

MARCATURE CELLULARI IN MEDICINA NUCLEARE

NORME DI BUONA PREPARAZIONE

i radiofarmaci sono soggetti alla vigilanza da parte del Ministero della Salute, che ha facoltà di disporre il sequestro, allorché non sussistano elementi per assicurare una efficace tutela della salute pubblica. inoltre devono rispondere ai requisiti di qualità disposti dal Ministero, che stabilisce i criteri generali del controllo di qualità del prodotto finito e sigillato.

Dal decreto legge del 91 che segna i radiofarmaci come specialità medicinali da cui possono scaturire quindi complicazioni, nel 2005 vennero pubblicate le Norme di Buona Preparazione che entrarono in vigore nel 2008

RADIOFARMACI: per uso diretto ("in vivo"), preparazioni pronte all'uso e preparazioni estemporanee ("in vitro") fra cui troviamo la marcatura dei leucociti e del materiale autologo

Regole riguardo:

- 1) i metodi,
- 2) le attrezzature,
- 3) i mezzi e la gestione delle produzioni per assicurarne gli standard di qualità appropriati.

Componente fondamentale:

- 1) **Documentare**, tramite apposite registrazioni, ogni aspetto del processo, ogni attività ed ogni operazione
- 2) utilizzare personale che abbia ricevuto un'apposita **formazione**
- 3) occuparsi attivamente di pulizia e sanitizzazione
- 4) verificare con regolarità il **buon funzionamento** degli strumenti e dei macchinari
- 5) validare i processi
- 6) gestire i reclami

Garantita **QUALITÀ, SICUREZZA** ed **EFFICACIA**:

qualità-> **STERILITÀ**: preparazione in ambienti idonei e dedicati
 uso di attrezzature appropriate;
 uso di materiali sterili
 personale adeguatamente addestrato
 correttezza delle tecniche utilizzate

ambiente dedicato
 personale qualificato

continuo aggiornamento sulle NBP: assicurazione di qualità, elementi radioprotezionistici, manipolazione in asepsi di mat biologico, preparazione leucociti autologhi radiomarcati, controllo qualità radiofarmaci (efficienza marcatura, assenza aggregati cell, vitalità cell)

qualità delle condizioni di lavoro e dell'aria: laboratorio provvisto di un **filtro d'aria** per garantire il livello minimo di contaminazione microbica/particolata

devono essere presenti diverse stanze per diverse azioni:

- Cella di manipolazione adeguatamente schermata, facile da pulire e resistente ai prodotti utilizzati per la decontaminazione posta in un ambiente di tipo A/B: formata da camera + pre-camera
- Banchi di lavoro sanificabili, che fungono da piano d'appoggio.
- Contenitori schermati per il trasporto delle dosi da somministrare
- Strumenti di monitoraggio della contaminazione radioattiva ambientale e del personale

stanza per il controllo qualità:

- Camere cromatografiche
- Microscopio ottico

- Sistema per la rivelazione e quantificazione della radioattività, dedicato alla determinazione della purezza radiochimica
- Armadio solventi, volatili ed infiammabili, se necessario

la marcatura dei leucociti, che è la procedura a più alto rischio biologico, deve avvenire all'interno di un ISOLATORE che si trova all'interno di un laboratorio D, oppure una CAPP A FLUSSO LAMINARE, che è aperta quindi dà meno garanzia di sterilità, infatti deve essere posta in un locale di classe B

L' accesso ai locali è consentito esclusivamente al personale autorizzato

Gli ambienti conformi ai requisiti di radioprotezione:

1) **ZONA FILTRO:**

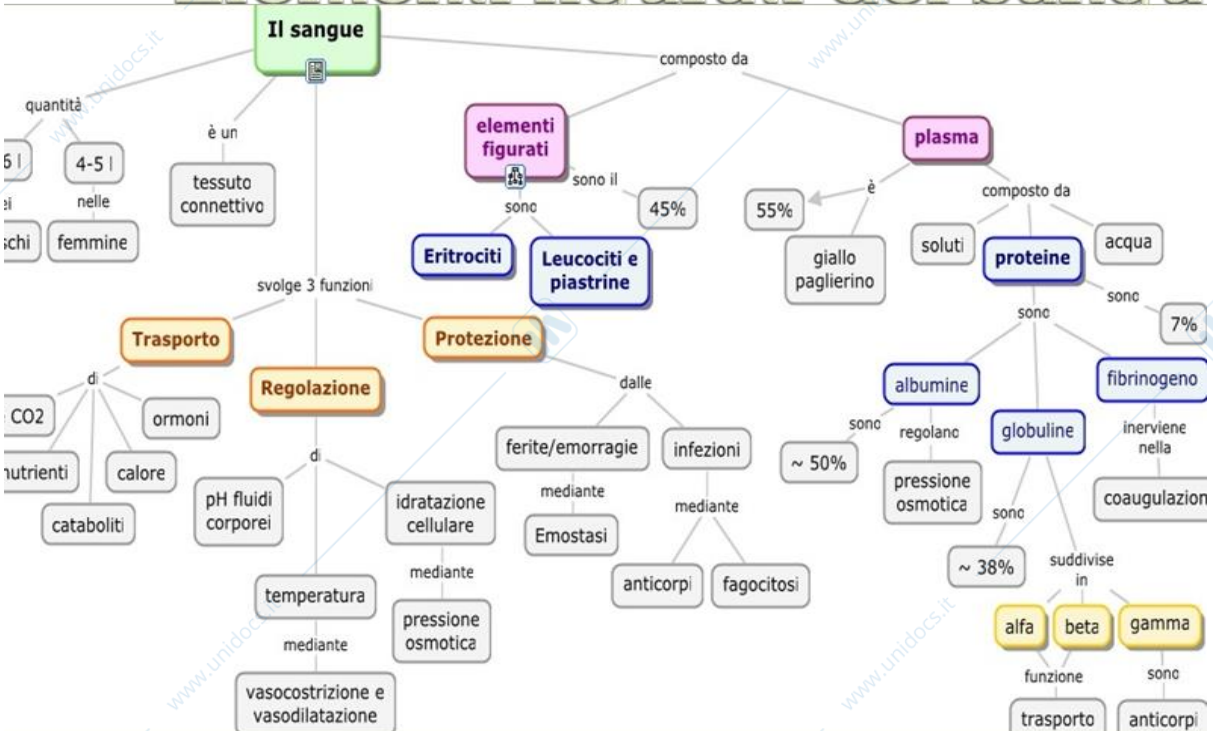
- è la via di accesso al locale dedicato alla preparazione dei preparati
- Il personale deve lasciare nel proprio armadietto gli indumenti personali
- Detersi le mani con l'apposito gel idroalcolico presente nel locale
- Indossare gli indumenti protettivi previsti dalla "PROCEDURA DI INGRESSO E USCITA DALLA ZONA CONTROLLATA" ovvero camice monouso e sovra scarpe.
- I dosimetri personali sono obbligatori

2) **Uscita:**

- Togliere i guanti gettandoli nel raccoglitore per i rifiuti nel locale preparazione
- detergere le mani con l'apposito sapone nella zona filtro
- Controllare l'eventuale contaminazione presente a contatto con la pelle, sugli abiti e sugli zoccoli utilizzando l'opportuna strumentazione presente nel locale.
- In caso di contaminazione radioattiva seguire le istruzioni della "PROCEDURA DI CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE"

ELEMENTI FIGURATI

Elementi figurati del Sangue



SANGUE:

è formato da una sospensione di cellule speciali in un liquido chiamato plasma.

in un uomo adulto, il sangue costituisce circa 1/12 del peso corporeo e corrisponde a 5-6 litri:

55 % del sangue è costituito da plasma;

45 % da cellule chiamate anche elementi figurati: eritrociti, leucociti, piastrine (frammenti di cell che mediano il processo di emostasi e coagulazione delle ferite)

ERITROCITI:

La mancanza del nucleo lascia più spazio all'emoglobina, proteina capace di legarsi in modo labile all'ossigeno;

La forma biconcava aumenta il rapporto tra la superficie e il volume citoplasmatico della cellula; (queste caratteristiche rendono più efficiente la diffusione dell'ossigeno da parte di queste cellule)

sono le più numerose: 4-6 milioni / mm³;

funzione principale è il trasporto dell'ossigeno dai polmoni verso i tessuti e di una parte di anidride carbonica dai tessuti ai polmoni;

120 giorni di vita media, al termine della loro vita vengono trattenuti dalla milza e fagocitati dai macrofagi

LEUCOCITI:

Forma rotondeggiante;

Incaricati della difesa dell'organismo;

Sono meno numerosi dei globuli rossi.

La densità di leucociti nel sangue varia da 4.000-10.000 / mm³

Una conta leucocitaria al di sotto dei normali valori viene definita leucopenia, un eccesso di leucociti si definisce leucocitosi

Si dividono in:

polimorfonucleati = granulociti -> neutrofili (50-70%), eosinofili (2-4%), basofili (0.5-1%): dovuto alla presenza di granuli nel citoplasma, in base all'affinità con i coloranti si distinguono in neutri, acidi, basici facendo assumere al citoplasma diverse colorazioni
mononucleati -> monociti e linfociti

Neutrofili: deputati alla fagocitazione dei batteri;

Sono presenti in grandi quantità nel pus delle ferite.

Funzione di difesa dell'organismo contro infezioni batteriche e fungine

Non incorporano coloranti

Vita: da 6 ore a pochi gg

Eosinofili: Contengono eosina

Hanno il nucleo bilobato tenuto insieme da un filo di cromatina

Svolgono un'azione nelle reazioni allergiche e nella difesa dei parassiti

Circolano nel sangue per 6-10 ore per poi migrare nei tessuti connettivi

Vita: 8-12 gg

Basofili: I granuli incorporano ematosilina-eosina

Nucleo bilobato

Funzione principale è quella di secernere sostanze che mediano la reazione di ipersensibilità: l'istamina

Secernono sostanze anticoagulanti

Vita da 2 ore - pochi gg

Linfociti: Rappresentano il cuore del sistema immunitario

si distinguono in linfociti B e linfociti T per il recettore che hanno in superficie

Linfociti B e T sono cellule dell'immunità adattativa, responsabili della protezione verso le infezioni,

producono anticorpi, che si legano all'antigene specifico e contribuiscono così alla sua distruzione.

Nascono entrambi nel midollo, ma quelli T maturano nel timo e i B maturano nel midollo

I linfociti T si suddividono in linfociti T helper e linfociti T citotossici

rappresentano il 20-40% di tutti i globuli bianchi

Essi hanno l'aspetto di piccole cellule con nucleo compatto che occupa quasi tutto il volume cellulare

linfociti T: hanno la funzione di migrare negli organi e tessuti del corpo in cui ci sia il focolaio infettivo

Individuano le singole cellule che sono state attaccate dal virus (o dal batterio)

Attivano i meccanismi di reazione che permettono all'organismo di difendersi, determinando così

l'Infiammazione

I linfociti B si fissano sulla superficie di eventuali proteine estranee formando un anticorpo specifico e

fungono da sentinelle, quindi si recano nelle sedi di invasione e circondano i microrganismi attaccandosi alla loro superficie.

la sostanza estranea viene riconosciuta come antigene.

Monociti:

sono a forma di rene

sono le cellule del sangue di dimensione maggiore

raggiungono la maturità nel midollo osseo, vengono immessi nella circolazione sanguigna dove

permanono per 24-36 ore e migrano poi nel tessuto connettivo, dove diventano macrofagi e si muovono nei tessuti

Sono le prime linee di difesa contro i microrganismi

in presenza di un focolaio infiammatorio, migrano attivamente nei vasi sanguigni e iniziano una intensa attività fagocitaria

vita: ore o giorni

PIASTRINE: la principale funzione è di fermare la perdita di sangue nelle ferite (emostasi).

esse si aggregano e liberano fattori che promuovono la coagulazione del sangue

riducono il calibro dei vasi lesionati

rallentano il flusso ematico

secernono la fibrina che intrappola le cellule e forma il coagulo.

forma rotondeggiante, sono frammenti di cellule prive di nucleo

PLASMA:

fluido leggermente alcalino, con caratteristico colore giallino, costituito per il 90 % d'acqua 10 % da

sostanza secca (sostanze organiche-> glucidi, lipidi, proteine, ormoni, amminoacidi e vitamine;

minerali-> sodio, potassio, calcio)

FUNZIONI sanguigne:

trasporta l'ossigeno ai vari tessuti e ne preleva l'anidride carbonica CO₂;

Trasporta sostanze nutritive (amminoacidi, zuccheri, sali minerali);

Raccoglie le particelle escrete che verranno eliminate attraverso il filtro renale;

trasporta ormoni, enzimi e vitamine;

Presiede alla difesa dell'organismo attraverso l'azione di fagocitosi da parte dei leucociti.

INFIAMMAZIONE

Risposta fisiologica dell'organismo ad un danno localizzato, che porta ad un accumulo di liquidi e leucociti nel tessuto extravascolare;

meccanismo di difesa il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale di danno

processo riparativo di difesa da parte dell'organismo che interviene a seguito di un danno

Caratterizzata da:

rubor = ARROSSAMENTO della regione corporea colpita -> aumento di apporto di sangue

calor = aumento TEMPERATURA -> aumento del metabolismo, vasodilatazione

tumor = TUMEFAZIONE -> rigonfiamento provocato dall'edema, dovuto allo stravasamento ematico che determina un riversamento di tutto ciò che è presente nel letto capillare

dolor = DOLORE -> per le alterazioni biochimiche locali, dovuto a compressione e stimolazione delle terminazioni nervose

functio lesa = RIDOTTA FUNZIONALITÀ della struttura lesa -> dolore e edema che premono sulle strutture infiammate

Reazione vascolare: vasocostrizione transitoria, vasodilatazione per un aumento di flusso che porta all'apertura dei capillari e poi all'edema

->fenomeni precoci:

Reazione cellulare: marginazione, rotolamento, adesione all'endotelio, diapedesi, migrazione nei tessuti, fagocitazione del batterio

-> migrazione dei leucociti che vanno nella sede di infiammazione: uccidono gli agenti lesivi, li inglobano e degradano il tessuto

marginazione = posizionamento dei leucociti lungo la parete del vaso

rotolamento = prima singolo e poi in fila lungo l'endotelio

adesione = all'endotelio

diapedesi = si inseriscono nelle giunzioni intercellulari e oltrepassano la membrana basale

chemiotassi = si dirigono verso gli spazi extracellulari per giungere nel sito infiammatorio e svolgere la loro funzione fagocitaria (per poi andare incontro a distruzione evitando di tornare in circolo)

I leucociti essendo i primi che arrivano nella sede di infiammazione, la loro marcatura (con la successiva acquisizione sotto la gamma camera) serve per evidenziare il loro percorso e la zona di arrivo localizzando sede ed estensione di infiammazione

INFIAMMAZIONE ACUTA

- risposta precoce ad uno stimolo lesivo

- presenza di essudato (liquido trasparente infiammatorio che contiene proteine) -> quando si concentrano globuli bianchi e batteri morti diventa PUS

Cause:

- Infezioni: batteriche, virali, parassitiche
- traumi meccanici: superficiali o profondi
- Agenti fisici, chimici: lesione termica, irradiazione, ustione, congelamento, sostanze chimiche ambientali
- Necrosi tissutale
- Corpi estranei: schegge, sporcizia, fili di sutura
- Reazioni immunitarie o di ipersensibilità

Acuta è di breve durata -> se si prolunga scatena una reazione **CRONICA** = persistenza dell'inflammatione acuta non completamente risolta, tutti i fenomeni demolitivi procedono in contemporanea con i processi riparativi, interferenza con il processo di guarigione o impossibilità di rimuovere l'agente lesivo

INFIAMMAZIONE = meccanismo di difesa con l'obiettivo di liberare l'organismo dall'intruso

INFEZIONE = reazione dell'organismo all'invasione del microorganismo,

- Diagnosi tramite indagini di laboratorio: umorali e micro-biologiche (tampone, ricerca antigene microbici, RIA, ELISA)

- Diagnosi strumentali
metodiche radiologiche:

ECOGRAFIA = prima scelta per lo studio dei tessuti molli, costo limitato e assenza di invasività

TC = valutazione accurata sia di tessuti molli che di strutture ossee tramite l'uso di RX

RM = metodica migliore per lo studio dell'apparto muscolare, articolazioni, pelvi, però la sensibilità elevata deriva dall'indennità dell'osso

metodiche medico-nucleari:

SCINTIGRAFIA TRIFASICA = impiegata principalmente nella patologia flogistica dell'osso ->

prima fase: somministrazione radiofarmaco (difosfonato marcato con tecnezio), acquisizione di una serie di immagini

seconda fase: dopo 3/5 min acquisizione di un'immagine statica

terza fase: dopo 3 ore dall'iniezione si acquisiscono altre immagini che evidenziano l'accumulo di radiofarmaco dove l'attività osteo-metabolica aumenta (quindi zona della lesione in base all'attività degli osteoblasti)

SCINTIGRAFIA CON LEUCOCITI MARCATI = fornisce informazioni sul grado di attività e sull'estensione della malattia, a seguito di ciò si può valutare la risposta al trattamento o valutare recidive dopo un eventuale intervento

usata in:

- osteomieliti, infezioni vertebrali = infezioni dell'osso e del midollo osseo causate da micro-organismi patogeni, virus o funghi, possono derivare da infezioni sistemiche o essere espressione di una localizzazione primitiva di un processo infettivo dell'osso e in seguito dei tessuti molli vicini; sono difficili da diagnosticare perché vengono fuori dopo tanto tempo, perché gli organismi che le causano rimangono stabilmente sul materiale protesico formando BIOFILM (secernono una sostanza liquida impermeabile) all'interno della quale non penetrano antibiotici (la patogenesi delle infezioni ossee deriva dallo stafilococco aureo che sopravvive molto all'interno di una coltura di osteoblasti per cui all'interno del corpo umano aderisce all'osso e esprime una forte resistenza al trattamento antibiotico) -> viti, impianti dentari, protesi ortopediche, valvole cardiache che causano: tumefazione, limitazione movimenti, febbre, perdita peso, astenia (stanchezza) e calore localizzato

questo esame identifica: un focolaio attivo e la sua estensione perché i leucociti migrano spontaneamente verso le zone infette

- infezioni da impianti artro-protesici (dispositivi vascolari o protesi ortopediche) -> il rischio di infezione risulta più alto nei primi due anni dal posizionamento;

l'esame evidenzia:

sospetta mobilitazione, estensione del processo infettivo, esclusione di infezione prima di un re-impianto nella zona dello spaziatore, valutazione risposta al trattamento

una delle complicazioni più temute dopo un intervento è proprio l'infezione dovuta alla protesi e il microorganismo più comune riscontrato in questi casi è lo "staphylococco epidermidis coagulasi negativo"

- malattie infiammatorie -> croniche intestinali = rettocolite ulcerosa e malattia di Crohn

- febbri di origine sconosciuta -> inizialmente veniva usata la PET con la quale la probabilità di

valutazione di un'eventuale infezione era bassa, quindi nel caso di sospetto di infezione ora si usa Scintigrafia con i leucociti marcati perché ha la capacità di valutare grado di estensione e attività della malattia;

- infezioni di tessuti molli;
- infezioni cardio-vascolari;
- infezioni sistema nervoso;

INDICAZIONE ALL'ESAME

campi di applicazione della **SCINTIGRAFIA CON I LEUCOCITI MARCATI**:

- Osteomieliti e infezioni vertebrali
- Infezioni da impianto artro-protetico e mezzi di sintesi (il digiuno si limita alla mattina per il prelievo dopo non c'è più nessun problema)
- Malattie infiammatorie croniche intestinali (un po' abbandonato perché per la preparazione, per il quesito, il pz doveva rimanere a digiuno dalla sera alla sera)
- Febbri di origine sconosciuta
- Infezione tessuti molli
- Infezioni sistema nervoso centrale
- Infezioni cardio-vascolari e polmonari
- Infezioni opportunistiche nei pz affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita

PROCEDURA:

effettuata da medici specialistici nucleari, da biologi, TSRM in medicina nucleare adeguatamente formati

Marcatura "in vitro", con radiofarmaci, prevede un prelievo di sangue dal quale si isola la popolazione cellulare da marcare;

radiofarmaci da utilizzare:

- Non devono essere tossici
- Non devono provocare reazioni o danni vascolari
- Devono marcare ugualmente tutta la popolazione cellulare leucocitaria
- Devono restare legati alla cellula leucocitaria

LEUCOCITI = cell che migrano spontaneamente verso le aree di infezione, vengono marcati in vitro quindi con un processo complesso (rispetto ai farmaci liofilizzati marcati con Tc), in condizioni di cura per non danneggiare le cell e di sterilità perché il tutto va poi reiniettato al pz

Marcatura = ^{99m}Tc che non può essere incorporato direttamente dai leucociti ma deve essere associato all'HMPAO (esametil-propilene-ammino-ossina) per poter attraversare la membrana cellulare perché con la sua struttura ad anello funge da carrier -> **^{99m}Tc -HMPAO**:

- attraversa la membrana in modo passivo perché è liposolubile

- si diffonde rapidamente nel citoplasma essendo un prodotto neutro infatti si lega con tutti i componenti intracellulari

- non determina perdita di vitalità cellulare

all'interno della cell si converte nella forma idrofila quindi non può più riattraversare la membrana, rimane intrappolato, si distribuisce all'interno della cellula **marcando** nucleo e citoplasma;

tempi di esecuzione molto lunghi, dal prelievo alla reiniezione passano 3/3.30 h

Passaggi:

1. Prelievo di sangue
2. Separazione dei globuli bianchi concentrandoli rispetto alle altre cell -> tramite la centrifugazione (1400 rpm) che sfrutta le diverse densità degli elementi del sangue
3. Marcatura dei globuli bianchi

Le operazioni di separazione, marcatura, preparazione radiofarmaco, siringa per la somministrazione ... devono essere effettuate in condizione di STERILITÀ -> particolare attenzione alla pulizia delle aree e alla strumentazione dedicata alla preparazione (monitoraggio ambientale e programmi di pulizia)

Le immagini di reni e vescica sono sempre presenti in una scintigrafia perché i metaboliti radioattivi dell'HMPAO vengono eliminati per via renale (in minor quantità anche epatica)

Esame sensibile (95%) e specifico (97%) principalmente per l'osso periferico (tibia, protesi ginocchio, protesi anca)

MARCATURA IN VITRO DEI LEUCOCITI CON 99Tc-HMPAO

Scintigrafia con leucociti autologhi marcati è un'indagine diagnostica che si propone di identificare la presenza di eventuali focolai di flogosi / infezione presenti nell'organismo e non riconoscibili con altre tecniche

I GLOBULI BIANCHI svolgono fisiologicamente la funzione di difesa contro gli agenti infettanti e quindi si concentrano in un focolaio infettivo con lo scopo di combattere l'infezione
motivo per cui marcando i leucociti autologhi e valutandoli con la scintigrafia è possibile individuare eventuali infezioni e infiammazioni all'interno dell'organismo

Tecniche utilizzate:

- **IN VIVO:** in termini di laboratorio è una metodica che è più facile, più agevole, svolta anche da personale non laureato; inoltre utilizza dei sistemi chiusi dando una maggiore sicurezza a pz e operatori
soddisfacente accuratezza diagnostica, però la sensibilità e la specificità degli anticorpi generalmente è inferiore rispetto alla tecnica in vitro
- **IN VITRO** -> implica un complesso e laborioso processo di separazione e marcatura dei leucociti che ha in vantaggio di avere una maggiore ACCURATEZZA diagnostica sia in termini di sensibilità che di specificità
prevede l'esecuzione di un prelievo di sangue dal quale viene **isolata la popolazione cellulare da marcare**, può essere fatto attraverso varie tecniche ma la più frequente vede una fase di **sedimentazione** seguita da una di **centrifugazione** -> CENTRIFUGAZIONE DIFFERENZIALE si basa sulla diversa velocità di sedimentazione delle particelle in base alla densità e alla dimensione

È molto importante essere dotati di **ZONA CRITICA** in cui è possibile garantire l'osservanza delle **Norme di Buona Preparazione (NBP):**

- assicurare la sterilità
- presenza di **ambienti dedicati e controllati** -> per tutte quelle attività di frazionamento e marcatura che possono esporre il campione ematico all'aria è necessario un ambiente controllato di classe A (isolatore) collocato in un ambiente di classe D



[isolatore = **pre-camera + camera** -> operazioni di marcatura eseguite all'interno del box tramite dei guantoni posizionati sulla parete principale; il materiale passa attraverso la pre-camera così da impedire un diretto contatto tra l'ambiente esterno e la camera principale, all'interno della quale avviene la manipolazione; utilizzato per eseguire i processi asettici in cui spazio e superfici esposte sono controllate microbiologicamente attraverso filtri]

- attrezzature appropriate: materiali e reagenti sterili, registrati per l'uso in vivo quindi con certificata qualità di produzione
- procedura di marcatura e impiego di materiali standardizzata e preventivamente validata a garantire la qualità e sterilità del prodotto finale che andrà iniettato al pz
- personale che lavora all'interno qualificato
- particolare importanza e attenzione alle procedure di pulizia e disinfezione e alle tecniche asettiche utilizzate;

Requisiti dei radiofarmaci usati per marcare i leucociti:

- requisiti farmaceutici
- non tossicità
- non provocare reazioni vaso-motorie / danni vascolari
- marcare nello stesso modo tutta la popolazione cellulare isolata
- restare legati alla cellula leucocitaria

STORIA

scintigrafia con i granulociti marcati con In^{111} (indio): tecnica introdotta negli anni '80 che è diventata la gold standard per lo studio delle infezioni, la sua accuratezza nelle infezioni ossee varia in funzione dell'attività e della sede del processo infettivo

negli anni '90 l'indio¹¹¹ è stato sostituito con il **Tecnezio^{99m}- HMPAO** perché l'isotopo è risultato più maneggevole per la sua breve emivita fisica, dando quindi meno danno radiante al pz e concedendo la possibilità di usarne in quantità maggiori, da cui ne deriva un miglioramento di qualità delle immagini -> sensibilità della metodica del 95%

AMBIENTE

adeguato a minimizzare la possibilità di contaminazione crociata tra elementi da lavorare e esterno, delimitato da pre-camera come zona filtro, pressione negativa della stanza in cui si lavora rispetto alla stanza filtro, superfici lisce e molto impermeabili, proibita la presenza di lavandini o scarichi nelle zone di classe A-B e per le altre classi devono essere previsti sistemi per impedire il reflusso

STRUMENTAZIONE

se non si ha un isolatore (posto in classe D) si può utilizzare una CAPP A FLUSSO LAMINARE posto in un locale di classe B che a differenza del locale di classe D ha alcuni requisiti più stringenti perché la cappa a flusso laminare è aperta, invece l'isolatore garantisce ambiente interno sterile quindi il locale può avere requisiti meno stringenti;

CENTRIFUGA REFRIGERATA;

MICROSCOPIO OTTICO;

KIT PER IL CONTROLLO QUALITÀ

la strumentazione deve essere di acciaio per essere facilmente disinfettabile

PROCEDIMENTO

ogni medicina nucleare sceglie un metodo da applicare, all'interno dei range della metodica principale:

- quantità di sangue prelevato: 50-100ml
- volume dell'espansore plasmatico
- anticoagulante: ACD formula A (10ml)
- tipo di provette sterili (plastica): Falcon
- giri impressi alla centrifuga durante la separazione dei gl bianchi dagli altri elementi del sangue: 150
- identificazione di un'ottimale marcatura: direttamente sul bottone cellulare o in plasma
- volume e attività di marcatura
- tempo di incubazione: standard 10 minuti
- volumi aggiunti per stoppare la marcatura: 5ml fisiologica

Punti critici:

- mantenimento della sterilità dei reagenti di un ambiente di lavoro il più possibile controllato
- prelievo in cui si deve evitare schiuma e/o emolisi
- centrifugazione che se errata può provocare danni meccanici alle cellule (rottura)
- ricostruzione del pellet che deve essere fatta sempre lentamente altrimenti si rischia di uccidere le cellule
- trasferimento di materiale da un contenitore all'altro lentamente perché si rischia di uccidere le cellule
- quantità adeguata e qualità ottimale del radiofarmaco impiegato per la marcatura

1. PRELIEVO

siringa da 60ml con ago butterfly da 19 riempita con 10ml di anticoagulante e 8ml di espansore plasmatico (per velocizzare la sedimentazione del sangue), unita a 42ml di prelievo di sangue;

2. SEDIMENTAZIONE

in laboratorio (zona controllata) la siringa viene agitata delicatamente in modo che i prodotti all'interno si miscolino; viene poi lasciata sedimentare per 1h -1.30 appoggiata in posizione obliqua su un supporto nell'isolatore a temperatura ambiente;

3. SEPARAZIONE -> globuli bianchi dagli altri elementi del sangue

Completata la sedimentazione (si vede la separazione tra plasma e globuli rossi), collegare alla siringa un ago butterfly premendo lo stantuffo della siringa si trasferisce il PRPL (plasma ricco di piastrine che contiene granulociti + mononucleati quindi linfociti e monociti) in una provetta sterile Falcon da 50 ml, avendo cura di non trascinare i globuli rossi sedimentati

4. CENTRIFUGAZIONE

a 150 giri per 5 min -> augmenta il processo di separazione basato sulla densità (separazione tra elementi più densi che si accasciano sul fondo =pellet e quelli meno densi che rimangono in sospensione = surnatante) grazie al quale si ottiene un plasma ricco di piastrine che essendo meno dense rimangono nel surnatante, il quale dovrà essere eliminato attraverso una pipetta o una siringa da 10ml con un ago spinale facendo attenzione a non rimescolare il tutto; il bottone cellulare viene marcato con il radiofarmaco ^{99m}Tc -HMPAO;

5. PREPARAZIONE RADIOFARMACO (eseguita dal tecnico)

viene ricostruita una fiala CERETEC-HMPAO con 3ml di pertecnecato di sodio, che deve avere attività tra 60-90mCi

in totale il bottone cellulare non deve mai superare i 5ml, ovvero un'attività totale di 120mCi di ^{99m}Tc appena eluito (eluato non più vecchio di 2h e generatore eluito non più di 24h prima)

6. MARCATURA DEL BOTTONE CELLULARE

vengono marcati due bottoni cellulari alla volta perché vengono fatti due pz per volta: i 120mCi sono suddivisi in 25mCi per il primo e 25mCi per il secondo (??)

dopo che il prodotto è stato ricostituito avviene la marcatura del pellet di leucociti: abbiamo una siringa con HMPAO ricostituito con ^{99m}Tc che viene unita ad una provetta sterile di Falcon con i leucociti da marcare (il volume finale non deve superare i 2ml): viene lasciato in incubazione per circa 10min a temperatura ambiente all'interno di un contenitore schermato, dopo di che bisogna lavare le cellule per eliminare il surnatante (l'attività che non si è legata alle cell) aggiungendo nella provetta Falcon 5ml di fisiologica, il tutto viene poi centrifugato a 150 giri per 5 min

L'attività del surnatante viene misurata con un calibratore di dose e servirà poi per calcolare la RESA DI MARCATURA (= controllo qualità) del prodotto

il bottone cellulare rimasto in fondo viene risospeso con altri 5ml di soluzione fisiologica
tutti questi procedimenti devono essere fatti lentamente per evitare la rottura delle cell

7. CONTROLLO DI QUALITÀ

Trasferire il radiofarmaco in una siringa opportunamente identificata e misurare in un calibratore di dose la radioattività presente nella siringa (RESA DI MARCATURA) = **attività nel pellet x 100/ (attività nel pellet + attività nel surnatante)** -> dose somministrata al pz

Controllare controllo luce che la soluzione finale appaia limpida e senza agglomerati cellulari (valutazione visiva -> sperlatura);

SOMMINISTRAZIONE -> dopo 1h abbiamo la prima scansione

sono gli stessi per radiofarmaci marcati sia in vitro che in vivo

sono un insieme di verifiche per valutare (raggiungimento del risultato più vantaggioso possibile) se la marcatura è avvenuta in modo efficace ed efficiente:

- **efficacia** = capacità di produrre il risultato voluto

- **efficienza** = capacità di rendimento costante

- permettono la valutazione del mantenimento dei requisiti prefissati di **affidabilità biologica** (presenza di cellule morte che non hanno inglobato il Tc = bassa radioattività = esame non ben riuscito) del preparato e **buona riuscita dell'esame scintigrafico**

si fa sempre riferimento alle NBPR che informano sulla tipologia di controllo e modalità di esecuzione necessaria; alcuni controlli vengono fatti di ROUTINE e altri in modo PERIODICO:

ROUTINE: vengono fatti dopo la marcatura quindi su un prodotto radioattivo in vitro:

- **sperlatura** -> valutazione visiva = ruotare e ispezionare lentamente la siringa per escludere la presenza di macroaggregati e per individuare macroscopicamente un'eventuale contaminazione eccessiva di globuli rossi e fibrina
usare cautela e farlo nella cella schermata perché si sta maneggiando materiale radioattivo viene fatta sempre prima di iniettare perché il materiale essendo radioattivo decade quindi non si possono aspettare tutti i controlli
- **resa di marcatura** -> attività nella siringa x100 / (attività siringa + attività surnatante) (>70% iniettabile, al limite del 50% è opportuno non iniettare) = la percentuale di radioattività legata alle cellule rispetto a quella totale impiegata;
la RESA dipende dall'eventuale presenza di bolle nei vari passaggi di marcatura (infatti un punto critico è il passaggio di materiale da una provetta all'altra), oppure dagli sbalzi eccessivi di

temperatura (temperatura costante all'interno dell'isolatore), ma anche dalla concentrazione di globuli bianchi nel sangue venoso in partenza (più ce ne sono più aumenta la resa di marcatura ma è un indice di presenza di infezione in atto)

- **osservazione al microscopio** -> (parametro importante e di semplice esecuzione) osservazione tramite una semplice colorazione che consente di valutare la presenza di aggregazioni cellulari non analizzabili ad occhio nudo
- **test di vitalità** (trypan blue) -> valutazione di assenza di danno cellulare esprimendo la percentuale di cellule che sono rimaste in vita: si utilizzano coloranti che permeano la membrana delle cellule morte e si intercalano nel DNA (leucociti che hanno subito danni trattengono il colorante = diventano blu scuro); se il danno è conseguente all'azione del radiofarmaco e non al caso, il numero deve superare le 200 cellule
 si prepara un volume di 10 microlitri di radiofarmaco (tenuto indietro da quello preparato per l'iniezione) e uno uguale di colorante, delicatamente vengono miscelati e lasciati incubare per 5 min; si deposita una goccia su un vetrino e si osserva al microscopio valutando la percentuale di cellule morte (colorate) sul totale:
 una buona esecuzione del prodotto corrisponde al 99% di vitalità ->
 per questo esame si utilizza la camera BURKER = camera contaglobuli che si riempie per capillarità, viene visualizzata al microscopio come un reticolo nel quale le cellule appaiono con la loro colorazione: vive = trasparenti, morte = blu, moribonde = azzurre
% vitalità -> $n \text{ cell trasparenti} \times 100 / n \text{ cell contate}$
% mortalità -> $n \text{ cell blu e azzurre} \times 100 / n \text{ cell contate}$

in vivo:

valutazione globale sull'**AFFIDABILITÀ DELL'INTERA PROCEDURA** e **INDICE per l'INTEGRITÀ FUNZIONALE** = captazione nei diversi distretti corporei in cui fisiologicamente i globuli bianchi marcati si distribuiscono:

prima acquisizione (precoce) dopo circa 60min dalla re-iniezione dei leucociti marcati che fisiologicamente si localizzano precocemente in sede **polmonare, epatica, splenica e midollare** -> in condizioni normali il campo polmonare si chiarifica completamente nell'arco dei primi 90' e contemporaneamente si osserva un aumento dell'attività epatica, in caso di danno cellulare si ha un incremento ulteriore dell'attività epatica -> scansione polmonare ha notevole rilevanza in quanto consente di avere una rapida conferma dell'integrità cellulare
 somministrazione di popolazioni leucocitarie miste -> clearance (capacità di depurazione dell'organo) è di 30min
 somministrazione popolazioni granulocitarie pure -> transito polmonare 5min
 per cui se permane spot polmonare significa che c'è stata una microaggregazione in vitro

PERIODICI / BIOLOGICI: ci si appoggia al laboratorio di microbiologia, tempi prolungati quindi fatti saltuariamente

- **Test di sterilità:** garantire che il preparato non abbia subito contaminazione batterica o fungina prima della reiniezione del pz = assenza di batteri positivi e negativi -> si recupera il surnatante della marcatura, si aggiunge il kit per emocultura con Gram+ e Gram- le provette vengono poi inviate alla microbiologia che manda la risposta a distanza di una settimana ci dà la possibilità di capire quali sono le cause di eventuali problematiche e in quale step è avvenuta la contaminazione

- **Test di apirogenicità:** Verifica che la concentrazione di endotossine nel prodotto non superi il valore limite definito secondo farmacopea;
una piccola parte di liquido che è stato marcato viene ricostituito con un kit, le provette vengono inviate in microbiologia e si attende la risposta dopo circa una settimana
- **Controllo superficie di lavoro:** l'intera procedura deve essere eseguita sotto cappa a flusso laminare/isolatore, pertanto le condizioni operative vanno periodicamente verificate attraverso il campionamento dell'aria (questo viene fatto con computer e valori e controllato dall'ufficio tecnico);
noi invece ci occupiamo di controllare il banco di lavoro e gli strumenti che utilizziamo attraverso lo **SMEAR TEST**: controllo per sospetta contaminazione della superficie di lavoro = si lascia aperta sulla superficie di lavoro una piastra Petri contenente agar di sangue per 1h, poi si esegue la lettura in microbiologia dopo 24/48h di incubazione e se non si riscontra presenza di microrganismi il risultato è favorevole e la superficie di lavoro è da considerarsi sterile;
inoltre le ditte che eseguono la manutenzione della cappa effettuano controlli quando sostituiscono i prefiltri (ogni 6 mesi) e i filtri al bisogno.