

# TRATTAMENTO DEI CAMPIONI EMATICI DEI DONATORI



*Teresa Venezian*

**Il tessuto umano è potenzialmente in grado di trasmettere malattie.**

**Il tessuto di un singolo donatore può essere impiantato a diverse persone moltiplicando i rischi.**

**L'applicazione rigorosa degli standard di selezione comporta l'eliminazione di circa il 30% delle donazioni.**

**Raramente, sono stati riportati casi di infezioni trasmesse dall'osso e, comunque, prevalentemente di tessuto fresco e di quando non erano ancora stati introdotti i test NAT.**

**I dati sono scarsamente confrontabili, anche per i diversi trattamenti del tessuto (lavaggi, antibiotici...).**

**L'osso è scarsamente immunogenico, ma deve essere “pulito” dalle parti molli e dal sangue residuo.**

# **INFEZIONI CHE POTREBBERO ESSERE TRASMESSE DA UN ALLOGRAFTS DI TESSUTO MUSCOLOSCHELETRICO**

**❖ EPATITI DA HCV O ALTRO TIPO  
NON SPECIFICATO**

**❖ HIV**

**❖ HTLV**

**❖ TUBERCOLOSI**

**❖ BATTERICHE**

# RIDUZIONE DEL PERIODO FINESTRA DI HCV – HIV – HBV A SEGUITO DELL'INTRODUZIONE DEI TEST NAT

Virus	PERIODO FINESTRA (giorni)		RIDUZIONE (%)
	Elisa	NAT	
HCV*	70	12	83
HIV*	22	11	50
HBV**	59	35	41

\* Velati C et al. Transfusion 2002; 42: 368-78

\*\* Tosti ME et al. Br J Haematol 2002; 117: 215-9

# TRASMISSIONE DI INFEZIONI

**1 donatore anti-HCV negativo ma HCV-RNA (genotipo 1a) positivo.**

**40 riceventi di organi o tessuti, durante 22 mesi.**

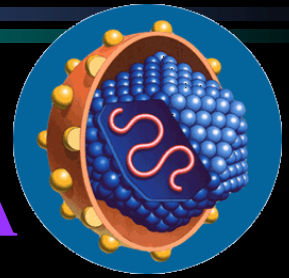
**5 furono infettati prima del trapianto o avevano un genotipo diverso.**

**Di altri 5 riceventi non si avevano campioni post-trapianto.**

**Dei 30 rimanenti, 8 infezioni HCV con genotipo correlato al donatore: 3 riceventi organo, 1 ricevente vascolare (su 2 totali), 1 di tendini tibiali crioconservati (su 3 totali) e 3 di tendini con osso fresco (su 3 totali).**

**Nessun caso per i riceventi di cornee, cute o osso liofilizzato/irradiato.**

(B.Tugwell et al.- Annals of Internal Medicine- vol. 143 – N° 9 - 2005)



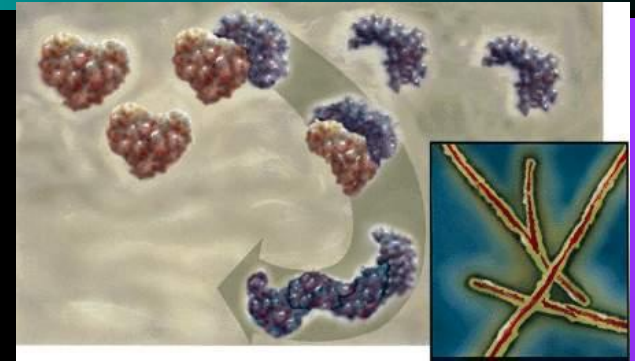
# TRASMISSIONE DI INFEZIONI

**L'HIV è inattivato dalla gammairradiazione ad alte dosi.**

**Anche il freeze-drying ed il trattamento chimico connesso hanno effetto inattivante. Prima dei NAT, veniva comunque ricercata la p24, con una fase finestra di poco superiore.**



# TRASMISSIONE DI INFEZIONI



- ❖ I prioni (particelle infettive di natura proteica, prive di acido nucleico e resistente quindi all'azione degli enzimi che distruggono l'RNA ed il DNA - (pr per **proteina**, i per **infettiva** e one per **particella**) sono un "problema".
- ❖ Sono inattivati solo marginalmente da alte dosi di irradiazione.
- ❖ Il rischio di encefalopatie spongiformi è sondato solo con la valutazione della storia clinico-anamnestica del donatore.

# RIDURRE IL RISCHIO

- ❖ Accurata selezione clinico-anamnestica del donatore.
- ❖ Ricerca dei costituenti antigenici.
- ❖ Ricorso a test che riducono il periodo finestra (NAT).
- ❖ I test dovrebbero essere approvati per i campioni da cadavere.
- ❖ Rimozione di sangue, tessuti molli e prodotti midollari dall'osso.
- ❖ Tecniche di processazione adeguate.
- ❖ Crioconservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



# QUANDO PRELEVARE

- ❖ **Dopo aver accertato l'idoneità del donatore (anamnesi, questionario e consenso).**
- ❖ **Il giorno della donazione o entro i successivi 7 giorni, evitando le 48 ore dopo l'intervento in caso di emodiluizione (per evitare rischi di falsi negativi dovuti alla diluizione plasmatica).**

# CHE COSA PRELEVARE

- ❖ 2 provette di grandi sangue intero, con anticoagulante EDTA, miscelate delicatamente per inversione: questi campioni sono destinati alla BTM IOR.
- ❖ Le provette prelevate vanno inviate immediatamente al servizio che si occupa del frazionamento e dello stoccaggio dei plasmi.
- ❖ Per le analisi di primo livello eseguite presso i vostri laboratori, comportarsi come di consueto, secondo le procedure interne.
- ❖ La BTM ripeterà comunque i test sui campioni prelevati il giorno della donazione.

# STABILITÀ DEI CAMPIONI

- ❖ La stabilità dei campioni è influenzata da temperature elevate; i campioni di plasma, vengono sottoposti a test in biologia molecolare, che possono essere facilmente soggetti a contaminazioni.
- ❖ Separare il plasma entro 6 ore; è comunque possibile conservare sangue intero tra i 2 – 25 °C per non più di 6 ore; tra 0 e 4 °C per non più di 72 ore.
- ❖ Il sangue intero non può essere congelato.

# STABILITÀ DEI CAMPIONI

- ❖ **Una volta separato (prima di congelarlo o dopo scongelamento), il plasma può essere conservato tra 2 – 8 °C per un massimo di 72 ore.**
- ❖ **Per periodi superiori, come accade nel caso delle aliquote destinate alla BTM, deve essere congelato a –70 o -80 °C, in tubi sterili, con tappo di polipropilene.**
- ❖ **Il plasma non deve essere sottoposto a più di 2 cicli di congelamento/scongelamento.**

# FRAZIONAMENTO

- ❖ Centrifugare a 3000 rpm, per 20 minuti.
- ❖ Usare i guanti: sulla superficie cutanea sono presenti RNAsi che potrebbero inficiare i risultati dei test di amplificazione degli acidi nucleici (NAT).
- ❖ Utilizzare materiale sterile (puntali e cryovials).
- ❖ Il materiale d'uso, originariamente confezionato sterilmente, va mantenuto pulito anche dopo l'apertura della confezione: è quindi importante mantenere chiuso il sacchetto delle cryovials ed il portapuntali.
- ❖ La pipetta va impugnata solo con i guanti, ed è necessario mantenerla pulita.

# FRAZIONAMENTO

- ❖ Eseguire il frazionamento in un'area dedicata.
- ❖ Le superfici di lavoro devono essere mantenute pulite e protette da un foglio di carta bibula.
- ❖ Frazionare il plasma in 4 aliquote (due cryovials da 5 ml + due da 3 ml); nelle cryovials più grandi aliquotare almeno 2 ml di plasma (preferibile aliquotare plasma proveniente da entrambe le provette madri).
- ❖ Distribuire il plasma rimanente nelle due restanti cryovials da 3 ml.
- ❖ Stappare le cryovials solo al momento del frazionamento.

# FRAZIONAMENTO

- ❖ **In caso di campioni di più donatori, è buona norma stappare esclusivamente le provette del campione che si sta frazionando, controllando la congruenza dei dati identificativi (nome su entrambe le provette madri, nome su ogni provetta figlia, nome sul sacchetto o contenitore..).**
- ❖ **Non prelevare la parte corpuscolata, contaminando il plasma.**

# STOCCAGGIO

- ❖ **Segnalare la presenza di emolisi o campioni lipemici.**
- ❖ **I plasmi dei donatori, dovendo essere conservati per periodi lunghi, vanno congelati ad almeno – 70 C.**



# STOCCAGGIO

**Utilizzare provette cryovials provviste di tappo a vite esterno: le provette con tappo a vite interno, infatti, al momento dello scongelamento, causano pericolose fuoriuscite di plasma, rimasto adeso al tappo; consigliamo il modello con tappo di chiusura esterno (tipo cryovials sterili, con tappo di propilene) da 5 e 3 ml.**

# IDENTIFICAZIONE

- ❖ **Non utilizzare etichette che si staccano, al momento dello scongelamento né di dimensioni tali da aumentare il volume della provetta (così non più inseribile negli appositi box per la crioconservazione), costringendo a staccarle (con conseguente rottura della stessa etichetta e rischi di errori nell'identificazione del campione).**
- ❖ **Non impedire l'osservazione diretta del plasma contenuto, coprendo tutta la superficie con l'etichettatura.**

# IDENTIFICAZIONE

- ❖ **Preferibile scrivere direttamente sulla provetta, ma sempre con pennarelli di accertata resistenza all'acqua.**
- ❖ **Impostare istruzioni di lavoro che standardizzino l'operatività, con un sistema di accurato controllo dell'anagrafica, per evitare il più possibile rischi di errori pre-analitici.**

## INVIO ALLA BTM

- ❖ Al momento del trasporto alla Banca di riferimento, le condizioni di confezionamento e di trasporto devono essere tali da mantenere lo stato di congelamento.
- ❖ Trasporti per tragitti lunghi, nei periodi di alta temperatura ambientale, richiedono l'utilizzo di ghiaccio secco.
- ❖ Deve essere garantito il trasferimento alla BTM entro un mese dal prelievo.