



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Microchirurgiche e Mediche

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Delle Professioni Sanitarie Tecniche

Diagnostiche

Presidente Prof. Ciriaco Carru

## **LA GESTIONE DEI CONTROLLI DI QUALITÀ DEGLI EMOCOMPONENTI E CRITICITÀ IN UN SERVIZIO IMMUNOTRASFUSIONALE. LA PROBLEMATICHE DELLA LEUCODEPLEZIONE.**

**Relatore:**

**Prof. Ciriaco Carru**

**Correlatore:**

**Dott. Gioacchino Greco**

**Tesi di Laurea di:**

**Stefania Pasqualina Serra**

**Anno Accademico 2015/2016**

## INDICE

1. Introduzione.....	1
2. Il servizio immunotrasfusionale .....	3
2.1 Il complesso quadro normativo .....	5
2.2 Accreditamento e qualità.....	12
3. Il controllo di qualità degli emocomponenti.....	16
3.1 La leucodeplezione.....	16
4. Scopo della tesi .....	21
5. Materiali e metodi .....	23
5.1 Emocomponenti .....	23
5.2 Separazione e scomposizione da sangue intero.....	23
5.2.1 Concentrato eritrocitario leucodepleto e risospeso in soluzione additiva con filtrazione pre-storage.....	24
5.2.2 Concentrato eritrocitario leucodepleto lavato.....	24
5.2.3 Concentrati piastrinici da pool di buffy-coat leucodepleti .....	25
5.3 Aferesi produttive .....	26
5.3.1 Concentrato eritrocitario leucodepleto da aferesi .....	26
5.3.2 Concentrati piastrinici da aferesi leucodepleti.....	26
5.4 Il controllo di qualità degli emocomponenti .....	27
5.5 Campionamento .....	31
5.5.1 CELL-DYN 3700 .....	32
5.5.2 Tecnologia ADAM- rWBC.....	35
5.5.3 ADVIA 2120.....	37
5.6 Rivalutazione del campione .....	39
5.7 Analisi statistica.....	39
6. Risultati.....	40
7. Discussione e Conclusioni .....	49
8. Bibliografia.....	52

## 1. Introduzione

Da diverso tempo le attività trasfusionali sono sottoposte a diverse normative Europee e Nazionali; esse inoltre sono regolamentate da un dettagliato e severo sistema di qualità dovuto sia alla necessità di evitare eventi avversi sia dal garantire un prodotto standardizzato e controllato in ogni sua fase di produzione, stoccaggio, manipolazione, etc.

La gestione di un Centro Immunotrasfusionale non può prescindere dal sottostare ad una serie di normative esistenti ed in continua evoluzione che hanno modificato negli anni il panorama legislativo cambiandolo profondamente. Soprattutto negli ultimi anni ci si è resi conto che le attività trasfusionali dovevano essere regolamentate in ogni sua parte grazie anche all'avvento di diverse normative europee. Le normative europee sono poi state recepite in Italia con vari decreti legislativi, una fra tutte la legge quadro n.219 del 21 ottobre 2005 [1] che pone la cornice alle più moderne pratiche trasfusionali.

Negli anni è cresciuta anche l'esigenza di adeguare un moderno sistema di qualità, fondamentale per gli emocomponenti e il loro controllo, regolamentato anch'esso con vari decreti legislativi tra i quali il decreto del 2 novembre 2015 sulle "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" [2]. L'incremento del sistema di qualità e l'esigenza di controllare ogni singolo processo dell'attività trasfusionale nasce dal cercare di eliminare e limitare diversi errori ed eventi avversi accaduti soprattutto in passato, ma anche dal rafforzarsi delle nuove tecnologie con l'obiettivo di produrre un prodotto sicuro ed efficace per il paziente.

Il management, l'organizzazione e la gestione dei controlli di qualità degli emocomponenti gioca un ruolo chiave in quanto dalla loro gestione dipende la validazione, la sicurezza e l'efficacia dell'emocomponente stesso.

Nel SIT di Alghero, grazie ai nuovi decreti legislativi che dettano controlli sempre più stringenti e l'incremento dei controlli di qualità sugli emocomponenti, ci si è resi conto che il numero dei leucociti dopo leucodeplezione risultavano spesso più alti rispetto ai parametri minimi previsti dalle norme.

Questo studio è focalizzato sulla gestione dei controlli di qualità degli emocomponenti e vuole analizzare un processo critico rilevato nel tempo da diversi operatori dimostrando come, anche un semplice controllo di qualità, possa incidere su aspetti finanziari, economici e utilizzo di risorse umane.

## **2. Il servizio immunotrasfusionale**

Il sistema trasfusionale in Italia è pubblico e fa parte del Sistema Sanitario Nazionale. Il suo compito è principalmente quello di prestare servizi di diagnosi e cura di medicina trasfusionale e svolge attività di produzione che comprendono, oltre agli emocomponenti ad uso trasfusionale, anche la raccolta del plasma, il trattamento e la conservazione delle cellule staminali emopoietiche [3].

Il sistema trasfusionale nazionale è fondato su diversi principi :

- la donazione volontaria, periodica, responsabile, anonima e gratuita del sangue e suoi componenti grazie al ruolo assunto dalle associazioni e federazioni di volontariato, istituzionalmente riconosciuti;
- il perseguimento dell'autosufficienza regionale e nazionale di sangue, emocomponenti e farmaci emoderivati come obiettivo strategico nazionale ;
- efficace tutela della salute dei cittadini (donatori e pazienti) attraverso un'accurata applicazione dei sistemi di controllo sulla sicurezza del sangue raccolto e trasfuso e della rete di emovigilanza sulle corrette applicazioni delle procedure di somministrazione in ambito ospedaliero e la sorveglianza delle malattie infettive trasmissibili, la gratuità del sangue e dei suoi componenti per tutti i cittadini;
- lo sviluppo della medicina trasfusionale e l'impiego clinico appropriato degli emocomponenti dei farmaci emoderivati;

L'autosufficienza di sangue e derivati costituisce un interesse nazionale sovraregionale e sovraaziendale non frazionabile e per il suo raggiungimento è richiesto il contributo delle regioni e delle aziende sanitarie; Il sistema trasfusionale si occupa principalmente di promozione del dono del sangue, raccolta di sangue, emocomponenti e cellule staminali emopoietiche autologhe, omologhe e cordonali, il loro

trattamento con mezzi fisici semplici, qualificazione biologica, validazione, conservazione e distribuzione del sangue umano e dei suoi componenti; inoltre si occupa di attività di medicina trasfusionale e produzione di farmaci emoderivati. [4]

Il Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale (SIT) del Presidio Ospedaliero di Alghero fa parte del Dipartimento Aziendale di Patologia Clinica e Immunotrasfusionale dell'azienda ATS Sardegna, ASSL Sassari. Il Servizio Immunotrasfusionale è stato Accreditato Istituzionalmente con delibera RAS n.683 del 30/06/2015 e i servizi di cui si occupa sono:

- raccolta, lavorazione, conservazione, assegnazione e distribuzione di emocomponenti;
- diagnostica immunoematologica;
- Screening delle Microcitemie e trattamento della talassemia;
- Aferesi terapeutica;
- Ambulatorio Trasfusionale per i pazienti affetti da patologie ematologiche;
- Partecipazione alla raccolta del Sangue Cordonale.

Verrà fatto un piccolo excursus sulla normativa che ha apportato grandi modifiche al settore trasfusionale negli anni e di fondamentale importanza per raggiungere gli obiettivi prefissati. Sicuramente con la legge n. 219 del 21 ottobre 2005 [1] si è ridisegnato il sistema nazionale per lo svolgimento delle attività trasfusionali. Con questa legge l'Italia ha rafforzato l'impegno diretto a conseguire l'autosufficienza nazionale di sangue ed emocomponenti per cercare di raggiungere gli obiettivi di efficacia, efficienza, equità ed omogeneità di cura ed appropriatezza.

## 2.1 Il complesso quadro normativo

I servizi di medicina trasfusionale devono rispondere a specifici requisiti stabiliti dalle norme e negli anni il quadro normativo è stato rivoluzionato profondamente. Brevemente in questo capitolo saranno citate le norme più importanti che si sono susseguite soprattutto negli ultimi anni grazie al crescente utilizzo degli emocomponenti.

Nel 1967 fu emanata in Italia la prima legge organica sul servizio trasfusionale, la Legge 592, con i relativi regolamenti applicativi (1971)[5]. Negli anni successivi tanti Stati emanarono leggi e disposizioni per armonizzare i sistemi di raccolta e produzione del sangue. Durante quegli anni i Servizi Trasfusionali svolgevano attività come immunoematologia di base, raccolta di sangue intero in flaconi sterili, conservazione e distribuzione degli stessi con poche indagini di controllo di laboratorio. Solo nei primi anni '70 si introdussero le sacche sterili di plastica, multiple e in sistema sterile riducendo il rischio d'inquinamento e contaminazione degli emocomponenti stessi. Nel 1990, per meglio rispondere alle direttive europee, è stata varata in Italia la Legge 107, di seguito furono emanati i vari decreti applicativi. Ma il crescente e progressivo utilizzo del sangue a scopi terapeutici ha fatto sì che negli ultimi anni si delineasse un aumento dell'attività normativa finalizzata a garantire sempre di più la qualità e la sicurezza in tutte le attività trasfusionali dalla raccolta, controllo, trasformazione, conservazione e distribuzione del sangue umano e dei suoi componenti [6].

Il quadro normativo risulta molto complesso, formato da una produzione legislativa a livello comunitario e conseguentemente nazionale che ha avuto un'intensificazione tra gli anni 2005-2007. I provvedimenti normativi di matrice comunitaria sono essenzialmente finalizzati a stabilire omogenei livelli di qualità e sicurezza dei prodotti e delle prestazioni trasfusionali su tutto il territorio dell'unione europea. Ogni stato Europeo è stato impegnato a rendere conformi le attività trasfusionali alle disposizioni

di matrice comunitaria formalizzando il recepimento delle direttive attraverso l'emanazione di nuovi atti normativi. Lo scenario normativo che si è configurato risulta pertanto molto complesso in termini di relazioni fra normative europee e normative nazionali soprattutto per la necessità di armonizzare gli atti di recepimento delle direttive comunitarie con le disposizioni legislative nazionali esistenti. Il Sistema trasfusionale risulta oggi compiutamente regolamentato in ogni sua attività, pur nella previsione della introduzione di nuovi e più stringenti requisiti di qualità per le attività produttive, in particolare per il prodotto plasma come materia prima per la produzione di medicinali secondo le buone norme di fabbricazione o Good Manufacturing Practices di matrice farmaceutica.

Brevemente le principali direttive europee che sono state emanate nel corso degli anni e poi recepite in Italia attraverso nuovi atti normativi sono:

- la Direttiva 2002/98/CE del parlamento europeo e del consiglio del 27 gennaio 2003 che stabilisce le norme di qualità e di sicurezza per la raccolta, il controllo, la lavorazione, la conservazione e la distribuzione del sangue umano e dei suoi componenti e che modifica la precedente direttiva 2001/83/CE. La direttiva prevedeva un'unificazione per quanto riguardava i requisiti di qualità e sicurezza dei prodotti e delle prestazioni delle attività trasfusionali su tutto il territorio della comunità europea introducendo così una serie di norme.
- La Direttiva 2002/98/CE è stata recepita tramite il Decreto legislativo n°191 del 19/08/2005, successivamente modificato dal Decreto legislativo n° 261 del 20 dicembre 2007 "Revisione del decreto legislativo 19 agosto 2005, n. 191, recante attuazione della direttiva 2002/98/CE che stabilisce norme di qualità e di sicurezza



per la raccolta, il controllo, la lavorazione, la conservazione e la distribuzione del sangue umano e dei suoi componenti”.

- La Direttiva della commissione europea del 22 marzo 2004 2004/33/CE, applicazione della direttiva 2002/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa ad alcuni requisiti tecnici del sangue e degli emocomponenti, che ha portato alla promulgazione del DM 3 marzo 2005 “Protocolli per l'accertamento dell'idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti”.
- La Direttiva 2005/61/CE del 30/09/2005 e la Direttiva 2005/62/CE del 30/09/2005 che applicano la direttiva 2002/98/CE rispettivamente in merito a “Prescrizioni in tema di rintracciabilità e la notifica di effetti indesiderati ed incidenti gravi” e le “Norme e le specifiche comunitarie relative ad un sistema di qualità per i servizi trasfusionali”, recepite a livello nazionale dal decreto legislativo 9 novembre 2007 n. 207 e dal decreto legislativo 6 novembre 2007 n. 208.
- La Direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004 "sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
- la Direttiva 2006/17/CE della Commissione Europea dell'8 febbraio 2006"che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio su prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani"

- la Direttiva 2006/86/CE della Commissione Europea del 24 ottobre 2006 "che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani"
- Direttiva 2014/110/UE della Commissione Europea del 7 dicembre 2014 "che modifica la direttiva 2004/33/CE per quanto riguarda i criteri di esclusione temporanea di donatori di unità allogeniche"

Una delle norme più importanti è sicuramente la legge n.219 del 21 ottobre 2005, definita la norma quadro perché utilizzata come principale riferimento per tutte le attività trasfusionali:"Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati"[1].La legge 219 ha ridefinito i principi fondanti per lo svolgimento delle attività trasfusionali definendo gli obiettivi strategici, includendo la raccolta delle cellule staminali emopoietiche, la produzione nazionale di farmaci emoderivati e introducendo elementi innovativi come l'istituzione di alcuni organismi nazionali.

Con la legge 219 lo Stato detta i principi fondamentali in materia di attività trasfusionali allo scopo di conseguire le seguenti finalità:

- il raggiungimento dell'autosufficienza regionale e nazionale di sangue, emocomponenti e farmaci emoderivati; viene stabilito che l'autosufficienza nazionale e regionale del sangue e dei suoi prodotti rappresenta un interesse nazionale sovraregionale e sovraziendale non frazionabile, a cui concorrono le Regioni e le Aziende sanitarie. L'autosufficienza mira a garantire a tutti i cittadini la disponibilità quantitativa e qualitativa dei prodotti e delle

prestazioni trasfusionali necessari per l'erogazione dei Livelli essenziali di assistenza ed è fondata sulla donazione volontaria, periodica, responsabile e non remunerata. A tal fine partecipano le Associazioni e Federazioni di donatori volontari di sangue tramite la promozione e lo sviluppo della donazione di sangue:

- una più efficace tutela della salute dei cittadini attraverso il conseguimento dei più alti livelli di sicurezza raggiungibili nell'ambito di tutto il processo finalizzato alla donazione ed alla trasfusione del sangue;
- condizioni uniformi del servizio trasfusionale su tutto il territorio nazionale;
- lo sviluppo della medicina trasfusionale, del buon uso del sangue e di specifici programmi di diagnosi e cura che si realizzano in particolare nell'ambito dell'assistenza a pazienti ematologici ed oncologici, nel sistema urgenza-emergenza e dei trapianti.
- le attività delle associazioni e federazioni dei donatori di sangue e di cellule staminali emopoietiche e delle associazioni e federazioni delle donatrici di sangue da cordone ombelicale;
- la previsione di organismi di coordinamento centrali e regionali: la Consulta tecnica permanente per il sistema trasfusionale (ora Comitato tecnico-sanitario del Ministero della salute-Sezione tecnica per il Sistema trasfusionale), il Centro Nazionale Sangue (CNS) e le Strutture regionali di coordinamento per le attività trasfusionali (SRC)
- la definizione dei Livelli essenziali di assistenza (LEA) per quanto riguarda le attività trasfusionali
- le indicazioni per la revisione dei requisiti autorizzativi e di accreditamento di settore
- le linee di indirizzo per la qualità e la sicurezza dei prodotti e delle prestazioni dei servizi trasfusionali.

Con l'entrata in vigore dell'accordo Stato-Regioni del 16 dicembre 2010 si è avuto un ulteriore adeguamento del sistema trasfusionale nazionale alle direttive europee che prevedevano la garanzia di omogenei livelli di qualità e sicurezza dei prodotti e delle prestazioni. L'accordo Stato-Regioni del 16 dicembre 2010 (accordo tra il governo, le regioni e le provincie autonome di Trento e Bolzano) definisce i "Requisiti minimi organizzativi, strutturali e tecnologici delle attività sanitarie dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta del sangue e degli emocomponenti" (Allegato A) e il "Modello per le visite di verifica dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta" (Allegato B) ai fini dei processi di autorizzazione e accreditamento degli stessi [7] definito in applicazione dell'art.19 della legge 21 ottobre 2005 n.219. Il termine ultimo per il completamento del percorso intrapreso, inizialmente fissato al 31 dicembre 2014 "conversione in legge con modificazioni del decreto legge 29 dicembre 2010, n 225, recante proroga di termini previsti da disposizioni legislative e di interventi urgenti in materia tributaria e di sostegno alle imprese e alle famiglie [8], è stato poi slittato al 30 giugno 2015 dal decreto legge 31 dicembre 2014, n.192 recante proroga di termini previsti da disposizioni legislative [9], convertito, con modificazioni, dalla legge 27 febbraio 2015, n.11 (articolo 7, comma 1) [10].

Con l'accordo tra Governo, Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano del 20 ottobre 2015 "Indicazioni in merito al prezzo unitario di cessione, tra aziende sanitarie e tra Regioni e Province autonome, delle unità di sangue, dei suoi componenti e dei farmaci plasmaderivati prodotti in convenzione, nonché azioni di incentivazione dell'interscambio tra le aziende sanitarie all'interno della regione e tra le regioni" sono stati approvati i prezzi unitari (le tariffe) tra le strutture sanitarie pubbliche e private e tra le Regioni e Province autonome così come le tariffe di cessione dei medicinali plasma derivati. Inoltre viene ribadito che gli emocomponenti devono essere conformi ai requisiti di qualità e sicurezza

prevista dalle norme vigenti. L'accordo sottolinea la valenza strategica dell'autosufficienza nazionale e delle necessità di incentivare l'interscambio tra le aziende sanitarie all'interno della regione e tra le regioni e stabilisce tariffe uniche a livello nazionale.

Il decreto 2 novembre 2015 sulle "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" cerca di conciliare le disposizioni normative sulla qualità e la sicurezza del sangue e dei suoi prodotti al progresso scientifico e tecnologico e alle normative europee sostituendo i decreti 3 marzo 2005 sui "protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti" e "caratteristiche e modalità per la donazione del sangue e di emocomponenti". Le disposizioni del decreto si applicano al sangue e agli emocomponenti raccolti dalla donazione volontaria e non remunerata compresi gli emocomponenti utilizzati per la produzione di medicinali derivati dal sangue e dal plasma, gli emocomponenti per uso non trasfusionale, gli emocomponenti per uso autologo, le cellule staminali emopoietiche e altri componenti cellulari raccolti dal sangue periferico nonché il sangue da cordone ombelicale. Il decreto aggiorna e revisiona su diversi argomenti molto importanti come informazioni e tutela della riservatezza, idoneità alla donazione, esami obbligatori ad ogni donazione e controlli periodici, cellule staminali emopoietiche (CSE) e linfociti, procedure e modalità per la donazione di sangue intero ed emocomponenti, preparazione, etichettatura, conservazione e trasporto del sangue intero e degli emocomponenti, richiesta e assegnazione degli emocomponenti e sicurezza della trasfusione, tracciabilità dei sistemi informatici e programmi di prevenzione. Al presente decreto si aggiungono 12 allegati tecnici per le diverse fasi del percorso trasfusionale, che vanno dalla selezione del donatore fino alla trasfusione; inoltre vengono introdotte nuove misure per la sicurezza degli emocomponenti prodotti e per la sicurezza della trasfusione stessa con riferimento alla prevenzione delle

reazioni da incompatibilità e per la sicurezza della trasfusione a letto del paziente[2].

Tra i decreti più recenti degni di rilievo vi sono il decreto 2 dicembre 2016 “Disposizioni sull’importazione ed esportazione del sangue umano e dei suoi prodotti”[11] e il decreto 2 dicembre 2016 sul Programma nazionale plasma e medicinali plasmaderivati, anni 2016-2020 in cui vengono stabiliti i principi di riferimento e obiettivi strategici da perseguire nel quinquennio 2016-2020 per il raggiungimento dell’obiettivo dell’autosufficienza nazionale del plasma e dei MPD (Medicinali Plasma Derivati) sancito dalla Legge 21 ottobre 2005, n. 219[12].

## **2.2 Accreditamento e qualità**

Le diverse direttive Europee e le numerose normative nazionali in tema sanitario sono nate dalla necessità di garantire un livello di qualità e uno standard in linea con il livello comunitario. Particolare importanza ha assunto il ruolo dell’accreditamento istituzionale che rappresenta il processo attraverso il quale le strutture autorizzate acquisiscono lo status di soggetto idoneo all’erogazione di prestazioni sanitarie per conto del SSN e quindi si trasformano in potenziali erogatori.

Il percorso di accreditamento/autorizzazione del sistema trasfusionale è stato molto lungo e proprio nel triennio 2013-2015 si è verificata una profonda trasformazione della rete trasfusionale italiana per l’entrata in vigore dell’accordo Stato regioni/province autonome del 16 dicembre 2010 “sui requisiti minimi organizzativi, strutturali e tecnologici delle attività sanitarie dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta e sul modello per le visite di verifica” [7] e dell’Accordo Stato Regioni/Province Autonome del 25 luglio 2012 recante “linee guida per l’accreditamento dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta di sangue e di emocomponenti” [13-14].

Il percorso, obbligatorio per i servizi trasfusionali e per le UdR a gestione associativa, prevede che l'attestazione della conformità ai requisiti organizzativi, strutturali e tecnologici di matrice europea sia conseguita attraverso i processi regionali di autorizzazione e accreditamento, con l'obbligo in tutte le Regioni e Province autonome di verificare in loco le suddette strutture almeno ogni due anni, avvalendosi dei team di verifica regionali integrati da almeno un valutatore iscritto in un elenco nazionale di valutatori specificamente formati e qualificati a cura del Centro Nazionale Sangue (CNS). Il CNS ha inoltre emanato, con l'Accordo Stato-Regioni del 25 luglio 2012, le "Linee guida per l'accreditamento dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta del sangue e degli emocomponenti", che delineano le modalità per garantire omogenei livelli di qualità e di sicurezza di produzione e di qualificazione biologica degli emocomponenti [15].

Il sistema qualità è un sistema che prevede il controllo delle forniture, gestione del sistema di produzione e erogazione del servizio e assicura la soddisfazione del cliente con servizi e prodotti conformi a standard definiti. Le norme UNI EN ISO 9000 indicano i requisiti fondamentali per il sistema di qualità aziendali e indicano le modalità di attuazione di questi requisiti. Presupposto fondamentale delle norme UNI EN ISO 9000 è che tutto quello che viene fatto, e che è importante ai fini del raggiungimento della qualità, deve essere scritto per renderlo il più oggettivo e standardizzato possibile. Attualmente nelle strutture trasfusionali viene utilizzato il modello UNI EN ISO 9001:2008.

È stato molto difficile applicare questa politica per la qualità alla sanità ma ormai, da molto tempo, è diventata una parte integrante della programmazione sanitaria nazionale. Tutti i Piani Sanitari Nazionali (PSN), elaborati a partire dall'emanazione del D.Lgs. 502/1992 e successive modificazioni, hanno previsto lo sviluppo di forme integrate di attività per il miglioramento della qualità.

Come già sottolineato il sistema qualità nel settore immunotrasfusionale gioca un ruolo principale; in particolare lo sviluppo di un sistema di qualità è un presupposto essenziale per ridurre i rischi della trasfusione e per garantire il beneficio terapeutico ai pazienti che ricevono sangue e/o suoi prodotti derivati. La necessità di assicurare qualità ed efficacia insieme alla massima riduzione dei rischi è sempre stato uno dei principali obiettivi delle norme. Il sistema di gestione della qualità comprende la gestione, la garanzia e il miglioramento costante della qualità, il personale, i locali e l'attrezzatura, la documentazione, la raccolta, il controllo e la lavorazione, la conservazione, la distribuzione, il controllo della qualità, il ritiro degli emocomponenti, gli audit esterni e interni, la gestione dei contratti, le non conformità e l'autocontrollo[16].

L'organizzazione della qualità è un sistema integrato che garantisce che tutte le componenti e le attività siano in grado di influenzare la qualità totale. Infatti, negli ultimi anni, il concetto di qualità si è evoluto passando dal controllo di qualità del prodotto finale (che metteva in evidenza ma non preveniva gli errori) al concetto di qualità totale che, attraverso strategie definite e l'implementazione di procedure operative standard, porta alla garanzia di qualità di tutto il processo produttivo (e che include anche il controllo di qualità). La garanzia di qualità può quindi essere definita come l'insieme delle attività pianificate e svolte per assicurare che tutti i sistemi e gli elementi che possono influenzare la qualità dei prodotti funzionino come atteso e siano affidabili. Per portare avanti la politica della qualità deve essere raccolta tutta la documentazione e aggiornata periodicamente sulla base delle leggi vigenti. Lo scopo di un sistema di qualità connesso con le attività trasfusionali è quello di assicurare una buona ed uniforme sicurezza; la documentazione dovrà pertanto contenere informazioni circa l'adozione, la verifica della persistenza e l'implementazione di standard specifici riguardo a:

- organizzazione



- personale
- attrezzature
- qualificazione dei fornitori
- controllo dei processi, ispezione finale e gestione
- gestione della documentazione
- incidenti, errori ed accidenti
- valutazione interna ed esterna
- valutazione dei risultati di salute
- valutazione delle modalità di utilizzo del sangue e dei suoi prodotti
- programmi di miglioramento del processo
- misure generali di sicurezza [17].

### **3. Il controllo di qualità degli emocomponenti**

La qualità è importante per ogni fase nel sistema trasfusionale ma assume particolare rilevanza nella produzione degli emocomponenti. Il processo produttivo degli emocomponenti può essere equiparato a un processo di produzione di prodotti farmaceutici in un'azienda, proprio per questo la sua produzione deve essere conforme alle normative. A tal proposito il 28 dicembre è stato pubblicato in Gazzetta Ufficiale il decreto 2 novembre 2015 "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti"[2]. Il decreto nasce dall'esigenza di adeguare le disposizioni normative sulla qualità e la sicurezza del sangue e dei suoi prodotti al progresso in ambito scientifico e tecnologico.

In particolare in questa tesi verrà prestata particolare attenzione al controllo di qualità degli emocomponenti e ad una problematica rilevata durante questi controlli. I controlli di qualità vengono effettuati principalmente per garantire la sicurezza ed efficacia su ogni emocomponente. Il SIT deve sempre garantire che tutti gli emocomponenti prodotti rispondano alle specifiche qualitative previste dalle normative e a tal fine si predispongono delle procedure atte a regolamentare la definizione, pianificazione e esecuzione dei controlli di qualità degli emocomponenti prodotti. Possono essere adottati anche standard di prodotto aggiuntivi conformi ai principi e agli standard previsti dalla *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components* (EDQM European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, Council Of Europe).[18]

#### **3.1 La leucodeplezione**

La leucodeplezione è la rimozione dei leucociti dal sangue e dagli emocomponenti. In medicina trasfusionale è diventata una tecnica

ampiamente utilizzata. Le maggiori organizzazioni scientifiche internazionali concordano ormai sulla necessità di una "leucodeplezione totale" in quanto la rimozione dei leucociti apporta vantaggi clinici notevoli ai pazienti.

L'uso di emocomponenti leucodepleti può:

- prevenire l'alloimmunizzazione HLA e conseguente refrattarietà piastrinica,
- prevenire la trasmissione di citomegalovirus (CMV),
- prevenire l'immunomodulazione,
- prevenire la trasmissione di virus (diversi dal CMV),
- prevenire la trasmissione della malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD),
- prevenire la riattivazione virale,
- prevenire la GvHD,
- prevenire la TransfusionRelated Acute LungInjury (TRALI),
- ridurre la frequenza di reazioni febbrili non emolitiche (FNH) caratterizzate da ipotensione, rash cutaneo, ecc. Quest'ultima reazione è dovuta prevalentemente alle citochine ad attività pirogena e proinfiammatoria, rilasciate dai leucociti durante la conservazione dei globuli rossi o delle piastrine [19].

Il grado al quale un emocomponente si può considerare adeguatamente leucoridotto è variato negli anni; inizialmente si aveva un livello di  $5 \times 10^6$  di leucociti per unità di concentrato eritrocitario stabilito nel 1991 dall'American Association of Blood Banks (AABB) ed esteso, poi, ai concentrati piastrinici (CP) nel 1996. [20]. Negli ultimi anni, grazie anche ai numerosi eventi avversi che possono comportare i leucociti residui nell'emocomponente, si è arrivati a un livello di accettabilità per i bianchi residui di  $1 \times 10^6$  per unità di concentrati eritrocitari e piastrinici.

Nel decreto del 2 novembre 2015, per incrementare ancora di più la sicurezza dei prodotti, viene riportato che tutti gli emocomponenti eritrocitari e piastrinici devono essere prodotti con leucodeplezione mediante filtrazione in linea pre-storage (già ampiamente adottata in molti paesi), con metodi tali da garantire l'ottenimento di un basso residuo leucocitario al fine di ridurre gli eventi avversi associati alla contaminazione leucocitaria degli emocomponenti e migliorare la qualità del prodotto. Inoltre, sempre nel medesimo decreto, per aumentare la sicurezza dei prodotti, viene stabilito che i concentrati eritrocitari ottenuti dalla scomposizione del sangue intero e da aferesi, la rimozione del buffycoat o la leucoriduzione, unitamente alla rimozione della massima possibile quantità di plasma e alla risospensione in soluzione additiva, costituiscano requisiti minimi obbligatori[2].

La leucodeplezione per i concentrati eritrocitari può essere eseguita durante la raccolta e la lavorazione del prodotto entro 24 ore (pre-storage) o dopo la lavorazione e conservazione in laboratorio o al letto del paziente (post-storage). La tecnica prestorage, caratterizzata dalla riduzione dei globuli bianchi precocemente subito dopo il prelievo di sangue dal donatore, permette di diminuire le lesioni dei globuli rossi rese possibili durante il periodo di conservazione, di rimuovere i globuli bianchi prima della loro frammentazione, ma soprattutto evita l'accumulo di citochine di origine leucocitaria negli emocomponenti [21]. Poiché i leucociti sono le cellule maggiormente responsabili della sintesi di tali citochine, la loro presenza all'interno di concentrati eritrocitari e piastrinici dovrebbe essere causata dai leucociti, o in forma di rilascio passivo a seguito del danno cellulare durante il periodo di conservazione, o a seguito di una loro attivazione indotta dalle procedura di raccolta e separazione. La quantità di leucociti residui negli emocomponenti può, quindi, influenzare notevolmente la sintesi e il rilascio di citochine ad azione infiammatoria. La filtrazione dei leucociti prima della conservazione, riducendo la quantità

di leucociti negli emocomponenti, sicuramente può prevenire questo inconveniente, pur non eliminandolo completamente. Nei concentrati eritrocitari la conservazione a 4 °C riduce il rischio di accumulo di citochine, contrariamente a quanto accade nei concentrati piastrinici conservati a temperatura ambiente [22].

Come già sottolineato con il decreto del 2 novembre 2015 la metodica post-storage, in ragione della dimostrata inferiorità in termini di qualità clinica dei concentrati leucodepleti è stata dismessa a favore della tecnica prestorage. Tutte le unità prodotte nel SIT di Alghero utilizzano la tecnica prestorage. Inoltre anche le aferesi da concentrati eritrocitari e da concentrati piastrinici vengono filtrate subito dopo la raccolta con appositi filtri e nel SIT di Alghero si è deciso di filtrare e irradiare sterilmente tutti i concentrati piastrinici da pool di buffy-coat prodotti.

Il grado di leucodeplezione richiesto, con una soglia minima di leucociti minore di  $1 \times 10^6$  per unità di prodotto, mette in crisi vari metodi di misurazione in quanto, con soglie così minime, ci può essere una grande variabilità tecnica e strumentale e per molti dispositivi si supera la soglia minima rilevabile. La crescente domanda di procedure di controllo della leucodeplezione degli emocomponenti richiede l'applicazione estensiva di metodi di conteggio affidabili, riproducibili ma soprattutto economici [23].

In qualche caso può essere sufficiente assicurarsi che il prodotto abbia superato o meno lo standard accettabile di leucodeplezione. Ciò nonostante, non è stato ancora precisato il più basso limite di leucodeplezione al quale possono intervenire le reazioni avverse dovute ai leucociti residui trasfusi. Lo sviluppo di evoluti metodi di conteggio è andato di pari passo con lo sviluppo di migliori tecniche di leucodeplezione. Questo fatto riveste notevole importanza per valutare le nuove tecnologie e per raggiungere una migliore comprensione dei

problemi clinici relativi agli emocomponenti leucodepleti [20]. Negli anni sono stati fatti diversi studi e sono stati messi a confronto diversi strumenti dall'emocitometro di Nageotte, la citometria volumetrica capillare [24], la citofluorimetria e la reazione a catena della polimerasi (PCR) [25].

Come rilevato da diversi studi [23; 25] si è evidenziata con chiarezza la superiorità in termini di sensibilità, accuratezza e riproducibilità dei metodi citofluorimetrici nel conteggio dei leucociti residui (rWBC) degli emocomponenti leucodepleti.

Sicuramente il metodo citofluorimetrico è quello più indicato ma questo richiede un costo iniziale molto elevato dello strumento, reagenti costosi, personale addestrato e tempo degli operatori.

#### **4. Scopo della tesi**

Il controllo di qualità nei servizi immunotrasfusionali è gestito in base a norme e linee guida nazionali con lo scopo di rendere coerenti ed omogenee in tutto il territorio italiano le procedure di gestione dei campioni biologici. Il protocollo di monitoraggio della leucodeplezione degli emocomponenti è reso necessario per verificare se l'unità emocomponente presenta una conta leucocitaria superiore o inferiore al valore soglia raccomandato. Infatti le normative europee e nazionali affermano che una conta leucocitaria residua minore di  $1 \times 10^6$  per unità di emocomponente leucodepleta possa essere sufficiente a evitare reazioni trasfusionali correlate alla presenza dei leucociti stessi.

Nel servizio di immunotrasfusione di Alghero, per la qualifica degli emocomponenti, il conteggio dei leucociti residui viene eseguito mediante Contaglobuli automatico multiparametrico, in cui spesso la conta dei residui leucocitari non rientra negli intervalli di accettabilità minore di  $1 \times 10^6$ .

Scopo del lavoro è stato quello di monitorare come nell'organizzazione e nella gestione del controllo di qualità si possano evidenziare processi critici, e come possano essere implementati e migliorati; inoltre si è voluto dimostrare come questo possa incidere sugli aspetti economici e organizzativi in termini di risorse umane di un'unità operativa.

In particolare utilizzando tre strumentazioni e confrontando i globuli bianchi residui analizzati con la metodica CELL-DYN con altre due metodiche (contaglobuli automatico in citometria a flusso ADVIA e conta dei leucociti residui degli emocomponenti ADAM con microscopia in fluorescenza), si è voluto analizzare il processo delle conte leucocitarie residue degli emocomponenti, ritenuto critico da diversi operatori.

In seguito all'analisi delle variabili analitiche e strumentali delle conte leucocitarie, è stata effettuata una analisi statistica multivariata con l'ausilio di un software, volta ad indagare la diversità di tre metodi analitici.



## **5. Materiali e metodi**

### **5.1 Emocomponenti**

Gli emocomponenti studiati e sottoposti ai controlli di qualità interni sono stati prodotti nel servizio immunotrasfusionale di Alghero secondo la normativa europea e nazionale vigente. Le unità che afferiscono al SIT di Alghero provengono dal Servizio stesso o dalle unità di raccolta territoriali (URT).

Durante questo studio sono stati raccolti in totale 63 campioni, di cui :

- 55 Concentrati eritrocitario leucodepleto e risospeso in soluzione additiva con filtrazione pre-storage
- 4 Concentrati piastrinici da pool di buffy-coat leucodepleti
- 4 Concentrati eritrocitari leucodepleti da aferesi

Le unità che sono state scelte per lo studio e, di conseguenza, per il controllo di qualità sono state sottoposte agli stessi metodi di lavorazione e conservazione degli altri emocomponenti.

### **5.2 Separazione e scomposizione da sangue intero.**

Le unità di sangue intero vengono prelevate da personale qualificato presso il SIT in sala prelievi o presso le unità esterne e trasportate in “sala lavorazione sangue ed emocomponenti”. Le unità di sangue intero vengono centrifugate per la produzione di emazie concentrate leucodeplete, plasma e buffycoat. La sola produzione di emazie concentrate leucodeplete e plasma avviene centrifugando le sacche di sangue intero per 11 minuti a 3569 rpm a 4 °C dopo averle pesate singolarmente e bilanciate. La produzione di emazie concentrate leucodeplete, plasma e buffycoat avviene centrifugando le sacche di sangue intero per 11 minuti a 3569 rpm a 22 °C. Al termine della centrifugazione le unità di sangue intero vengono avviate alla fase di

scomposizione. A tale scopo vengono utilizzati scompositori automatici di frazioni ematiche. L'unità centrifugata viene posizionata nell'apposito scompositore e da una singola unità di sangue intero si ottengono tre emocomponenti selezionando l'apposito programma di separazione: emazie concentrate leucodeplete mediante filtrazione pre-storage, buffy-coat e plasma. Il plasma andrà congelato mediante apposito abbattitore di temperatura Plasmafrost mentre gli altri due emocomponenti subiranno delle lavorazioni successive.

#### **5.2.1 Concentrato eritrocitario leucodepleto e risospeso in soluzione additiva con filtrazione pre-storage**

Tra i componenti ottenuti dalla separazione del sangue intero ci sono le emazie concentrate leucodeplete. Le unità di emazie ottenute dopo separazione vengono filtrate mediante il filtro in linea (prestorage) e risospese in soluzione SAGM. La filtrazione può essere eseguita fino a 24 ore dopo la donazione e le emazie concentrate prefiltrate hanno una durata di 42 giorni conservate in opportune frigoemoteche e stoccate in base al gruppo e Rh ad una temperatura di  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$

#### **5.2.2 Concentrato eritrocitario leucodepleto lavato**

Le emazie lavate sono ottenute o da sangue intero mediante centrifugazione, rimozione del plasma e successivo lavaggio delle emazie in soluzione isotonica a  $4^{\circ}\text{C}$  oppure da lavaggio di concentrati eritrocitari da aferesi. Il prodotto è una sospensione di emazie dalla quale è stata rimossa la maggior parte del plasma, dei leucociti e delle PLT. Il preparato deve

essere conservato a +4 °C ( $\pm 2$  °C) per un periodo di tempo più breve possibile e, in ogni modo, non superiore a 24 ore, in quanto si lavora con sistemi aperti e con il lavaggio si ha la rimozione della soluzione anticoagulante e conservante.

### **5.2.3 Concentrati piastrinici da pool di buffy-coat leucodepleti**

Dalla separazione del sangue intero si ottengono unità di buffy-coat. Il *Buffycoat* è una frazione di sangue che si ottiene dopo centrifugazione tra emazie e plasma e contiene principalmente leucociti e piastrine. Generalmente si producono pool utilizzando da 5 a 6 unità di buffy-coats, a seconda della disponibilità. L'assemblaggio dei buffy-coats viene fatto generalmente con unità omogruppo e deve essere eseguito entro le 24 ore dal prelievo. I singoli buffycoat vengono uniti ed assemblati tra di loro per ottenere un pool di piastrine da buffy-coats a cui viene aggiunta la soluzione SSP (soluzione conservante per le piastrine). Il pool così ottenuto viene centrifugato a 1000 rpm per 12 minuti a 22° C e verrà poi separato attraverso apposito separatore automatico mediante programma specifico che selezionerà solo il sovranatante che costituisce il vero concentrato piastrinico. Nel SIT di Alghero tutte le unità di Piastrine da pool di buffycoat vengono filtrate con appositi filtri per la rimozione dei leucociti e irradiati con irradiatore RADGIL a 25-50 Gy. Le piastrine da pool di buffycoat hanno una durata di 5 giorni dal giorno del prelievo e vengono conservate all'interno di un termostato in agitazione continua a 22  $\pm 2$  °C.

### **5.3 Aferesi produttive**

La procedura di aferesi e' la procedura di raccolta di uno o piu' emocomponenti mediante separatori cellulari dal donatore riconosciuto idoneo ai sensi della normativa vigente [2].Le aferesi implicano una rimozione selettiva dei costituenti del sangue da donatori o da pazienti. Le aferesi multicomponent permettono la raccolta di uno o più emocomponenti da singolo donatore. I concentrati sono ottenuti mediante una separatore cellulare che lavora il sangue in maniera automatica e produce direttamente gli emocomponenti restituendo al donatore, durante o alla fine della procedura, i componenti restanti con sistemi a flusso continuo o discontinuo [26].

Nel SIT di Alghero si possono produrre eritroplasmaferesi, plasma piastrinoafèresi o eritropiastrinoafèresi.

#### **5.3.1 Concentrato eritrocitario leucodepleto da aferesi**

I concentrati eritrocitari sono prodotti da aferesi multicomponent mediante eritroplasmaafèresi. Le emazie da aferesi vengono trasportate , mediante mezzi idonei, in sala plasma. Le sacche sono dotate di un filtro per la rimozione dei leucociti e vengono risospese in soluzione additiva SAGM costituita da soluzione salina, Adenina, Glucosio e Mannitolo. La durata delle emazie da aferesi è di 42 giornie vengono conservate in frigoemoteca ad una temperatura di  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.3.2 Concentrati piastrinici da aferesi leucodepleti**

I concentrati piastrinici sono prodotti da aferesi multicomponent mediante plasma piastrinoafèresi. I concentrati piastrinici da aferesi vengono trasportati in sala lavorazione e vengono filtrati con opportuni filtri per la leucodeplezione. Nel

SIT di Alghero tutte le unità di Piastrine da aferesi vengono irradiate con irradiatore RADGIL. Le piastrine da aferesi hanno una durata di 5 giorni dal giorno del prelievo e vengono conservate all'interno di un termostato in agitazione continua a  $+22 \pm 2$  °C.

#### **5.4 Il controllo di qualità degli emocomponenti**

Il controllo di qualità degli emocomponenti garantisce sicurezza ed efficacia terapeutica al prodotto finale. Per un centro immunotrasfusionale lo scopo del controllo di qualità degli emocomponenti è quello di garantire lo standard di prodotto previsto dalle normative vigenti, assegnare e distribuire prodotti efficaci per garantire una terapia trasfusionale corretta e tenere sotto controllo l'intero processo di produzione; con l'ausilio dei controlli di qualità si può intervenire tempestivamente con azioni correttive qualora il prodotto non risulti conforme.

La qualità è garantita attraverso l'esecuzione di specifici controlli, pianificati per quantità e frequenza sulla base di adeguate valutazioni statistiche (controllo statistico di processo), al fine di ottenere dati statisticamente rappresentativi rispetto al volume complessivo della produzione dei singoli emocomponenti [2].

Nel SIT di Alghero tutti gli emocomponenti sono sottoposti al controllo di qualità. I controlli di qualità sono eseguiti in modo randomizzato sull'1 % della produzione di sangue intero, emazie, plasma e prodotti leucodepleti, mentre per le piastrine da aferesi, da pool e le emazie lavate il controllo è esteso a tutte le unità (100% della produzione) come descritto nel manuale della qualità ALL07 SOP02 PG.01 del SIT di alghero.

Il controllo di qualità interno ci permette la valutazione di diversi parametri tutti riportati nel D.M. 69 del 02.11.2015:

- ✓ Volume dell'emocomponente
- ✓ Parametri cellulari determinati tramite esame emocromocitometrico
- ✓ Presenza di leucociti in seguito a leucodeplezione
- ✓ Parametri di conservazione (coaguli, sterilità, emolisi, pH, Fattore VIIIc, Swirling).

Tutti i controlli di qualità effettuati dal tecnico di laboratorio vengono registrati negli appositi moduli divisi per emocomponenti e vengono rilevati i parametri che devono rientrare in determinati intervalli (vedi tabelle 1,2,3,4,5,6).

**CONTROLLO DI QUALITÀ SU EMASIE LEUCODEPLETEPRE-STORAGE RISOSPESE IN SOLUZIONE ADDITIVA**

<b>Parametri da verificare</b>	<b>Requisito</b>
Volume	definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	minimo 40 gr per unità
Ematocrito	0,50-0,70
Leucociti residui dopo leucodeplezione	<1x10E6 per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	< 0,8% della massa eritrocitaria

**Tab.1 modulo controllo di qualità su emazie leucodepletepre-storage**

## CONTROLLO DI QUALITÀ SU EMAZIE LEUCODEPLETE DA AFERESI

Parametri da verificare	Requisito
Volume	definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	minimo 40 gr per unità
Ematocrito	0,50-0,70
Leucociti residui dopo leucodeplezione	<1x10E6 per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	< 0,8% della massa eritrocitaria

Tab.2 modulo controllo di qualità su emazie leucodeplete da aferesi

## CONTROLLO DI QUALITÀ SU PIASTRINE DA AFERESI MULTICOMPONENT

Parametri da verificare	Requisito
Volume	secondo procedura
Piastrine nel prodotto leucodepleto	minimo 2x 10E11
Leucociti residui dopo leucodeplezione	<1x10E6 per unità
pH Misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	>6,4

Tab.3 modulo controllo di qualità su piastrine da aferesi

## CONTROLLO DI QUALITÀ SU EMAZIE LEUCODEPLETE PRE-STORAGE LAVATE

Parametri da verificare	Requisito
Volume	definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	minimo 40 gr per unità
Ematocrito	0,50-0,70
Contenuto in proteine del liquido sovranatante del prodotto finale	<0,5 g per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	< 0,8% della massa eritrocitaria

Tab.4 modulo controllo di qualità su emazie leucodepletepre-storage lavate

## CONTROLLO DI QUALITÀ SU POOL DI PIASTRINE DA BUFFY COAT POST LEUCODEPLEZIONE E IRRADIAZIONE

Parametri da verificare	Requisito
Volume	>40 ml per 60x10E9 piastrine per singola unità che costituisce il pool
Piastrine nel prodotto leucodepleto	minimo 2x 10E11
Leucociti residui dopo leucodeplezione	<1x10E6 per unità
pH Misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	>6,4

Tab.5 modulo controllo di qualità su pool piastrinico da buffycoat



## CONTROLLO DI QUALITÀ SU PLASMA FRESCO CONGELATO

<b>Parametri da verificare</b>	<b>Requisito</b>
Volume	definito dalla metodica utilizzata +/- 10%
Fattore VIIIc	in media non meno di 70IU/ per 100 mL
Leucociti residui	<0,1x10E9/L
Piastrine residue	< 50x10E9/L
Eritrociti residui	<6 x10E9/L
Gocciolamento/Perdite	nessuna perdita all'ispezione visiva dopo pressione nell'estrattore di plasma, prima del congelamento e dopo lo scongelo
Proteine Totali	<50 g/L
Aspetto	No colore anomalo o evidenti coaguli

**Tab.6 modulo controllo di qualità su plasma fresco congelato**

### **5.5 Campionamento**

I campioni analizzati sono stati raccolti in triplo per l'analisi comparativa in studio. Al fine di rendere il campione rappresentativo dell'unità emocomponente sono stati raccolti dei "segmenti" dalle sacche attraverso un processo di strappaggio, miscelazione del contenuto della sacca per almeno 5 volte e saldatura sterile. Il contenuto di ciascun segmento è stato poi riversato in apposite provette vuote e conservato alle stesse condizioni degli emocomponenti studiati per poi essere analizzati. L'analisi comparativa è stata eseguita tra l'analizzatore automatico CELL-DYN 3700 in dotazione al nostro SIT, lo strumento ADAM rWBC specifico

per la conta dei leucociti residui su emocomponenti e l'analizzatore automatico ADVIA del laboratorio analisi di Alghero.

### **5.5.1 CELL-DYN 3700**

Nel nostro servizio immunotrasfusionale, al fine della qualifica degli emocomponenti, il conteggio dei leucociti residui viene eseguito mediante Contaglobuli automatico multiparametrico denominato CELL DYN 3700 della Ditta Abbott.

Lo strumento effettua 20 misurazioni (parametri ematologici :G.R. – HGB – HCT – MCV – MCH – MCHC – RDW – PLT – MPV – WBC – N# – L# – MONO# – EOSI# – BASO# – N% - L% - MONO% - EOSI% - BASO%). Il CELL DYN 3700 si serve di 4 mezzi di misurazione indipendenti:

1. Il conteggio ottico dei Leucociti WOC e i dati della formula leucocitaria (analisi delle sottopopolazioni leucocitarie) viene effettuato nel canale di flusso ottico che si serve di tecniche a citometria a flusso a base di laser (neutrofili, linfociti, monociti, basofili eosinofili);
2. Conteggio dei leucociti WIC viene effettuata in un canale ad impedenza elettrica;
3. I dati relativi agli Eritrociti e Piastrine vengono misurati in un secondo canale di impedenza elettrica;
4. L'Hb viene misurata sul canale spettrofotometrico (Cianuro free)

Durante ciascun ciclo dello strumento il campione viene aspirato, diluito, miscelato e vengono effettuate le misurazioni per ciascun parametro. L'analisi del campione può effettuarsi con modalità campionatore aperto (130µl +/- 5%) e con modalità campionatore chiuso (240µl +/- 5%) attraverso perforazione del tappo.



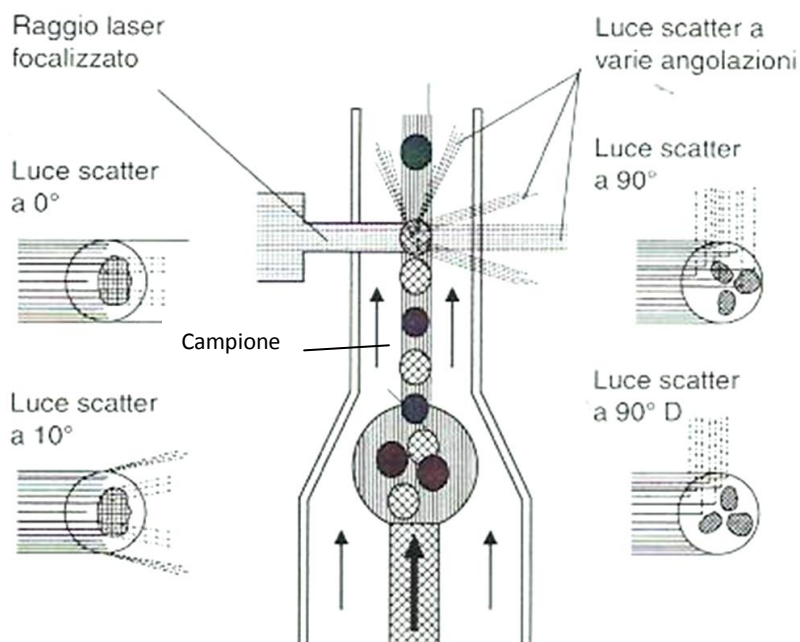
**Figura 1. CELL-DYN 3700**

Il sistema è in grado di fornire i valori leucocitari con i due differenti sistemi WIC (misurazione di impedenza dei leucociti) e il valore WOC (conteggio ottico dei leucociti). Il conteggio dei leucociti viene solitamente rappresentato dal valore WOC; se si verifica una differenza clinicamente significativa fra i valori WIC e WOC i dati vengono rivalutati per la definizione di un valore più preciso. Vengono utilizzati due metodi poiché, dal momento che entrambi presentano limiti e vantaggi, ciò aumenta la capacità dello strumento di fornire un conteggio più accurato dei leucociti in presenza di determinate sostanze interferenti o condizioni patologiche. Il risultato finale è prodotto da un algoritmo di analisi dei dati che valuta automaticamente ciascuna misurazione.

Misurazione WIC: il valore WIC viene determinato con il canale di impedenza WBC. Viene effettuata una diluizione 1:301 del campione con il diluente e reagente lisante WIC/HGB. Il reagente lisante WIC/HGB provoca la lisi degli eritrociti ed elimina il citoplasma dei leucociti. I nuclei dei leucociti vengono contati utilizzando il metodo di impedenza quando attraversano l'orifizio di  $100 \times 77 \mu\text{m}$  del trasduttore von Behrens WIC. Il volume del campione che viene analizzato ( $200 \mu\text{l}$ ) è regolato in modo preciso dal sistema di misurazione WIC. I dati WIC saranno distribuiti su 256 canali e possono essere presentati in forma di istogramma. Con

questo metodo vengono determinati numero e dimensione dei nuclei dei leucociti misurando direttamente le variazioni di corrente elettrica prodotte ad opera di una particella sospesa in un liquido conduttivo che passa attraverso un orifizio di dimensioni note. Viene creato un percorso elettrico con un elettrodo immerso nel liquido ad entrambi i lati dell'orifizio. Il passaggio di una particella attraverso l'orifizio produce una variazione che crea un impulso elettrico misurabile. Il numero di impulsi generati sarà direttamente proporzionale al numero di particelle che hanno attraversato il canale e l'ampiezza di ciascun impulso è proporzionale al volume della particella che l'ha prodotto. Ciascun impulso viene amplificato e confrontato con tensioni di riferimento su canali interni che sono forniti di discriminatori di dimensioni calibrate in grado di accettare solo impulsi di una certa ampiezza.

Analisi del valore WOC: per ottenere il conteggio ottico dei leucociti WOC il sistema CELL-DYN si avvale della tecnica di citometria a flusso ottica.



**Figura 2 Camera di lettura WOC.**

**Manuale di impiego CELL-DYN 3700**

Il campione viene diluito 1:51 con il reagente sheat e viene direttamente iniettato nel flusso del reagente sheat tramite una siringa. Il campione subisce un focalizzazione idrodinamica allineando le cellule in unica fila quando passano attraverso la camera di lettura WOC, costituita da una camera otticamente trasparente di quarzo. La sorgente luminosa è costituita da un raggio laser elio-neon polarizzato verticalmente. Il sistema misura quattro angoli di luce scatter, i parametri tradizionali sono rappresentati dall'angolo anteriore di luce scatter (da 1° a 3°, indicati come 0°) e dall'angolo di luce scatter ortogonale (da 70° a 110°, indicati come 90°). Vengono misurati, inoltre, l'angolo acuto di luce scatter (da 7° a 11°, indicati come 10°) e l'angolo di luce scatter depolarizzata a 90° (da 90 a 110° indicati come 90°D). Il conteggio viene determinato contando il numero di eventi al di sopra del valore soglia generato direttamente dal computer sul canale 0°[27].

### **5.5.2 Tecnologia ADAM- rWBC**

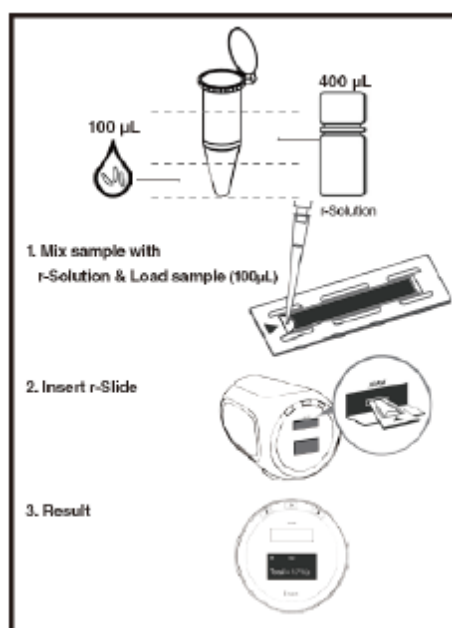
Lo strumento ADAM-rWBC della ditta macopharma è uno strumento dedicato al conteggio dei leucociti residui negli emocomponenti. ADAM-rWBC si basa sulla tecnica della microscopia in fluorescenza per la conta delle cellule. ADAM-rWBC utilizza un colorante fluorescente, ottica LED e una camera CCD per la rilevazione dei leucociti. Il campione di sangue viene miscelato con il colorante ioduro di propidio (PI) e direttamente pipettato in un vetrino monouso. Il vetrino viene poi caricato in un supporto. Le cellule, che sono state colorate in precedenza, emettono luce che viene rilevata da una camera CCD sensibile. I risultati dell'immagine vengono elaborati automaticamente generando il numero di cellule che viene visualizzato sul display dello strumento.



**Figura 3 Strumento ADAM rWBC**

Preparazione del campione e analisi:

1. togliere i reagenti r-solution dal frigo e lasciarli a temperatura ambiente per 10 minuti
2. dispensare 100  $\mu$ l di campione (emazie, piastrine o controllo) in una provetta pulita (diluizione 1:5) e 400  $\mu$ l di reagente miscelando accuratamente
3. dispensare 100  $\mu$ l del preparato diluito in precedenza su un vetrino r-Slide.
4. Incubare al riparo dalla luce per 4-7 minuti.
5. Inserire il vetrino r-slide nell'ADAM e premere press.
6. Dopo circa 3 minuti il risultato, calcolato come numero di cellule WBC per  $\mu$ l, viene automaticamente visualizzato [28].



**Figura 4 Protocollo per preparazione e analisi del campione**  
**ADAM rWBC Instruction manual**

### 5.5.3 ADVIA 2120

Il contaglobuli automatico ADVIA 2120 della ditta Siemens esegue l'esame emocromocitometrico con metodo optoelettronico utilizzando i principi della citometria a flusso. Il sistema è composto da canali analitici dedicati per il dosaggio dell'emoglobina, misurazioni relative ai globuli rossi e alle piastrine, alla conta e alla differenziazione dei globuli bianchi dopo colorazione citochimica per la mieloperossidasi e alla conta dei basofili con misurazione della densità nucleare dei nuclei degli altri leucociti. In ogni canale le cellule vengono sottoposte all'azione di reagenti per poi essere analizzati mediante rilevazione delle modificazioni che l'impatto con ogni singola cellula produce in un raggio di luce incidente. I risultati sono elaborati con l'aiuto di complessi algoritmi che classificano i segnali ottenuti e li traducono sotto forma di numeri e di distribuzioni cellulari nei relativi istogrammi e citogrammi [29]. La misurazione dei conteggi totali dei globuli bianchi e l'analisi differenziale dei cluster

individuano ciascuna cellula secondo la sua dimensione e le sue proprietà di assorbimento della luce. Per quanto riguarda la serie bianca lo strumento ADVIA basa la sua tecnologia sul contenuto di granuli nel citoplasma (canale PEROX ) e aspetto del nucleo (canale BASO).

**Il metodo perossidasi:** La reazione citochimica è un metodo chimico a due fasi che utilizza l'enzima mieloperossidasi intracellulare per differenziare i globuli bianchi utilizzando le caratteristiche della colorazione e delle dimensioni. I globuli bianchi sono analizzati attraverso l'aggiunta del substrato dell'enzima della perossidasi. L'assorbimento della luce bianca dalla fonte di luce al tungsteno è una misurazione della reazione della perossidasi. In aggiunta alla formula leucocitaria a cinque popolazioni, i sistemi ematologici ADVIA rilevano una popolazione in più, costituita dalle cosiddette grandi cellule non colorate (LUC). Esse sono di solito linfociti attivati, plasmacellule, cellule capellute, linfociti pediatrici o blasti negativi alla perossidasi.

**Il metodo basofilo:** Questo metodo offre il conteggio primario totale dei globuli bianchi. Il reagente BASO lisa i globuli rossi, le piastrine e i citoplasmi di tutti i globuli della serie bianca ad eccezione dei basofili. Il citogramma BASO utilizza l'analisi dei cluster per individuare e contare le cellule e i nuclei in ciascuna popolazione in base alla posizione, all'area e alla densità.[30]



**Figura 5 Strumento ADVIA**



## **5.6 Rivalutazione del campione**

Nel SIT è stato predisposto un protocollo per la rivalutazione dei bianchi residui con lo strumento CELL-DYN 3700 in quanto questo strumento viene utilizzato anche per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico e potrebbe avere degli interferenti. Data la mole di campioni utilizzati per la valutazione dell'emocromo lo strumento potrebbe risultare non completamente pulito e quindi presentare problemi nei risultati analitici dovuti agli interferenti stessi. Per questo motivo è stato predisposto un ciclo di pulizia rapido dello strumento in cui devono essere eseguiti 3 background in modo da ridurre il più possibile il rumore di fondo dello strumento. I background vengono valutati dall'operatore e se questi risultano intorno al valore 0,020 K/ $\mu$ l è possibile analizzare il campione. Il campione che non rientra nel valore limite viene rivalutato per una seconda volta con il CELL-DYN e se non rientra nell'intervallo viene sottoposto a rificazione.

La rificazione comporta l'uso di filtri haemonetics, specifici per gli emocomponenti che devono essere rivalutati, i quali trattengono i leucociti. I filtri sono confezionati singolarmente e viene fatta una connessione sterile mediante connettore sterile della sacca madre dell'emocomponente con un filtro e il contenuto rificato passerà in una seconda sacca satellite comportando la rietichettatura della sacca. In seguito viene prelevato un secondo campione rappresentativo dell'unità emocomponente e rivalutato.

## **5.7 Analisi statistica**

È stata eseguita un'analisi con metodi di statistica multivariata mediante l'ausilio di un software per l'analisi statistica dei dati (Primer & PERMANOVA v6, Plymouth, UK).

## 6. Risultati

È stato eseguito un confronto tra tre metodiche diverse per verificare l'attendibilità dei sistemi in dotazione nel nostro SIT.

Sono stati messi a confronto lo strumento in dotazione al SIT di Alghero CELL DYN 3700, uno strumento dedicato alla conta dei leucociti residui ADAM e un contaglobuli automatico ma con principi di citometria a flusso ADVIA.

I campioni raccolti sono 63 di cui:

- 4 campioni di concentrati piastrinici da pool di buffycoat (EMC 19)
- 55 campioni di emazie concentrate prefiltrate (EMC 25)
- 4 campioni da aferesi di emazie (EMC 67)

In tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti dai tre metodi di conteggio suddivisi per le tre tipologie di emocomponenti in studio: concentrati eritrocitari da aferesi, concentrati eritrocitari prefiltrati e concentrati piastrinici da pool di BC.

I valori dei leucociti residui sono calcolati in base al volume dell'emocomponente stesso. I leucociti sono rilevati come leucociti / $\mu$ l e questo valore deve essere moltiplicato per il volume dell'emocomponente espresso in ml.

Nella tabella sono riportate il numero identificativo dell'unità CDM, il numero corrispondente all'emocomponente studiato, il volume dell'unità espresso in ml e le conte dei leucociti nelle tre metodiche oggetto del confronto per unità.

	CDM	EMC	volume unità	rWBCCELL- DYN	rWBC ADVIA	rWBC ADAM
1	I141217100539	19	355	0	0	0,21655
2	I141217100515	19	350	1,05	0	0,238
3	I141217100541	19	366	0	0	0,24888
4	I141217100540	19	350	0	0	0,1785
5	I141217100480	25	266	0	0	0,20482
6	I141217100481	25	256	2,3	0	0,11008
7	I141217100483	25	265	0	0	0,06625
8	I141217100484	25	257	3,3	0	0,08738
9	I141217100485	25	290	2,9	0	0,2262
10	I141217100486	25	247	0	0	0,23712
11	I141217100487	25	261	1,566	0	0,02088
12	I141217100488	25	268	1,07	0	0,13668
13	I141217100453	67	313	0,626	0	0,43194
14	I141217100449	67	321	2,88	0	0,18939
15	I141217100448	25	253	1,08	0	0,12903
16	I141217100452	25	257	1,5	0	0,15163
17	I141217100455	25	226	0,9	0	0,03842
18	I141217100456	25	221	0	0	0,05525
19	I141217100457	25	259	0,518	0	0,06475
20	I141217100458	25	255	1,02	0	0,13005
21	I141217100461	25	264	0	0	0,02112
22	I141217100462	25	250	0	0	0,1275
23	I141217100473	67	315	0,63	0	0,2961
24	I141217100464	25	263	0,526	0	0,08942
25	I141217100466	25	241	0	0	0,06025
26	I141217100467	25	258	0	0	0,2193
27	I141217100469	25	228	0	0	0,09576
28	I141217100472	25	257	0	0	0,06425
29	I141217669264	25	265	0	0	0,04505
30	I141217669265	25	257	0	0	0,06425
31	I141217669266	25	276	1,93	0	0,04692
32	I141217669267	25	271	0,542	0	0,11382
33	I141217669268	25	257	0	0	0,15163
34	I141217669269	25	260	0,26	0	0,065
35	I141217669270	25	255	1,5	0	0,06375
36	I141217669271	25	258	0,258	0	0,15222
37	I141217669272	25	266	0	0	0,20482
38	I141217669274	25	266	0	0	0,2261
39	I141217669276	25	260	0,26	0	0,0208
40	I141217669277	25	269	1,3	0	0,02152
41	I141217669278	25	254	0	0	0,2159

42	I141217669279	25	253	0,759	0	0,21505
43	I141217669280	25	228	0	0	0,057
44	I141217669281	25	252	0,756	0	0,085
45	I141217669282	25	275	0	0	0,0935
46	I141217669283	25	265	0,53	0	0,0901
47	I141217669284	25	245	0	0	0,1029
48	I141217669286	25	273	0,546	0	0,04641
49	I141217669287	25	263	0,526	0	0,04471
50	I141217669288	25	290	0,58	0	0,1711
51	I141217669289	25	232	0,464	0	0,01856
52	I141217100489	25	261	0,522	0	0,13311
53	I141217100492	25	289	1,445	0	0,02312
54	I141217100493	67	315	0	0	0,05355
55	I141217100494	25	275	0,55	0	0,04675
56	I141217100495	25	224	0,672	0	0,03808
57	I141217100496	25	246	0	0	0,01968
58	I141217100497	25	254	2,286	0	0,0635
59	I141217100499	25	249	0	0	0,04233
60	I141217100500	25	250	0	0	0,085
61	I141217100501	25	294	0,588	0	0,04998
62	I141217100502	25	301	5,4	0	0,02408
63	I141217100505	25	266	0	0	0,1172

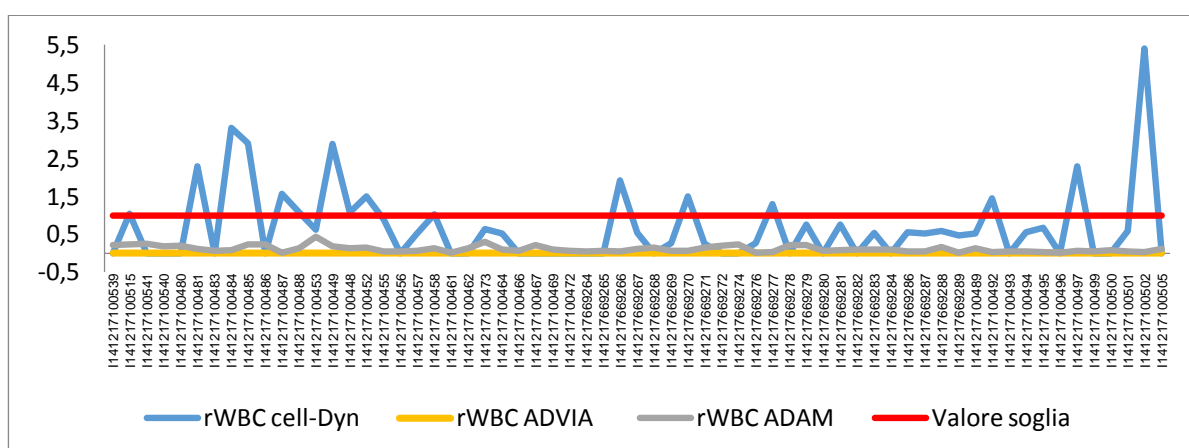
**Tab. 7 risultati leucociti residui delle 3 metodiche in studio**

In generale si evince che la maggior parte dei conteggi effettuati con i metodi prova (ADVIA e ADAM) sono più bassi rispetto a quelli del metodo in uso (CELL-DYN) e rientrano tutti nel limite di accettabilità di  $1 \times 10^6$  previsto dalla normativa.

In particolare per quanto riguarda i concentrati piastrinici da pool di buffy-coat 1 campione su 4 risulta non conforme con metodica CELL DYN e conforme con gli altri due metodi in studio. Per quanto riguarda i concentrati eritrocitari prefiltrati i campioni non conformi risultano 14 su 55 e anche essi sono conformi, invece, con i metodi in prova. Infine per quanto riguarda i concentrati eritrocitari da aferesi solo 1 su 4 risulta

essere non conforme con metodo CELL-DYN e conforme con le altre due metodiche.

Di seguito è riportato un grafico in cui si evidenziano chiaramente le differenze tra le metodiche oggetto di studio:



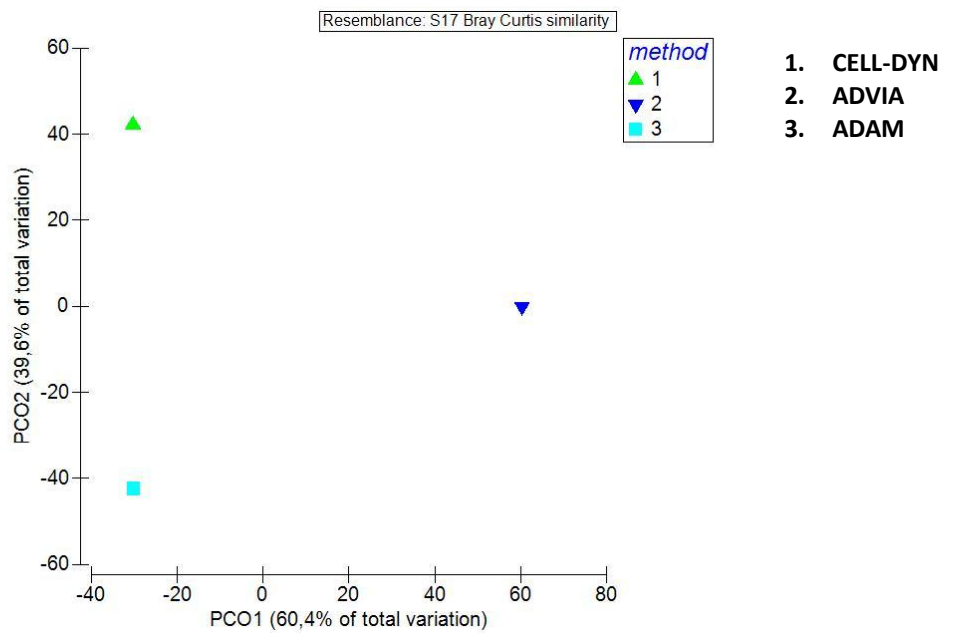
**Grafico n.1 Confronto leucociti residui con i tre strumenti in studio**

In conclusione possiamo dire che 16 campioni su 63 sono risultati non conformi con la metodica del SIT di Alghero e quindi sono stati sottoposti a rivalutazione dell'emocomponente.

Nello studio, inoltre, è stata inserita un'analisi statistica dei dati.

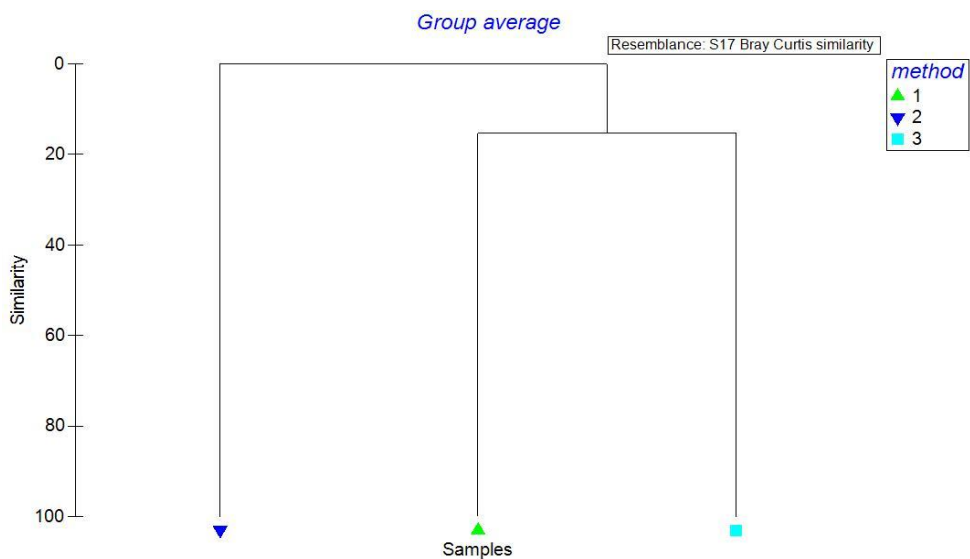
I dati sono stati sottoposti a tecniche di analisi statistica multivariata mediante l'ausilio di un software (Primer & PERMANOVA v6, Plymouth, UK).

Dopo aver creato una matrice di similarità secondo Bray-Curtis, i dati ottenuti son stati sottoposti alla PCoA al fine di visualizzarne la dispersione spaziale. Si nota un raggruppamento omogeneo dei dati in tre gruppi ben distinti a seconda del metodo di misurazione impiegato; tuttavia la disomogenea dispersione tra i gruppi suggerisce una importante diversità nella produzione dei risultati.



**Figura 6. La PCO1 spiega il 60,4% della variazione totale mentre la PCO2 rappresenta il 39,6% della variazione esistente tra i campioni.**

La distanza sopra rappresentata viene ulteriormente confermata mediante l'analisi delle similarità riportata in Figura 7. Il dendrogramma riporta una chiara clusterizzazione, sulla base delle similarità, tra i metodi 1 (CELL-DYN) e 3 (ADVIA) di circa il 20% di similarità, mentre non vi è alcuna similarità tra il metodo 2 (ADVIA) ed gli altri metodi 1 e 3 (0% di similarità).



**Figura 7 dendrogramma in cui viene riportata la similarità dei metodi.**

Al fine di provare statisticamente le dissimilarità suggerite dalle analisi di cui sopra, è stato effettuato il test delle analisi delle varianze (ANOVA, ANalysis Of Variance), del quale viene riportata una breve tabella riassuntiva inerente la statistica generale (in cui viene provata la dissimilarità tra i tre metodi d'analisi in esame) e la statistica per coppie (pairwise test, in cui si confrontano i metodi per coppie). Entrambi gli approcci investigativi affermano con significatività statistica ( $p \leq 0.05$ ) la dissimilarità nei risultati forniti dai tre diversi metodi di misurazione.

	<b>p-value</b>
<b>Global Test</b>	<b>0.002</b>
<b>Metodo 1 e 2</b>	<b>0.029</b>
<b>Metodo 1 e 3</b>	<b>0.029</b>
<b>Metodo 2 e 3</b>	<b>0.029</b>

**Tab. 8 ANOVA tra il metodo 1CELL-DYN, 2 ADVIA e 3 ADAM**

Sulla base dei risultati ottenuti si è in seguito approfondita l'indagine statistica, mediante l'applicazione della analisi SIMPER, finalizzata all'identificazione dei principali contribuenti alla dissimilarità esistente tra i gruppi (Metodi).

Di seguito è riportata l'analisi tra metodo 1( CELLDYN) e 2 (ADVIA), caratterizzati da una diversità del 100%

	CELL DYN	ADVIA	Dissimilarità	Contributo alla dissimilarità%	Somma dissimilarità%
Campioni	Valori	Valori	Media	Contrib%	Cum.%
62	5,40	0,00	12,40	12,40	12,40
8	3,30	0,00	7,58	7,58	19,98
9	2,90	0,00	6,66	6,66	26,64
14	2,88	0,00	6,61	6,61	33,26
6	2,30	0,00	5,28	5,28	38,54
58	2,29	0,00	5,25	5,25	43,79

31	1,93	0,00	4,43	4,43	48,22
11	1,57	0,00	3,60	3,60	51,82
16	1,50	0,00	3,45	3,45	55,26
35	1,50	0,00	3,45	3,45	58,71
53	1,45	0,00	3,32	3,32	62,03
40	1,30	0,00	2,99	2,99	65,01
15	1,08	0,00	2,48	2,48	67,49
12	1,07	0,00	2,46	2,46	69,95
2	1,05	0,00	2,41	2,41	72,36
20	1,02	0,00	2,34	2,34	74,71
17	0,90	0,00	2,07	2,07	76,77
42	0,76	0,00	1,74	1,74	78,52
44	0,76	0,00	1,74	1,74	80,25
56	0,67	0,00	1,54	1,54	81,80
23	0,63	0,00	1,45	1,45	83,24
13	0,63	0,00	1,44	1,44	84,68
61	0,59	0,00	1,35	1,35	86,03
50	0,58	0,00	1,33	1,33	87,36
55	0,55	0,00	1,26	1,26	88,63
48	0,55	0,00	1,25	1,25	89,88
32	0,54	0,00	1,24	1,24	91,13

**Tab. 9 Analisi SIMPER tra metodica CELL-DYN e ADVIA**

Analizzando il gruppo 1 (CELL-DYN) e 3 (ADAM) vi è un diversità del 84,72% riportata di seguito:

	CELL DYN	ADAM	Dissimilarità	Contributo alla dissimilarità%	Somma dissimilarità %
Campioni	Valori	Valori	Media	Contrib%	Cum.%
62	5,40	0,02	10,61	12,52	12,52
8	3,30	0,09	6,34	7,48	20,00
14	2,88	0,19	5,31	6,27	26,27
9	2,90	0,23	5,28	6,23	32,49
58	2,29	0,06	4,38	5,18	37,67
6	2,30	0,11	4,32	5,10	42,77
31	1,93	0,05	3,72	4,39	47,15
11	1,57	0,02	3,05	3,60	50,75
35	1,50	0,06	2,83	3,34	54,10
53	1,45	0,02	2,81	3,31	57,41
16	1,50	0,15	2,66	3,14	60,55
40	1,30	0,02	2,52	2,98	63,53
15	1,08	0,13	1,88	2,21	65,74



12	1,07	0,14	1,84	2,17	67,91
20	1,02	0,13	1,76	2,07	69,99
17	0,90	0,04	1,70	2,01	71,99
2	1,05	0,24	1,60	1,89	73,88
44	0,76	0,09	1,32	1,56	75,45
56	0,67	0,04	1,25	1,48	76,92
42	0,76	0,22	1,07	1,27	78,19
61	0,59	0,05	1,06	1,25	79,44
55	0,55	0,05	0,99	1,17	80,61
48	0,55	0,05	0,99	1,16	81,78
49	0,53	0,04	0,95	1,12	82,90
19	0,52	0,06	0,89	1,06	83,95
51	0,46	0,02	0,88	1,04	84,99
46	0,53	0,09	0,87	1,02	86,02
24	0,53	0,09	0,86	1,02	87,03
32	0,54	0,11	0,84	1,00	88,03
50	0,58	0,17	0,81	0,95	88,98
52	0,52	0,13	0,77	0,91	89,89
23	0,63	0,30	0,66	0,78	90,67

**Tab. 10 Analisi SIMPER tra metodica CELL-DYN e ADAM**

Analizzando il gruppo 2 (ADVIA) e 3 (ADAM) vi è una diversità del 100% riportata di seguito:

	ADVIA	ADAM	Dissimilarità	Contributo alla dissimilarità%	Somma dissimilarità %
Campioni	Valori	Valori	Media	Contrib%	Cum.%
13	0,00	0,43	6,04	6,04	6,04
23	0,00	0,30	4,14	4,14	10,19
3	0,00	0,25	3,48	3,48	13,67
2	0,00	0,24	3,33	3,33	17,00
10	0,00	0,24	3,32	3,32	20,31
9	0,00	0,23	3,16	3,16	23,48
38	0,00	0,23	3,16	3,16	26,64
26	0,00	0,22	3,07	3,07	29,71
1	0,00	0,22	3,03	3,03	32,74
41	0,00	0,22	3,02	3,02	35,76
42	0,00	0,22	3,01	3,01	38,77
5	0,00	0,20	2,87	2,87	41,63
37	0,00	0,20	2,87	2,87	44,50
14	0,00	0,19	2,65	2,65	47,15
4	0,00	0,18	2,50	2,50	49,65
50	0,00	0,17	2,39	2,39	52,04

36	0,00	0,15	2,13	2,13	54,17
16	0,00	0,15	2,12	2,12	56,29
33	0,00	0,15	2,12	2,12	58,41
12	0,00	0,14	1,91	1,91	60,32
52	0,00	0,13	1,86	1,86	62,19
20	0,00	0,13	1,82	1,82	64,01
15	0,00	0,13	1,81	1,81	65,81
22	0,00	0,13	1,78	1,78	67,59
63	0,00	0,12	1,64	1,64	69,23
32	0,00	0,11	1,59	1,59	70,83
6	0,00	0,11	1,54	1,54	72,37
47	0,00	0,10	1,44	1,44	73,81
27	0,00	0,10	1,34	1,34	75,15
45	0,00	0,09	1,31	1,31	76,45
46	0,00	0,09	1,26	1,26	77,71
24	0,00	0,09	1,25	1,25	78,96
8	0,00	0,09	1,22	1,22	80,19
44	0,00	0,09	1,19	1,19	81,38
60	0,00	0,09	1,19	1,19	82,57
7	0,00	0,07	0,93	0,93	83,49
34	0,00	0,07	0,91	0,91	84,40
19	0,00	0,06	0,91	0,91	85,31
28	0,00	0,06	0,90	0,90	86,21
30	0,00	0,06	0,90	0,90	87,11
35	0,00	0,06	0,89	0,89	88,00
58	0,00	0,06	0,89	0,89	88,89
25	0,00	0,06	0,84	0,84	89,73
43	0,00	0,06	0,80	0,80	90,53

**Tab. 11 Analisi SIMPER tra metodica ADVIA e ADAM**

Si noti come in tutte le coppie di gruppi l'analisi evidenzia come maggiori discriminanti le sacche caratterizzate da un valore residuo di bianchi elevato nel caso della misurazione mediante metodo 1 CELL DYN.

## 7. Discussione e Conclusioni

I diversi controlli di qualità eseguiti sugli emocomponenti hanno fatto emergere una problematica dovuta al controllo dei globuli bianchi residui con lo strumento in dotazione CELLDYN 3700. Secondo lo studio condotto, confrontando i risultati del CELL-DYN dei bianchi residui con altre due metodiche, questi non sempre sono comparabili con gli studi condotti in parallelo comportando una rivalutazione del prodotto stesso.

Dai risultati ottenuti si può evincere che 16 emocomponenti dovrebbero essere declassati o rivalutati con la metodica in uso nel SIT in quanto non rientrerebbero nell'intervallo di riferimento previsto dalla normativa per i leucociti residui che deve essere minore di  $1 \times 10^6$ . Gli emocomponenti che non rientrano nell'intervallo di riferimento minimo devono essere rivalutati o sottoposti a ulteriori processi di filtrazione.

La rivalutazione dell'emocomponente comporta diverse problematiche in quanto deve essere riprelevato un secondo campione rappresentativo dell'unità e rivalutato mediante nostra metodica o inviato al SIT di Ozieri per essere determinato con metodica ADAM rWBC. In tali casi si devono considerare due aspetti critici quali il costo di spedizione del campione nonché il "parcheggio/quarantena" del campione in attesa del referto del controllo di qualità. Questo è un problema che riguarda soprattutto i concentrati piastrinici che hanno una durata di 5 giorni dal prelievo.

La rifiltrazione comporta l'utilizzo di filtri specifici per gli emocomponenti; ne conseguono costi aggiuntivi del filtro, della lama del connettore sterile e rivalutazione del campione nello strumento. Inoltre a questi costi deve essere aggiunto il tempo dell'operatore che si dedica al controllo di qualità, ai vari background prima del passaggio del campione in macchina (costo dei reagenti) e alla rivalutazione dell'emocomponente; inoltre non è da sottovalutare il pericolo di errore che si può verificare

durante la connessione del prodotto con il filtro in quanto, alcune volte, questa connessione può non andare a buon fine e comportare l'introduzione di aria nel circuito e quindi perdita totale dell'emocomponente. Infine la rifiltrazione del prodotto comporta sempre una perdita di materiale sia di piastrine che di emazie a seconda che si tratti di concentrati di uno o dell'altro emocomponente, in quanto il filtro può trattenere spesso anche questo tipo di cellule con conseguente perdita di qualità del componente stesso.

Ai problemi finanziari devono essere aggiunti anche i possibili errori umani che queste operazioni possono comportare in quanto, in una filtrazione successiva, devono essere ristampate le etichette adesive degli emocomponenti e questo può comportare un errore ulteriore nonostante le etichette debbano essere apposte sulle sacche, come da procedura, da almeno 2 operatori.

Come si evince da questo studio molti emocomponenti risulterebbero declassati o da rivalutare ma, nel confronto con altre 2 metodiche, questi rientrano perfettamente nell'intervallo di riferimento minimo previsto dalle norme.

Dalla analisi statistica effettuata mediante software Primer & PERMANOVA v6 (Plymouth, UK) è emerso che i 3 metodi sono diversi tra loro e viene dimostrato che il metodo 1 CELL DYN tende a sovrastimare il numero dei leucociti residui determinandone la loro rivalutazione; inoltre il metodo fornisce dei risultati che si discostano da quelli prodotti da metodi maggiormente performanti come l' ADVIA e l' ADAM. Tutto ciò può essere affermato anche dai p-value ottenuti, che hanno una significatività statistica dello 0,029 e perciò possiamo affermare che i 3 metodi sono statisticamente diversi.

In conclusione possiamo affermare che, come rilevato anche da diversi studi e in particolare da Castegnaro et al. [31], il metodo di riferimento

soprattutto per quantificare gli eventi rari rimane la citometria a flusso confermando la linearità, precisione e robustezza della metodica; tuttavia la metodica utilizzata per il confronto ADAM-rWBC ha rilevato una adeguata precisione e accuratezza rappresentando una valida alternativa laddove la citometria a flusso non può essere applicata, anche se c'è comunque il rischio di classificare in maniera errata i campioni borderline.

## 8. Bibliografia

1. Legge 21 ottobre 2005, n.219. Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati. Gazzetta Ufficiale n. 251 27/10/2005
2. Decreto Ministero Sanità 2 novembre 2015. Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti. Gazzetta Ufficiale n. 300 28/12/2015. suppl.ordinario n.69.
3. <http://www.centronazionale sangue.it/pagine/il-sistema-trasfusionale-in-italia>
4. [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=2932&area=sangueTrasfusioni&menu=trasfusionale](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=2932&area=sangueTrasfusioni&menu=trasfusionale)
5. LEGGE 14 luglio 1967, n. 592. Raccolta, conservazione e distribuzione del sangue umano. GU Serie Generale n.191 del 31-7-1967
6. <http://www.simti.it/donazione.aspx?id=3>
7. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sui requisiti minimi organizzativi, strutturali e tecnologici delle attività sanitarie dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta e sul modello per le visite di verifica. Rep. Atti n. 242/CSR del 16 dicembre 2010. gazzetta ufficiale n.113, 17 maggio 2011, Suppl.Ordinario n 124]
8. Legge 26 febbraio 2011, n. 10. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 29 dicembre 2010, n. 225 Proroga di termini previsti da disposizioni legislative e di interventi urgenti in materia tributaria e di sostegno alle imprese e alle famiglie. Gazzetta Ufficiale n. 47 del 26 febbraio 2011
9. DECRETO-LEGGE 31 dicembre 2014, n. 192. Proroga di termini previsti da disposizioni legislative. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.302 del 31-12-2014

10. Legge 27 febbraio 2015, n. 11. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 31 dicembre n. 192, Proroga di termini previsti da disposizioni legislative. Gazzetta Ufficiale n. 49 del 28 febbraio 2015
11. Decreto 2 dicembre 2016. Disposizioni sull'importazione ed esportazione del sangue umano e dei suoi prodotti. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.9 del 12-1-2017]
12. Decreto 2 dicembre 2016. Programma nazionale plasma e medicinali plasmaderivati, anni 2016-2020. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.9 del 12-1-2017.
13. Accordo 25 luglio 2012. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 26 agosto 1997, n. 281, tra il Governo, le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano sul documento concernente: «Linee guida per l'accreditamento dei servizi trasfusionali e delle unità di raccolta del sangue e degli emocomponenti». Rep.atti n.149/CSR Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.107 del 9-5-2013.
14. Relazione sullo stato dell'organizzazione del sistema trasfusionale. atto parlamentare doc.CXXII n.2
15. <http://www.centronazionale sangue.it/pagine/qualita>
16. Decreto Legislativo 9 novembre 2007, n. 208. Attuazione della direttiva 2005/62/CE che applica la direttiva 2002/98/CE per quanto riguarda le norme e le specifiche comunitarie relative ad un sistema di qualità per i servizi trasfusionali. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.261 del 9-11-2007. Suppl. Ordinario n. 228]
17. Decreto Del Presidente Del Consiglio Dei Ministri 1° settembre 2000. Atto di indirizzo e coordinamento in materia di requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l'esercizio delle attività sanitarie relative alla medicina trasfusionale. Gazzetta Ufficiale n. 274 del 23-11-2000.

18. Società Italiana Di Medicina Trasfusionale E Immunoematologia. Standard Di Medicina Trasfusionale. 2° edizione, giugno 2010.
19. Dimonte D., Cazzato L., Polisenò G., Silletti I., Ciancio L., Pepe M., Tursellino M., Ricciardi G., Vaira A., D'Aprile A., Citarella C. Leucofiltrazione prestorage: influenza sui livelli delle citochine. LA TRASFUSIONE DEL SANGUE. settembre - ottobre 2000; 45 (5):281-288.
20. McDonald A., Dzik W. H. Leukoreduction, Leucodeplezione LA TRASFUSIONE DEL SANGUE vol. 46 - num. 6 novembre-dicembre 2001; 46 (6): 347-361.
21. Illeni M.T. La leucodeplezione: perché? LA TRASFUSIONE DEL SANGUE 1 gennaio-febbraio 1999; 44(1):1-7.
22. Scocchera R., Iudicone P., Matteocci A., Terlizzi F., Piccari M., Dionisi M.G., Fioravanti D., Guglielmetti M., Mannella E. Determinazione dei livelli di citochine in concentrati eritrocitari sottoposti a filtrazione e lavaggio. LA TRASFUSIONE DEL SANGUE settembre-ottobre 2002; 47(5): 463-469
23. Brando B, Scarpati B., Fazi C., Cantarelli V., Santoleri L., Angeloro D., Bauli M., Casiraghi M., Cattalani C., Inghilleri G., Mercuriali F. LA Analisi citofluorimetrica dei leucociti residui negli emocomponenti leucodepleti: requisiti tecnici per l'ottimizzazione della metodica TRASFUSIONE DEL SANGUE maggio-giugno 2002; 47(3):389-393.
24. Adams MR, Johnson DK, Busch MP, Schembri CT, Hartz TP, Heaton WA. Automatic volumetric capillary cytometry for counting white cells in white cell-reduced platelet apheresis components. Transfusion. Jan 1997;37(1):29-37
25. Van der Meer PF, Gratama JW, Van Delden CJ, Laport R.F., Levering W. H. B. M., Schrijver J. G., Tiekstra M. J., Keeney M. and De Wildt -Eggen J. Comparison of five platforms for



- enumeration of residual leucocytes in leucoreduced blood components. Br J Haematol. 2001; 115 (4): 953-962.
26. Brecher ME, ed. Technical manual. 15<sup>th</sup> ed. 2005 AABB  
American Association of Blood Banks
27. Manuale di impiego CELL-DYN 3700. principi di funzionamento.
28. ADAM rWBC instruction manual
29. <http://www.ematologiainprogress.it/referto-strumentale-siemens-advia-2120/>
30. La tecnologia dei sistemi ematologici ADVIA. Brochure informativa della Siemens
31. Castegnaro S, Dragone P, Chierigato K, Alghisi A, Rodeghiero F, Astori G. Enumeration of residual white blood cells in leukoreduced blood products: Comparing flow cytometry with a portable microscopic cell counter. Transfusion and Apheresis Science. Apr. 2016;54 (2): 266-270

## **Ringraziamenti**

*Desidero ringraziare il mio relatore Prof. Carru per l'aiuto e la disponibilità dimostrata durante questo corso di studio e per la stesura di questa tesi.*

*Ringrazio il mio correlatore Dott. Greco che mi ha permesso di approfondire questo tipo di studio e mi ha aiutato alla stesura della tesi con disponibilità e pazienza.*

*Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato con suggerimenti, critiche ed osservazioni, in particolare i colleghi del SIT di Alghero. Ringrazio Bruno che, anche se lontano, ha saputo aiutarmi anche in questa occasione.*

*Inoltre vorrei ringraziare i miei cari che mi hanno accompagnato a raggiungere anche questo traguardo: Paolo, i miei genitori e Martina per il supporto e la loro infinita pazienza; ringrazio Nonna, Giovanna, tutti i miei parenti, amici, colleghi del corso di laurea e del lavoro che mi supportano sempre anche con un semplice sorriso.*