

ANEXA II. Compartimentul de Diagnostic Molecular Imagistic

Sectiunea Diagnostic Molecular Imagistic este destinata a furniza informatiile arhitecturale privind desfasurarea tisulara a proceselor patologice de studiu. Tintele moleculare ale acestui gen de investigatii vor fi proteine functionale critice pentru programele de diferentiere, proliferare, suicid, trafic, activare, secretie de citokine, interactie cu matricea extracelulara a celulelor, gene, transcripti. Probele biologice principale studiate vor fi reprezentate de piese de incluzie in parafina provenite din exereza sau biopsie, fie livrate ca tesuturi proaspete de colaboratorii clinicieni angajati in proiectele de cercetare comune, fie preluate de la servicii de morfopatologie partenere. Aditonal, aceasta facilitate va permite criotomia pieselor tisulare proaspete, in scopul asigurarii posibilitatii de a utiliza imunomarcaje speciale. Tehnicile desfasurate tin de prelucrarea primara histologica a tesuturilor, de imunomarcajul histochimic, de hibridizarea cu sonde genice complementare. Echipamentele de imagistica alocate sint reprezentate de microscopice de fluorescenta computerizate si microscop confocal capabile sa identifice marcaje distincte (2 si mai multe simultane) si sa ofere imagini tridimensionale.

Spatiul alocat acestei sectiuni, de aproximativ 15% din suprafata Laboratorului, este plasat in extremitatea de Sud, fiind partajat in 2 compartimente: receptie si procesari cu regim chimic special, si respectiv analiza imagistica si arhivare.

Necesar de echipamente si instalatii

Compartimentul de receptie-procesare a pieselor tisulare va fi dotat cu urmatoarele elemente:

- 1 termostat 30 – 70oC de volum 200L pentru procesare parafina lichida si includere
- 2 termostat 30 – 70oC de volum 100L pentru procesare sectiuni parafina pre-marcaj
- 3 termostat 30 – 70oC de volum 100L pentru procesare sectiuni parafina post-marcaj
- 4 hota chimica pentru 2 persoane cu filtre de absorbtie solventi organici (xilen, benzen)
- 5 microtom computerizat sectiunare blocuri de includere in parafina
- 6 histokineta includere in parafina cu capacitate de 10 blocuri simultan
- 7 criomicrotom computerizat sectionare piese crioprezervate
- 8 masa termostata 60oC pentru etalare sectiuni
- 9 combina frigorifica pastrare reactivi, 250-300L pentru 4oC si 80L pentru –20oC
- 10 combina frigorifica pastrare chimicale speciale, 150-200L pentru 4oC si 50L pentru –20oC
- 11 frigider 100L pentru incubari in imunomarcaje
- 12 baie termostata volum 2-3L pentru renaturare antigenica controlata (regim acid)
- 13 baie termostata volum 2-3L pentru renaturare antigenica controlata (regim alcalin)
- 14 baie termostata de precizie volum 5-10L hibridizare

- 15 centrifuga multifunctionala pentru citospinuri (capacitate minim 8 lame) si sedimentare sub maxim 5000g
- 16 chiuveta si sursa apa
- 17 pH-metru electronic

Compartimentul de analiza imagistica si arhivare va fi dotat cu:

- 1 Microscop de fluorescenta de cercetare computerizat automatizat, cu camera fotografica digitala cu rezolutie de 4-6M pixeli si care sa permita timpi de expunere de ordinul zecilor de minute in conditii de zgomot termic redus, cu platina (masa de observatie) motorizata
- 2 Microscop optic de rutina pentru inspectia rapida a lamelor, dotat cu camera foto digitala si cu derivatie oculara pentru un al doilea observatory
- 3 Microscop confocal cu excitatie in minim 4 regiuni spectrale si detectia de emisie in minim 6 canale de fluorescenta
- 4 Computer de stocare si prelucrare a bazei de date imagistice
- 5 Camera fotografica digitala permitind microfotografiere
- 6 Chiuveta si sursa apa

Materii prime si materiale necesare

Procesarea produselor biologice necesare investigatiilor in regim de morfopatologie are 2 categorii de consumabile: apartinand histologiei clasice si respectiv imunomarcarii si hibridizarilor cu detectie in fluorescenta sau histochimica.

Consumabilele necesare sint:

Solventi organici (xilen / benzen) pentru includere in parafina

Parafina

Ceara

Coloranti clasici histologici

Paraformaldehida

Perhidrol

Saruri acide si bazice pentru tamponanele de lucru

Lame electrizate pentru etalarea sectiunilor

Detergenti si tamponane pentru retrieval

Chimicale pentru contracolorare

Tuburi de centrifuga de 15 si 50mL de polipropilena

Containere (*coplin jar*) pentru incubari sectiuni de sticla termorezistenta (pirex)

Cutii de polipropilena pentru arhivarea lamelor histologice standard
Virfuri de 2microL, 10microL, 100microL, 1000microL, 5000microL
Pipete reglabile de precizie
Markeri de trasare contururi hidrofobe delimitare sectiuni
Kituri de evidentiere marcaje primare cu link (secundar) tip anti-izotip
Kituri de evidentiere marcaje primare cu link (secundar) tip avidina
Kituri de evidentiere marcaje primare cu link (secundar) tip polimer complementar
Kit enzime de vizualizare de tip fosfataza alcalina si substrate cromogene minim 3 culori distincte
Kit enzime de vizualizare de tip peroxidaza si substrate cromogene minim 3 culori distincte
Tampoane blocare legare nespecifica (izotip, biotina)
Anticorpi secundari anti-izotipici marcati fluorescent si compusi chimici fluorescenti pentru minim 6 canale spectrale de vizualizare
Tampoane de inactivare chimica a deseurilor cu risc de biohazard

Schema fluxurilor tehnologice

Sectiunea de imagistica moleculara histologica este destinata a opera in doua maniere: independenta (pentru programele de cercetare centrate exclusiv pe dezvoltarea imagisticii microscopice) si respectiv intricata cu sectiunile de biologie moleculara, de procesare primara si de cultura citologica, de criostocaj. In acest context, operatorii care preiau produsele biologice de intrare marcheaza in baza de date traseul destinat acestora, si, tipic, directioneaza produsele spre compartimentul de procesare a acestei sectiuni – fie pentru criosectionare, fie pentru includere in parafina. Ocazional, marcajele pot fi realizate direct dupa sedimentarea suspensiilor celulare in citospin. Dupa includere in parafina, blocurile sint fie directionate spre procesare imediata (microtomie), fie arhivate. In cazul criosectionarii, piesele restante sint directionate spre criobaza. Preparatele histologice generate (sectiuni) sint supuse procedurilor de imunomarcare (care prevad adesea incubari peste noapte la 4oC) si ulterior procedurilor de dezvoltare. Vizualizarea si analiza sint efectuate la microscopul computerizat dedicat, sub softul de achizitie si de reconstituire 3D. Rezultatele investigatiilor vor fi destinate analizei de tip molecular a arhitecturii tisulare.

Amplasamentul

Acestei sectiuni i se aloca un spatiu unitar plasat in capatul de Sud al Laboratorului, in vecinatatea sectiunii de Genetica Clinica.

Necesarul de personal

Doua categorii de personal vor accesa aceasta sectiune.

Personalul nou incadrat va fi reprezentat de 2 tehnicieni cu pregatire in morfopatologie, genetica, tehnici imunologice.

Personalul de lucru in regim grant de cercetare va fi reprezentat de studenti masteranzi, doctoranzi si investigatori. Compartimentul de procesare probe va putea fi ocupat la un moment dat de maxim 5 persoane; cel de imagistica de maxim 6 persoane.

Descrierea tehnologiei

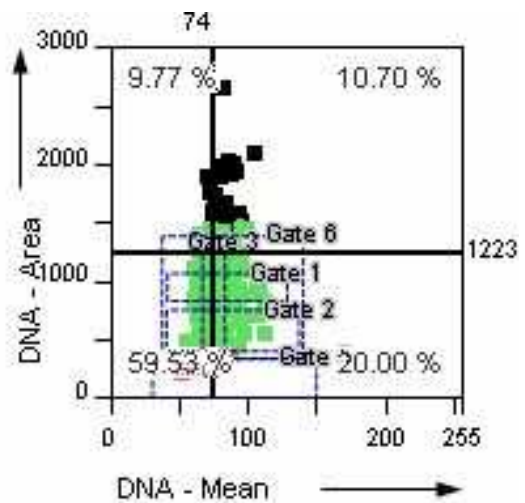
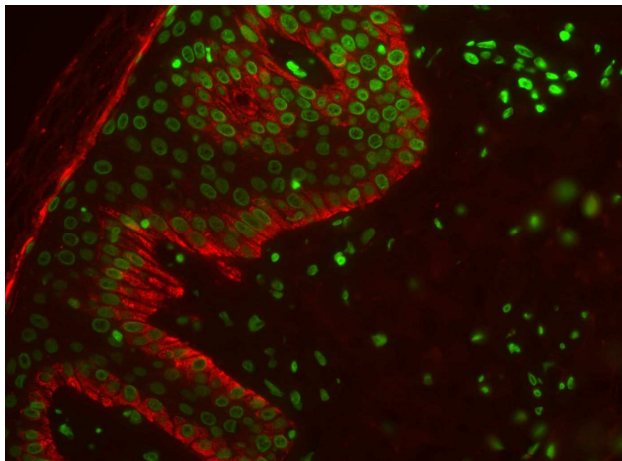
Tehnologiile desfasurate in aceasta sectiune reunesc protocoale consacrate de procesare a probelor tisulare si celulare in morfopatologie, cit si imunomarcaje si hibridizari cu dezvoltare cromogena sau de fluorescenta, cu vizualizare digitala.

Particularitatile principale privesc optimizarea multiplelor marcaje (dat fiind gama redusa de sisteme de marcaj secundar si amplificare de semnal), cit si intergrarea la nivel multi-sectional, 3D, a imaginilor obtinute. In esenta, scopul major al programelor de cercetare angajate va fi validarea practica a markerilor propusi pentru diagnostic, prognostic si monitorizarea terapiei, si in subsidiar documentarea la nivel molecular a functiilor desfasurate de celulele din tesuturile analizate. In contrast, dezvoltarea de noi protocoale si sisteme de vizualizare a marcajelor poate fi cel mult obiectiv secundar. Costurile de operare estimate ale acestei sectiuni se vor cifra la aproximativ 30 000 euro anual.

Exemple de activitate în cadrul compartimentului de imagistică moleculară :



Zona de imagistică moleculară este constituită din sistemul de microdisecție microscopică laser (dreapta) și din stația de lucru automatizată de microscopie pentru citometrie tisulară și histologie cantitativă în aplicații de imunohistochimie și imunofluorescență (stânga)



Exemplu de analiză calitativă și cantitativă prin imunofluorescență a markerilor tisulari, folosind stația de lucru automatizată de microscopie pentru citometrie tisulară (stânga), și analiza cantitativă a markerilor investigați folosind programul TissueFax (dreapta)