

**Progetto per il corso di
Architetture Hardware di Laboratorio**

Utilizzo di Sistemi Hardware in un Laboratorio Biomedico

Studente: Florina Ion Popa

Matricola: vr098143

Il Centro Regionale Malattie Metaboliche Neonatali (CRMMN) dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona (AOUIV) esegue lo screening neonatale delle principali malattie metaboliche ed endocrinologiche ereditarie per il nord-est Italia: Ipotiroidismo Congenito, Iperplasia Congenita del Surrene, Fenilchetonuria, deficit di Glucosio 6 Fosfato Deidrogenasi, deficit di Biotinidasi, Galattosemia, Malattia delle Urine a Sciroppo d'Acero. I neonati sono sottoposti a screening per tutte queste malattie o soltanto per alcune di esse, secondo accordi presi con gli ospedali di nascita. Inoltre è in corso un programma di allargamento dello screening a 40 malattie metaboliche grazie alla prossima introduzione della spettrometria di massa tandem, noto comunemente come screening metabolico allargato. Lo scopo dello screening neonatale è quello di identificare precocemente i bambini a rischio di sviluppare una delle malattie ereditarie di cui sopra in modo da poter intervenire con un trattamento adeguato prima ancora che la malattia si manifesti. Lo screening neonatale consta nel dosaggio di alcuni analiti

indicativi delle rispettive malattie e si effettua su alcune gocce di sangue prelevate dal tallone del bambino a 36-48 ore dalla nascita e assorbite su di una particolare carta da filtro. Le macchie di sangue sulla carta sono comunemente note come "dried blood spot" (DBS).

1. Tracciabilità

Acquisizione automatica d'identità ed informazioni sullo stato di elaborazione dei campioni

Gli spot di sangue sono parte di un cartoncino identificato univocamente da un *codice a barre* lineare di tipo Code 39 codificante numeri progressivi da dieci cifre. Inizialmente i cartoncini sono inviati ai punti nascita e grazie al sistema dei codici a barre questi possono essere associati automaticamente all'ospedale al quale sono spediti. La *lettura dei codici a barre* avviene mediante la scansione ottica utilizzando un lettore manuale collegato ad un PC attraverso lo standard RS232. Attraverso un'interfaccia applicativa i codici a barre dei cartoncini e la rispettiva indicazione dell'ospedale associato sono inseriti nella base di dati del centro screening.

Una volta fatto il prelievo del sangue del neonato il cartoncino è rispedito al CRMMN in busta chiusa. Il cartoncino, oltre alla parte per il prelievo, è provvisto anche di una scheda contenente i dati anagrafici del bambino. E' necessario che il codice a barre sia presente sia sulla parte per il prelievo che sulla scheda per i dati anagrafici. Questo perché, all'arrivo al centro, le due parti vengono divise: quella contenente il prelievo verrà processata per l'analisi biochimica, mentre l'altra serve per l'inserimento dei dati anagrafici nella base di dati. Entrambe le parti sono identificate univocamente dallo stesso codice a barre.

Per la lettura della parte anagrafica è utilizzato uno scanner con lettore ottico per i codici a barre in grado di leggere una grande quantità di documenti con il codice a barre. Il lettore memorizza i documenti letti e in un secondo momento, dopo una verifica della correttezza dei dati, questi vengono trasferiti nella base di dati attraverso un'interfaccia specifica. Oltre al nome, cognome e data di nascita del bambino sul cartoncino sono registrati anche altri dati, tra i quali la data del prelievo, peso alla nascita, l'età gestazionale ed alcune informazioni cliniche.

Lo stato dei campioni che, al momento, contengono solo i dati anagrafici è definito come giornaliero. I dati relativi ad ogni bambino sono facilmente visualizzabili dall'interfaccia grafica con la base di dati scegliendo appunto lo stato giornaliero. Dopo l'esecuzione

delle analisi possono essere visualizzati anche i risultati e se tali risultati presentano solo una validazione tecnica, lo stato dei campioni è sempre giornaliero, mentre una validazione clinica porta i campioni nello stato storico, che sta a indicare la fine dell'elaborazione di tali campioni e l'archiviazione definitiva.

La parte dei cartoncini contenente i prelievi viene raggruppata in mazzette numerate formate da 78 cartoncini. I campioni verranno poi processati, una mazzetta alla volta, in piastre da 96 pozzetti. L'organizzazione in mazzette costituisce anche il modo di *archiviazione* dei cartoncini. Prima del processamento analitico dei campioni avviene una nuova lettura ottica dei codici a barre con un lettore da tavola. Viene memorizzata automaticamente anche la data del giorno ed ora, conferendo al processo un *riferimento temporale affidabile*. Attraverso un'interfaccia grafica viene associata ai codici a barre e alla data, acquisiti automaticamente, l'analisi da eseguire (che a sua volta è funzione dell'ospedale di nascita) e la posizione del campione (il numero della mazzetta in cui si trovano i campioni e la posizione progressiva all'interno della mazzetta).

2. Acquisizione, elaborazione, memorizzazione e visualizzazione dei risultati

2.1 Screening di base: analisi di una sostanza per ogni malattia in dosaggi differenti

Il Centro è dotato di un puncher "front end", uno strumento in grado di ritagliare dischetti da 3,2 mm di diametro dai DBS, di posizionarli automaticamente nell'apposita micropiastra da 96 pozzetti e di realizzare una lista dei campioni. Nella lista dei campioni viene registrato il codice a barre del campione, letto con il lettore ottico fisso associato al puncher, al quale viene associata la posizione nella micropiastra in cui il rispettivo campione verrà processato. Le micropiastre così preparate sono pronte per essere caricate nel Processore di Piastre collegato in rete con il puncher. Il collegamento permette l'importazione automatica della lista dei campioni.

Il Processore di Piastre è un sistema automatico per il *dosaggio fluorometrico* dei campioni. Dopo il caricamento delle micropiastre contenenti i campioni, esso esegue automaticamente tutte le fasi del dosaggio (estrazione, incubazioni, separazioni). L'esecuzione automatica del dosaggio è molto importante in quanto fa risparmiare tempo e lavoro da parte del personale che può dedicarsi ad altre attività. Il principio che sta alla base del dosaggio è il seguente: un anticorpo monoclonale specifico per la sostanza da dosare viene immobilizzato su di un supporto solido. La sostanza da dosare, estratta da ogni campione, interagisce con l'anticorpo specifico immobilizzato sul

supporto solido e con un secondo anticorpo monoclonale che riconosce una regione della sostanza diversa da quella riconosciuta dal primo anticorpo. Questo secondo anticorpo ha legato l'europio, una sostanza in grado di formare chelanti fluorescenti con composti presenti in una soluzione che stacca l'europio dall'immunocomplesso formato. La fluorescenza sviluppata è proporzionale alla concentrazione della sostanza da dosare di ogni campione.

La misurazione delle concentrazioni degli analiti da dosare è eseguita sempre dal Processore di Piastre. Il sistema funziona su un PC esterno utilizzando un software sviluppato appositamente per questo processo. Il software gestisce i protocolli per i dosaggi, la lista di lavoro importata dal puncher, i controlli di qualità e la comunicazione con gli utenti attraverso un'interfaccia grafica che permette all'utente di programmare il lavoro. Lo strumento misura la fluorescenza emessa da ogni campione e restituisce la concentrazione dell'analita presente nel campione, che viene calcolata per interpolazione dalla *curva di calibrazione caratteristica*, realizzata misurando le fluorescenze di campioni di concentrazioni crescenti note. Per avere il controllo della correttezza della misurazione assieme ai campioni vengono dosati anche dei *controlli di qualità* interni, dei campioni contenenti concentrazioni conosciute degli analiti di interesse. Se tali concentrazioni non corrispondono alle aspettative, i risultati prodotti dalla misurazione non sono attendibili e può essere necessaria una ricalibrazione dello strumento. Il controllo di qualità può essere impostato dall'utente sempre attraverso l'interfaccia a disposizione. Sono previsti anche periodici controlli di qualità esterni.

I risultati prodotti dalla misurazione sono associati ai codici a barre messi in corrispondenza ad ogni pozzetto dalla lista di lavoro. Il software per il processamento dei campioni è in grado di riconoscere connessioni alla LAN rendendo possibile il trasferimento dei risultati alla base di dati che si trova su un server collegato alla rete aziendale.

2.2 Screening metabolico allargato: analisi di più sostanze indicative di più malattie in un unico dosaggio

Per quanto riguarda lo screening metabolico allargato, come si è già accennato, esso viene realizzato grazie la *spettrometria di massa tandem*, un sistema che permette l'analisi simultanea di molte molecole ionizzate.

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo usato per le misurazioni è un'apparechiatura computerizzata, dotata di un sistema embedded, che separa e conta gli ioni in base al loro rapporto massa/carica. Lo strumento presenta una sorgente

degli ioni che genera una nebulizzazione di goccioline dotate di carica da cui, durante l'evaporazione del solvente, vengono emessi gli ioni. Questi vengono introdotti nell'analizzatore di massa per il rilevamento. L'analizzatore di massa è costituito da un triplo quadrupolo, un filtro di massa formato da quattro barre metalliche in un campo magnetico generato applicando un potenziale di radiofrequenze. Benchè l'estrema versatilità dello strumento possa prevedere diverse configurazioni, generalmente il primo quadrupolo separa gli ioni in base al rapporto m/z e li indirizza verso una cella di collisione dove avviene la frammentazione degli stessi ioni. Queste specie cariche prodotte a loro volta sono introdotte in un secondo analizzatore di massa che le separa in base al valore m/z per inviarli, infine, al rivelatore per la misurazione del segnale.

I vari moduli dello spettrometro di massa sono collegati ad un PC esterno. Alcuni dei moduli sono dotati di commutatore Ethernet interno che permette il collegamento tra di loro ed con il computer esterno.

Lo strumento è controllato da un software che assicura l'acquisizione, l'analisi, la gestione e la distribuzione dei dati di spettrometria di massa. Il software consente di eseguire le seguenti operazioni principali:

- Configurazione dello strumento;
- Creazione dei metodi LC e MS/MS che consentono di definire i parametri di funzionamento delle analisi;
- Utilizzo del software per la calibrazione dello strumento;
- Acquisizione dei campioni;
- Monitoraggio dell'analisi;
- Acquisizione dei dati;
- Elaborazione dei dati;
- Esame dei dati;
- Stampa dei dati;

Il sistema dispone di un altro software che consente di configurare le impostazioni, monitorare le prestazioni, eseguire test diagnostici e provvede alla manutenzione del sistema e dei relativi moduli.

L'utente attraverso un'interfaccia grafica può controllare l'avviamento dello strumento, impostare le condizioni di lavoro (temperatura, flusso dei solventi, tempi di acquisizione), l'acquisizione dei campioni, l'analisi dei risultati e la loro memorizzazione.

L'inserimento del PC dello spettrometro di massa nella rete locale consente l'accesso ad un'area condivisa nella quale si possono salvare le liste di lavoro generate da un puncher, anch'esso connesso via cavo ad un computer della rete locale secondo il paradigma master-slave. Una volta importata la lista dei campioni e la loro relativa posizione nella micropiastra, i campioni possono essere acquisiti dallo strumento. Prima dell'acquisizione i campioni sono trattati con una soluzione d'estrazione contenente una concentrazione conosciuta di *standard interni* (isotopi stabili delle molecole da dosare). Le concentrazioni delle molecole di interesse vengono calcolate confrontando le misure delle intensità degli analiti con quelle degli standard interni. La misurazione viene eseguita attraverso un software applicativo che consente di processare automaticamente gli spettri di massa e presentare i risultati in modo semplice.

3. Reti di calcolatori

Memorizzazione dei dati

Il laboratorio dispone di una base di dati per la memorizzazione dei dati. La base di dati si trova su un server collegato a tutti i pc del laboratorio secondo il *modello client-server*.

I vari client possono eseguire operazioni di lettura e scrittura della base di dati in base ai permessi ad ognuno concessi dal server. La scrittura avviene attraverso le interfacce con i vari strumenti di acquisizione ed elaborazione dei segnali (per mandare i risultati delle analisi nella BD) ed attraverso l'interfaccia grafica con gli utenti per la validazione tecnica e clinica dei risultati o per l'inserimento di commenti e note. L'utente può richiedere informazioni al server attraverso la stessa interfaccia grafica, selezionando i dati in base al numero identificativo dei campioni, al nome, cognome, ospedale di provenienza etc.

La rete LAN

Tutti i computer del laboratorio nonché tutti gli altri dispositivi elettronici sono connessi tra di loro attraverso la *rete LAN aziendale*. Si tratta di una rete LAN cablata che utilizza la *topologia switched Ethernet*: ogni computer si connette a un dispositivo chiamato switch. Ogni switch ha molte porte a ognuna delle quali può connettersi un computer. Il ruolo dello switch è di smistare i pacchetti tra i computer ad esso connessi.

Condivisione dei file

Il file system fornisce il meccanismo per la registrazione e l'accesso in linea a dati e programmi appartenenti al sistema operativo e a tutti gli utenti del sistema di calcolo. Il file system consiste di un insieme di file e di una struttura della directory che organizza tutti i file e fornisce le informazioni relative ad essi. La struttura a grafo della directory usata nel centro permette ad ogni utente di disporre della propria directory utente. Inoltre ciascuna directory utente di tutti i membri del gruppo contiene una sottodirectory di *file condivisi*.

Accesso remoto

Un insieme di unità d'elaborazione debolmente connesse (non condividono la memoria) tramite una rete di comunicazione rappresenta un sistema distribuito. Ciascuna unità d'elaborazione di un sistema distribuito considera remote le altre unità d'elaborazione del sistema e le rispettive risorse, mentre considera locali le proprie. Esistono due categorie di sistemi operativi orientati alle reti: i sistemi operativi di rete e i sistemi operativi distribuiti. Il laboratorio si avvale di un sistema operativo di rete che consente agli utenti di accedere alle risorse remote iniziando una sessione di lavoro sui calcolatori remoti. Per iniziare una *sessione di lavoro su un computer remoto* l'utente deve essere accreditato. Una volta stabilita la connessione tra i calcolatori i programmi di gestione della rete consentono all'utente di compiere le proprie elaborazioni sul calcolatore remoto come fosse un utente locale. In un sistema operativo distribuito gli utenti accedono alle risorse remote nello stesso modo in cui accedono alle risorse locali. I trasferimenti di dati e processi sono sotto il controllo del sistema operativo distribuito.

