; *buffer* di corsa etc. In presenza di un così articolato sistema di analisi, l’affidabilità, gli *standard* qualitativi dei risultati prodotti e, non ultimo, l’integrità dello strumento non può essere garantita in caso di utilizzo di prodotti non originali, sia per quanto riguarda i reagenti impiegati per l’allestimento delle reazioni biochimiche (mix di reazione, *size standard*, *buffer* di corsa etc) sia per quanto riguarda i consumabili come capillari, septa, contenitori per *buffer* etc, che in diversi casi costituiscono parte integrante dello strumento. Se si considera, inoltre, che parte della fornitura dei reagenti e consumabili è per questi strumenti un’esclusiva Applied Biosystems - Life Technologies, è ancora più opportuno da un punto di vista tecnico, funzionale e nell’ottica di una maggiore efficienza amministrativa che anche la restante parte della fornitura sia affidata al medesimo produttore, non ultimo per avere la certezza della compatibilità tra i vari elementi. In ultimo, il contratto di manutenzione per tali strumenti, stipulato con Applied Biosystems - Life Technologies, garantisce gli standard qualitativi dell’assistenza e delle prestazioni analitiche solo a fronte dell’impiego di reagenti e consumabili “originali”, utilizzati per validare l’operatività *ab initio* degli strumenti stessi.

Raniero Lorenzetti