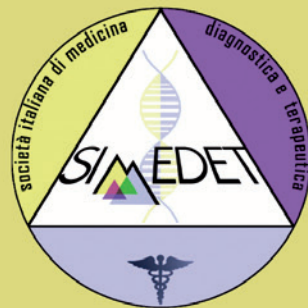


I J P  
D T M



*"organo ufficiale della"*

**SOCIETÀ ITALIANA DI MEDICINA  
DIAGNOSTICA E TERAPEUTICA**



VOLUME 2 - NUMERO 2

2019



SIMEDET.EU



PODCAST

# Italian Journal of Prevention, Diagnostic and Therapeutic Medicine (IJPDTM)

*Italian Journal of Prevention, Diagnostic and Therapeutic Medicine  
IJPDTM Vol2. N°2. 2019. For personal use only. No other uses without permission.  
Copyright © 2019 Simedet. All rights reserved.*

## SAFECAPSULE: INNOVAZIONE IN ANATOMIA PATOLOGICA PER LA GESTIONE DEL RISCHIO CHIMICO & CLINICO NELLE STRUTTURE SANITARIE

Martina Verri<sup>1</sup>, Anna Crescenzi<sup>1</sup>, Carmelo Lupo<sup>2</sup>, Roberto Virgili<sup>1</sup>

### ABSTRACT

La formaldeide, fissativo d'elezione in ambito sanitario, è stata ri-classificata sostanza cancerogena e mutagena con il Regolamento UE N. 895/2014.

Non essendo disponibili valide alternative per la fissazione dei campioni biologici destinati ad esame microscopico, l'industria ha proposto una serie di dispositivi pre-riempiti con rilascio di formalina alla chiusura, che hanno tuttavia mostrato diversi problemi logistici e di utilizzo.

Per una efficace gestione della formalina secondo le norme di sicurezza vigenti, è stato messo a punto dall'Università Campus Bio-medico di Roma e della azienda Diapath "un nuovo dispositivo a marchio CE-IVD: "SafeCapsule".

È costituito da un contenitore con tappo a vite blu pre-riempito con soluzione tampone e una capsula di sicurezza rossa contenente fissativo concentrato.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare le qualità e la sicurezza di SafeCapsule durante la pratica lavorativa in un Servizio di Anatomia Patologica. Per tale intento sono stati utilizzati un questionario di gradimento ed una serie di test di laboratorio.

Per gli operatori dei servizi sanitari SafeCapsule è risultato ergonomico,

pratico, di facile utilizzo e sicuro al 100%. I test di laboratorio hanno evidenziato: preservazione della morfologia cellulare e delle proprietà tintoriali dei componenti cellulari; assenza di artefatti di fissazione; accessibilità degli antigeni nucleari, ciplasmatici e di membrana; conservazione della specificità di legame delle sonde nelle indagini FISH (riarrangiamento dei geni ALK e ROS1, amplificazione del gene HER2) ed eseguibilità delle indagini molecolari (mutazioni a carico del gene EGFR) grazie alla purezza e alla qualità del DNA estratto.

In conclusione, si può affermare che SafeCapsule permette:

- eliminazione del rischio chimico e clinico in ambiente libero;
- superamento delle criticità tecniche legate ai dispositivi convenzionali;
- ottimale fissazione dei campioni biologici, condizioni basilari per una corretta diagnosi.

<sup>1</sup> UOC Anatomia Patologica, Policlinico Universitario Campus Bio-medico, Roma

<sup>2</sup> DIAPATH S.p.A, Martinengo (BG)

#### Parole chiave:

Formaldeide, rischio chimico/clinico, Safecapsule, Anatomia Patologica

#### Keywords:

Formaldehyde, Chemical/Clinical Risk, SafeCapsule, Pathology

## ABSTRACT

**F**ormaldehyde, as main fixative of choice in medical services, was reclassified as cancerous and mutagen by European Directive N. 895/2014.

Suitable substitutes to formaldehyde do not exist at the time, so industry has proposed a set of closed-circuit safety devices pre-filled with formalin.

These devices have shown a lot of technical failure, so the University Campus Bio-medico in collaboration with Diapath company have developed "SafeCapsule", in order to promote an effective management of formalin use in compliance with safety measures and directives.

SafeCapsule (patent pending) is composed by a blue screwcap container pre-filled with buffer solution and a safety red capsule pre-filled with concentrate fixative solution.

The aim of the work is to evaluate all intrinsic SafeCapsule features into the normal work routine. For operators of medical services, SafeCapsule is ergonomic, very handy, safe and easy to use. All lab tests have shown:

- intact cell morphology and cell features staining;
- accessibility of nuclear, cytoplasmic and membrane antigens;
- unaltered probe's specificity on DNA sites investigated (as ALK e ROS1 rearrangements, HER2 amplification) in FISH tests;
- good results in molecular investigations (EGFR mutations).

In conclusion SafeCapsule enables the great fixation of biological samples for right histological examinations; the elimination of chemical and clinical risk into the work place and the overcoming of technical failure of conventional devices.

## INTRODUZIONE

**L**a formaldeide, gas incolore e di odore pungente ed irritante, viene prodotta e commercializzata sotto forma di soluzione acquosa con il nome di formalina.

È il fissativo per eccellenza perché: facilmente reperibile, a basso costo, non si altera (se tenuta a temperatura normale e protetta dai raggi solari diretti), permette la conservazione della morfologia cellulare e dell'architettura del tessuto, garantisce protocolli standardizzati per l'indagine istochimica, immunoistochimica e molecolare.

Con il Regolamento UE N. 895/2014 la formaldeide è stata riclassificata sostanza cancerogena (categoria 1B) e mutagena (categoria 2) <sup>(1)</sup>.

Ad oggi non è disponibile un fissativo che sia una valida alternativa alla formaldeide.

Pertanto è stato necessario aggiornare il Documento di Valutazione dei Rischi secondo le indicazioni del Titolo IX del D.Lgs 81/08 e mettere in atto provvedimenti di tipo tecnico-organizzativo e procedurale secondo le linee guida emanate dal Ministero della Salute (LG Ministero della Salute C.S.S. Maggio 2015: Tracciabilità, raccolta, trasporto, archiviazione e conservazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di Anatomia Patologica) <sup>(2)</sup> e il documento di raccomandazioni stilato dalla Società Scientifica di Anatomia Patologica (Note relative all'utilizzo della formalina, riclassificata "cancerogena"- Linee di indirizzo SIAPEC-IAP Divisione Italiana Febbraio 2016) <sup>(3)</sup>.

Per eliminare o ridurre al minimo il rischio di esposizione alla formalina e ai suoi vapori in ambiente libero, l'industria ha proposto diverse soluzioni di contenitori "a vuoto" con rilascio di formalina alla chiusura. Nella pratica quotidiana tali contenitori hanno mostrato numerosi problemi tecnici, quali:

1. Aumento delle dimensioni rispetto ai contenitori convenzionali con conseguenti problemi logistici e di stoccaggio in magazzino;

2. Instabilità del contenitore a causa del peso concentrato nella parte superiore del contenitore;
3. Assenza di liquido per risciacquo pinza/ago e rilascio del campione biologico al momento del prelievo;
4. Impossibilità di riunire prelievi multipli in un unico contenitore dopo rilascio della formalina;
5. Essiccazione del campione biologico in caso di mancato rilascio della formalina;
6. Difficoltà di visualizzazione del campione nei contenitori contenenti i gel oleosi.

Per ovviare ai molteplici problemi dei dispositivi in commercio e per permettere una efficace gestione della formalina secondo le nuove norme di sicurezza, è stato proposto un nuovo dispositivo per la raccolta, la conservazione e/o il trasporto di campioni biologici.

Tale dispositivo, denominato “SafeCapsule”, è oggetto di brevetto da parte dell’Università Campus Bio-Medico di Roma e della azienda Diapath.

Dopo aver ottenuto il marchio CE-IVD per l’uso come dispositivo medico, è entrato in commercio ad ottobre 2018.

È caratterizzato da 2 contenitori distinti ma accoppiabili:

1. **Contenitore A**, che contiene una quantità di soluzione tamponata atossica per ospitare i campioni biologici, utilizzabile in ambiente libero in assenza di cappa chimica;
2. **Contenitore B**, che contiene una soluzione fissativa concentrata tossica/nociva per l’uomo.

Il fissativo viene ottenuto “in situ” per miscelazione delle due soluzioni dopo che i campioni biologici prelevati dal paziente sono stati posti nella soluzione tampone. Tale miscelazione si ottiene avvitando manualmente il contenitore 2 sul contenitore 1.

Il dispositivo siffatto offre vantaggi sorprendenti rispetto ai contenitori convenzionali, superando le problematiche che questi presentano e garantendo una totale assenza di contatto dell’operatore con sostanze tossiche e nocive e con i loro vapori.

FIG. 1 - DISPOSITIVO SAFECAPSULE



## OBIETTIVI

In accordo con SSPP del Campus Bio-Medico è stata fornita una campionatura di SafeCapsule per permettere, in primis, una valutazione da parte degli operatori circa le qualità e le funzionalità del dispositivo durante la pratica lavorativa.

In secundis, si è proceduto alla valutazione della conservazione morfologica e delle proprietà biochimiche e molecolari dei campioni (prelevati da diversi organi e apparati) a seguito della fissazione in tali dispositivi.

## METODI

Il dispositivo “SafeCapsule” è stato introdotto nella routine degli ambulatori chirurgici e dei laboratori del reparto di Anatomia Patologica del Policlinico Universitario Campus Biomedico ed è stato validato mediante la compilazione di una scheda di valutazione dedicata e distribuita agli addetti ai lavori.

A seguito della raccolta dei questionari, è stato elaborato un database, da cui è stato possibile estrapolare dati rilevanti sulle qualità e le funzionalità maggiormente apprezzate dagli operatori del settore.

Dal punto di vista della sicurezza ambientale, il Laboratorio di Anatomia Patologica è dotato di sensore di sicurezza per la rilevazione di vapori di formalina.

Al momento della consegna in laboratorio i contenitori sono stati posti sul tavolo di accettazione in prossimità del sensore per accertarne il contenimento dei vapori.

Dopo l'accettazione, i campioni biologici sono stati processati come di routine ed è stata valutata la capacità del dispositivo SafeCapsule di garantire una conservazione e una fissazione adeguata del campione biologico.

Per consentire una diagnosi istologica corretta ed evitare modiche delle caratteristiche strutturali del tessuto preso in esame, è condizione basilare il fissaggio completo e perfetto del campione biologico <sup>(4)</sup>.

Per tale ragione, la valutazione microscopica della morfologia e dell'architettura del tessuto è stata condotta attraverso test di laboratorio quali la colorazione Ematossilina-Eosina e le colorazioni speciali di istochimica quali Giemsa, PAS, Perls, Tricromica di Masson (Kit di colorazioni DIAPATH).

Altra procedura di analisi, condotta sui campioni per i quali è stato utilizzato il dispositivo SafeCapsule, è il test di immunohistochimica.

Questo è stato eseguito su sezioni in paraffina dei campioni processati per valutare l'espressione di specifiche proteine cellulari, la loro conservazione e l'assenza di artefatti di fissazione che possano impedirne l'accessibilità all'antigene da parte dell'anticorpo specifico utilizzato durante la reazione. I test di immunohistochimica sono stati effettuati su strumento automatizzato Dako Autostainer OMNIS, valutando i seguenti antigeni:

- Nucleari: Recettore per estrogeni o ER, Recettore per Progesterone o PGR, Ki67, p63, GATA3;
- Citoplasmatici: citocheratine ad alto e basso peso molecolare o CK, Racemasi, Hepar1;
- Di membrana: Antigene Epiteliale di Membrana o EMA, CD3, Her2neu.

Su campioni di tessuto mammario e polmonare è stata effettuata anche un'analisi FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) per rilevare e localizzare la presenza o l'assenza di riarrangiamenti dei geni ALK e ROS1 (FISH Probe Kit), utili per la caratterizzazione del carcinoma polmonare <sup>(5)</sup>, e l'amplificazione del gene Her2neu (PathVision Probe Kit), essenziale per la caratterizzazione del carcinoma mammario <sup>(6)</sup>.

Infine sono state condotte indagini di tipo molecolare, valutando in primis la purezza e la qualità del DNA estratto (QIamp DNA FFPE TISSUE QIAGEN) dai campioni fissati in SafeCapsule e in secundis la ricerca delle principali mutazioni a carico del gene EGFR mediante la tecnica di PCR (Easy EGFR Diatech Pharmacogenetics Kit).

## RISULTATI

I questionari distribuiti sono stati raccolti e i dati riportati in istogrammi:

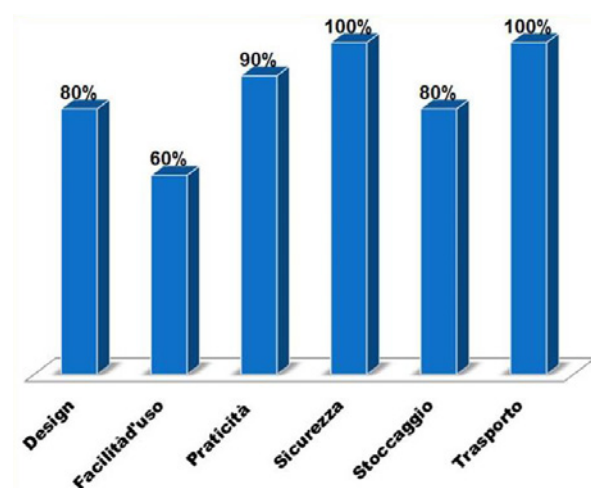


FIG. 2 - ISTOGRAMMA DEI DATI RACCOLTI SUL DISPOSITIVO SAFECAPSULE

A seguito della valutazione dei questionari, i dati ottenuti hanno dimostrato che il dispositivo SafeCapsule:

- è ergonomico, pratico e di facile utilizzo durante la pratica lavorativa;
- ha mostrato integrità al 100% e perfetta tenuta, senza il verificarsi di sversamenti di formalina durante il trasporto e/o perdita di materiale biologico;
- Il suo utilizzo è risultato sicuro al 100% senza dispersione dei suoi vapori;
- Ha mostrando un elevato gradimento da parte degli operatori dei servizi sanitari.

Il monitoraggio ambientale non ha registrato presenza di gas di formaldeide nell'aria.

Alla valutazione microscopica, in tutti i casi esaminati, la morfologia cellulare è risultata di alta qualità con preservazione delle proprietà tintoriali dei componenti cellulari (basofilia e acidofilia) e con elevata risoluzione nella visualizzazione dei caratteri di rilievo diagnostico.

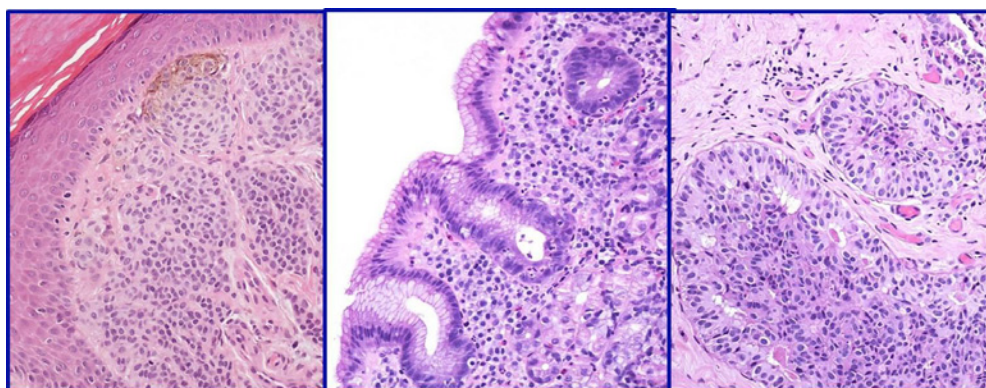


FIG. 3 - COLORAZIONE EE SU CUTE, BIOPSIA GASTRICA E BIOPSIA EPATICA

Anche le colorazioni di istochimica allestite per evidenziare specifici costituenti cellulari sono risultate perfettamente eseguibili e coerenti nei risultati, mostrando ottimo mantenimento delle proprietà tintoriali.

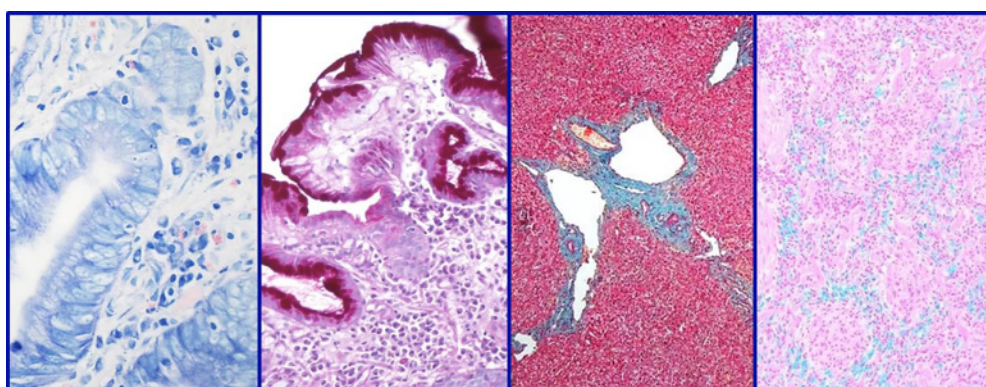


FIG. 4 - COLORAZIONI ISTOCHIMICHE SPECIALI: GIEMSA, PAS, TRICROMICA DI MASSON E PERLS

I test immunohistochimici hanno mostrato una perfetta conservazione dell'antigene e della sua accessibilità ed elevata pulizia di segnale senza presenza di fondo aspecifico di colorazione.

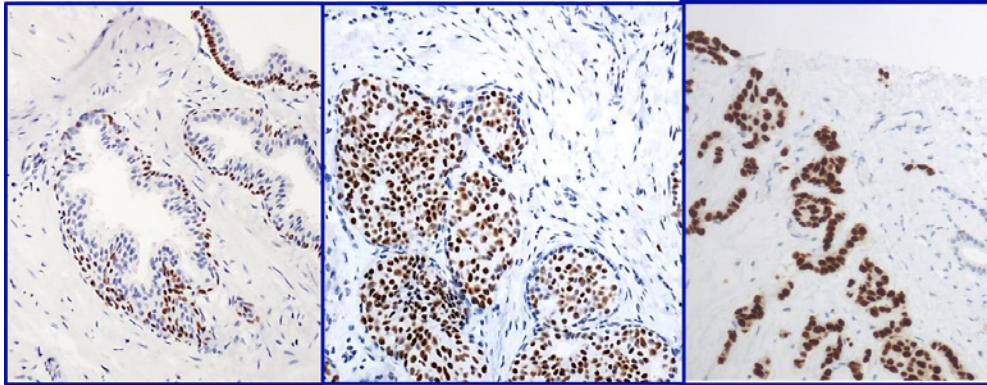


FIG. 5 - REAZIONI DI IMMUNOISTOCHEMICA PER ANTIGENI NUCLEARI (P63, ER, GATA3)

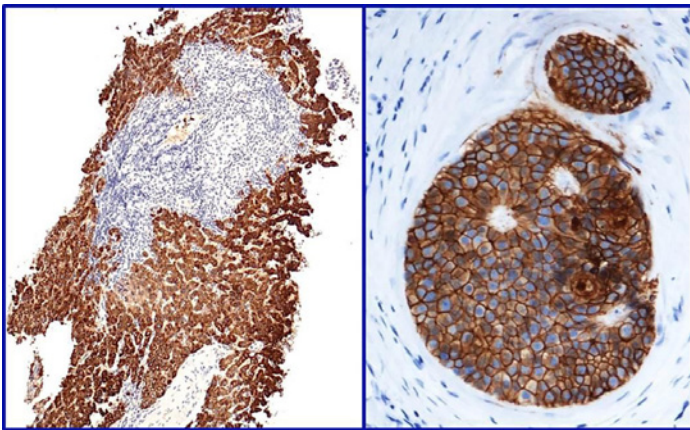


FIG. 6 - REAZIONI DI IMMUNOISTOCHEMICA PER L'ANTIGENE CITOPLASMATICO, HEPAR1, E DI MEMBRANA, HER2NEU

L'indagine FISH è risultata eseguibile con eccellente conservazione della specificità del legame delle sonde.

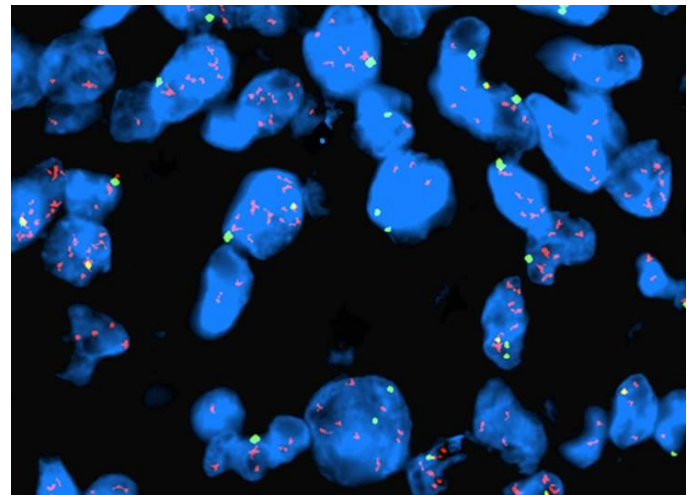


FIG. 7 - FISH PER L'AMPLIFICAZIONE DEL GENE HER2NEU

Inoltre il DNA estratto da campioni biologici fissati ha mostrato una buona concentrazione e rapporto A260/280 e le successive analisi mutazionali hanno confermato che i campioni fissati con SafeCapsule sono perfettamente utilizzabili per le indagini molecolari.

## DISCUSSIONE

**L**a sicurezza dell'ambiente di lavoro è un tema attuale e di grande rilievo e l'attività sanitaria espone spesso i lavoratori a sostanze potenzialmente dannose, basti pensare alla preparazione dei chemioterapici o, come nel caso degli esami istologici, all'uso di fissativi aldeidici.

Nelle aree lavorative dove la formaldeide è utilizzata di routine, la soluzione generalmente applicata è l'uso di cappe chimiche per la manipolazione dei campioni.

Tali dispositivi non sono tuttavia implementabili, per questione di spazi e di costi, negli ambulatori e nelle sale endoscopiche o chirurgiche, dove i campioni vengono raccolti e posti in fissativo.

Si è pertanto reso necessario studiare dei contenitori precaricati a rilascio post-chiusura, che evitassero la dispersione ambientale dei vapori di formalina.

Numerosi dispositivi sono entrati sul mercato negli ultimi anni, la maggior parte basata su contenitori con una camera vuota in cui introdurre il campione ed una camera con la formalina che viene rilasciata dopo la chiusura per permettere la fissazione.

Sebbene tale soluzione sia generalmente efficace in termini di protezione ambientale, l'uso ne è risultato complesso sia per motivi logistici (raddoppio dell'ingombro) che per difficoltà pratiche quali il difficile rilascio del campione nella camera vuota e l'impossibilità di inserire un secondo prelievo dopo il rilascio del fissativo.

Non ultimo si deve considerare che nel caso di mancato rilascio del fissativo per difetto o per dimenticanza, il campione viene danneggiato irrimediabilmente per essiccazione.

Il progetto brevettuale di SafeCapsule ha superato tutte queste complessità separando una parte liquida non dannosa (non necessita di pittogrammi) e tamponata, da una parte tossica concentrata che si

aggiunge solo dopo completamento delle procedure di prelievo dal paziente.

Dopo l'avvitamento della capsula superiore, la miscelazione delle due sostanze è immediata ed è stata studiata affinché la produzione del fissativo "in situ" sia completa e veloce.

Gli studi che abbiamo condotto su morfologia, conservazione delle proprietà antigeniche e mantenimento dei requisiti per le indagini molecolari e FISH hanno dimostrato che la soluzione di formalina, ricostituita al momento della chiusura del SafeCapsule, ha tutte le qualità richieste per la moderna diagnostica istologica ed è assolutamente comparabile alle soluzioni di formalina già complete al momento dell'uso.

Questo dato assume particolare importanza in considerazione dei numerosi esami di patologia molecolare che attualmente sono richiesti su materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina <sup>(7)</sup>.

Di particolare rilevanza è stato il gradimento degli operatori espresso mediante la compilazione del questionario, circa la praticità d'uso e la facilità di trasporto.

L'aspetto più apprezzato è stata la sicurezza, confermata dalla valutazione ambientale mediante sensore specifico, tarato su standards internazionali.

## DISCUSSIONE

**I**n conclusione possiamo complessivamente affermare che:

- Il dispositivo SafeCapsule ha mostrato un elevato gradimento da parte degli operatori dei servizi sanitari per Trasporto, Praticità e Sicurezza. Consente un isolamento dei componenti dannosi e nocivi in ambiente libero, eliminando il rischio chimico e clinico;



- SafeCapsule garantisce il superamento delle criticità logistiche e di utilizzo legate ai dispositivi convenzionali, grazie alle sue qualità e funzionalità;
- SafeCapsule permette una conservazione e fissazione ottimale del campione biologico, che rappresentano le condizioni basilari per una corretta diagnosi istologica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (UE) N. 605/2014 della Commissione Europea del 5 giugno 2014 recante modifica, ai fini dell'introduzione di indicazioni di pericolo e consigli di prudenza (...) del regolamento europeo n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele
2. Ministero della Salute – Consiglio Superiore di Sanità Sezione I : Linee Guida Tracciabilità, Raccolta, Trasporto, Conservazione e Archiviazione di cellule e tessuti per indagini diagnostiche di Anatomia Patologica
3. Note relative all'utilizzo della formalina, ri-classificata "cancerogena" - Linee di indirizzo SIAPEC-IAP Divisione Italiana (Febbraio 2016)
4. Donczo B, Guttman A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Jun 5;155:125-134. doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.065. Epub 2018 Apr 2. Review. PubMed PMID: 29627729
5. Barbareschi M, Barberis M, Buttitta F, Doglioni C, Fiorentino M, Fontanini G, Franco R, Marchetti A, Rossi G, Troncone G. Predictive markers in lung cancer: a few hints for the practicing pathologist. *Pathologica.* 2018 Mar;110(1):29-38. Review. PubMed PMID: 30259911
6. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet.* 2017 Mar 18;389(10074):1134-1150. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8. Epub 2016 Nov 17. Review. PubMed PMID:27865536
7. Fairley JA, Gilmour K, Walsh K. Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. *Curr Drug Targets.* 2012 Nov;13(12):1475-87. Review. PubMed PMID: 22974391