

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Tesi di Laurea Triennale in
INGEGNERIA BIOMEDICA

**STUDIO SULLA VALIDAZIONE
DEL CONGELAMENTO DEL
PLASMA**

Laureanda:
Carmela di Fazio

Relatore:
Prof. Enrico Grisan
Correlatore:
Ing. Lorenzo Camiletti

Anno Accademico 2011/2012

Indice

Introduzione	5
1 Il sangue e i suoi componenti	7
1.1 Il sangue	7
1.1.1 Emopoiesi	8
1.2 Componenti del sangue	9
1.2.1 Gli eritrociti	9
1.2.2 I leucociti	10
1.2.3 Le piastrine	11
1.2.4 Il plasma	12
1.3 Dal sangue al plasma	12
1.3.1 Produzione di plasma e plasmaferesi	12
1.3.2 Plasma fresco congelato	15
2 Procedura di congelamento del plasma	21
2.1 Normative europee	21
2.1.1 Farmacopea Europea	22
2.2 Raccomandazioni del Consiglio d'Europa del Comitato dei Ministri	24
2.2.1 Recommendation n° R (95) 15	24
2.2.2 Good Manufacturing Practise (GMP) per gli emocom- ponenti	25

2.2.3	Raccolta del sangue	26
2.3	Preparazione degli emocomponenti	31
2.3.1	Congelamento del plasma	32
2.3.2	Metodi di congelamento	33
2.3.3	Metodi di scongelamento	34
3	Studio di validazione presso l'ULSS 17	37
3.1	Azienda ULSS 17	37
3.2	Il Servizio di Ingegneria Clinica	39
3.3	Descrizione dello studio di validazione	41
3.3.1	Raccolta dei dati	44
3.4	Analisi dei risultati ottenuti	46
	Conclusioni	51
A	Dati rilevati	53
A.1	Rilevamento della temperatura per la sacca da 600 <i>ml</i> riem- pita di soluzione fisiologica posta sul primo e secondo ripiano	53
A.2	Rilevamento della temperatura per la sacca da 600 <i>ml</i> riem- pita di soluzione fisiologica posta sul terzo e quarto ripiano	55
	Bibliografia	57
	Ringraziamenti	59

Introduzione

In passato, la terapia trasfusionale era attuata, quasi esclusivamente, con il sangue intero. In certe circostanze, in effetti, il sangue intero può ancora essere utilizzato, ma nella moderna terapia trasfusionale è sempre più diffuso adoperare gli emocomponenti specifici che sono indicati dalla clinica.

Per emocomponenti si intendono i costituenti terapeutici del sangue che possono essere preparati attraverso le metodologie convenzionali impiegate nei Servizi Trasfusionali, ad esempio, la centrifugazione, la filtrazione e il congelamento.

La trasfusione di sangue viene utilizzata per svariati fini. Ma risulta chiaro che un solo prodotto, ovvero, il sangue intero, non può essere adatto a tutti gli scopi (mantenere il trasporto dei gas respiratori, ossigeno e anidride carbonica; correggere i disordini della coagulazione e le emorragie; correggere una deficienza del sistema immunitario; mantenere la volemia).

Ai pazienti deve essere fornito il singolo componente in grado di correggere ogni loro specifica deficienza. Grazie a ciò si evita l'infusione di inutili, e in qualche caso anche pericolosi, componenti.

La ragione più importante affinché venga promosso in un'azienda ospedaliera l'uso di emocomponenti riguarda la sua conservazione. Infatti, le condizioni ottimali di conservazione, che garantiscono quindi la sopravvivenza dei differenti componenti, variano considerevolmente.

Il plasma ad esempio, tema centrale di questo studio, presenta la miglior

qualità dei suoi costituenti se si trova allo stato congelato. Il congelamento è infatti il punto critico per la conservazione del fattore VIII, uno dei più importanti fattori labili della coagulazione del sangue.

Eventuali ritardi nella preparazione o anche conservazioni inadatte degli emocomponenti possono influenzare negativamente la qualità del prodotto finale. Per tutti questi motivi il congelamento del plasma va fatto rispettando le normative europee.

Il presente lavoro si pone come obiettivo l'analisi dello studio effettuato all'interno di una struttura ospedaliera, l'ULSS 17, presso il Servizio Trasfusionale situato nella sede distrettuale di Este.

L'argomento principale è la descrizione della procedura del congelamento del plasma, a partire da come avviene il prelievo del sangue, spiegando in dettaglio le modalità di separazione nei suoi emocomponenti, soffermandoci in particolare sul trattamento riservato al plasma.

Si passa poi ad analizzare le linee guida dettate dal Consiglio d'Europa che regolano l'uso, la preparazione e la garanzia di qualità degli emocomponenti prodotti, in particolare descrivendo la "Raccomandazione n°R (95) 15".

Successivamente sono riportati i dati raccolti da me personalmente durante lo studio di validazione eseguito all'interno dell'Unità Operativa del Centro Trasfusionale, osservando da vicino il lavoro dei medici affiancati dai tecnici del reparto, e le apparecchiature che vengono impiegate per tale attività.

Infine verranno analizzati i risultati trovati nel corso delle misurazioni e in collaborazione con il Servizio di Ingegneria Clinica e il responsabile Gestione della Qualità del Servizio Trasfusionale si stabilisce se lo studio di validazione effettuato ha raggiunto gli obiettivi previsti e, in caso di risposta positiva, può essere accettato.

Capitolo 1

Il sangue e i suoi componenti

1.1 Il sangue

Il sangue è un tessuto connettivo allo stato liquido, con comportamento di un fluido non newtoniano, che circola nei vasi sanguigni.

Ha una composizione molto complessa. E' formato da elementi corpuscolati sospesi in un liquido plasmatico, che è anch'esso un tessuto connettivo.

Il sangue fornisce le sostanze necessarie per la sopravvivenza dell'organismo, porta nutrienti e ossigeno alle cellule corporee e trasporta invece i prodotti catabolici lontano da esse.

L'aggettivo "ematico" che si riferisce al sangue, proviene dal greco $\alpha\iota\mu\alpha$, $\alpha\iota\mu\alpha\tau\omicron\varsigma$, che significa "sangue".

Il sangue umano è di tipo arterioso e venoso. Il sangue arterioso ha un colore rosso molto intenso, quello venoso ha un color rosso-violaceo.

Il sangue ha una viscosità circa 4 volte superiore a quella dell'acqua e un peso specifico di $1,041 - 1,062 \text{ g}/(\text{cm})^3$.

Negli esseri umani costituisce circa il 7% del peso corporeo, ha una temperatura di $37-38^\circ\text{C}$ ed ha un pH di $7,38 - 7,42$.

Gli uomini e le donne hanno una differente composizione del sangue: negli uomini il 55% è formato da plasma e il restante 45% da parte corpuscolata,

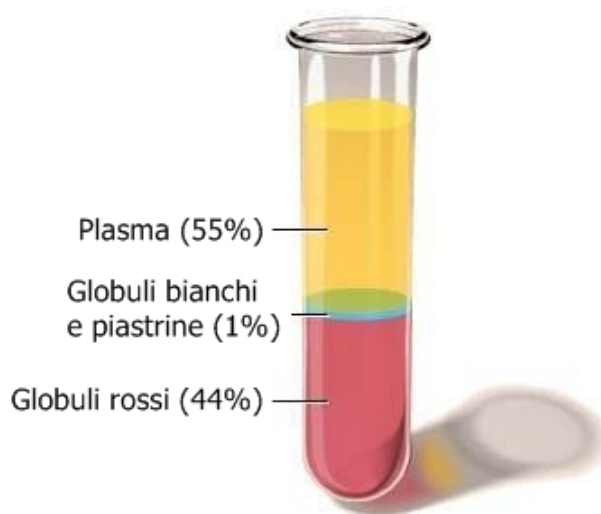


Figura 1.1: Composizione del sangue in un individuo maschile

le donne hanno invece, il 60% di parte liquida e il 40% di parte corpuscolata. La percentuale di volume sanguigno complessivo occupato dai corpuscoli è detto ematocrito e serve a valutare in condizioni normali il volume degli elementi corpuscolati del sangue, o un eventuale stato anemico se tale valore risulta diminuito.

1.1.1 Emopoiesi

Il termine emopoiesi indica il processo di formazione e la conseguente maturazione di tutti i tipi di cellule del sangue a partire dai loro precursori. Negli esseri umani adulti tutti gli elementi corpuscolati presenti nel sangue originano da cellule ematiche prodotte dal midollo osseo dello scheletro assiale.

Questo tessuto è presente nelle ossa di tutto l'organismo in quantità variabile dai 3000 ai 4000 cm^3 ; tuttavia la parte di esso effettivamente funzionante, il midollo osseo vero e proprio si aggira sui 1500 cm^3 .

In un solo giorno il midollo rosso fabbrica circa 250 miliardi di globuli rossi,

15 miliardi di globuli bianchi e 500 miliardi di piastrine. Se immaginiamo che la fabbricazione di cellule sia abbastanza uniforme, ciò significa che in un minuto vengono riversati nella circolazione 170 milioni di globuli rossi, 10 milioni di globuli bianchi e 340 milioni di piastrine.

Il progenitore comune dei globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, si chiama emocitoblasto.

L'emocitoblasto è una cellula che genera la parte corpuscolare del sangue: globuli rossi attraverso l'eritropoiesi, globuli bianchi attraverso la granulocitopoiesi e piastrine mediante piastrinopoiesi.

Le cellule del sangue, nell'adulto, sono prodotte dal midollo osseo, dalle linfoghiandole e dalla milza, organi principali del sistema linfatico, detti organi emopoietici per la funzione che svolgono.

1.2 Componenti del sangue

1.2.1 Gli eritrociti

Gli eritrociti o globuli rossi, sono gli elementi anucleati più numerosi del sangue.

Durante l'emopoiesi perdono il nucleo, e per questo non possono essere definiti cellule vere e proprie.

Nell'uomo adulto raggiungono i $5 \text{ milioni}/\text{mm}^3$, nella donna $4,5 \text{ milioni}/\text{mm}^3$.

Gli eritrociti sono a forma di un disco biconcavo ed hanno un diametro di $7-8 \mu\text{m}$. La particolare forma serve a facilitare gli scambi per diffusione della membrana plasmatica.

Nell'eritrocita non vi sono mitocondri; infatti la fonte di energia principale, il glucosio, viene scissa tramite la glicolisi e la via degli esoso-fosfati.

I globuli rossi sono prodotti dal midollo osseo rosso delle ossa piatte, e hanno

una vita media di circa 120 giorni.

In alcune condizioni patologiche, l'eritrocita umano subisce cambiamenti morfologici, come nel caso dell'anemia falciforme, dove si presenta come una foglia avvolta su se stessa.

1.2.2 I leucociti

I leucociti (o globuli bianchi) sono cellule contenenti un nucleo, più grandi ma meno numerose dei globuli rossi. In condizioni normali la loro concentrazione nel sangue è di circa $7000/mm^3$.

La funzione principale dei globuli bianchi è quella di preservare l'organismo dagli attacchi di microrganismi patogeni quali batteri o virus migrando nel sangue per mezzo di agenti chemio-attraenti che permettono loro di raggiungere la sede dell'infiammazione. Svolgono inoltre funzione di difesa contro corpi estranei penetrati nell'organismo previo superamento delle barriere costituite dalla cute e dalle mucose.

I leucociti si distinguono in granulociti e agranulociti e seconda che ci sia presenza o assenza di granuli nel citoplasma.

I granulociti comprendono:

- granulociti neutrofilii,
- granulociti eosinofili,
- granulociti basofili.

Gli agranulociti comprendono i linfociti e i monociti (o macrofagi).

Un'importante caratteristica funzionale dei leucociti è la motilità. Tali cellule, infatti, non sono solo trasportate passivamente nel torrente circolatorio,

ma sono anche in grado di sviluppare una locomozione attiva utilizzando alcune proteine del citoscheletro.

1.2.3 Le piastrine

Le piastrine, o trombociti, svolgono un ruolo essenziale nella coagulazione del sangue.

Esse non sono vere e proprie cellule ma frammenti derivati da grandi cellule prodotte dal midollo osseo, che prendono il nome di megacariociti.

Quando un vaso sanguigno si danneggia, le piastrine vengono richiamate nella zona interessata e si aggregano, e una volta aderite alla parete, liberano una sostanza che trasforma il fibrogeno (proteina plasmatica) in fibrina. Questa sostanza, forma una rete di fibre in cui si impigliano gli eritrociti per formare il coagulo. La barriera del sangue coagulato e delle piastrine arresta così la fuoriuscita di sangue.

La concentrazione delle piastrine nel sangue è di circa $250000/mm^3$

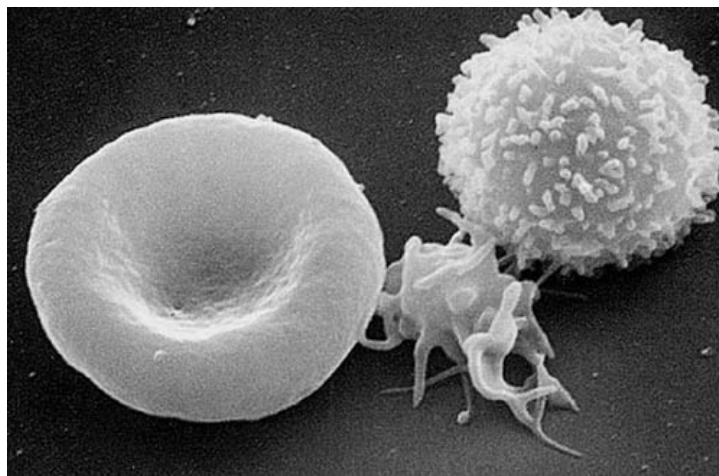


Figura 1.2: Globulo rosso, piastrina, e globulo bianco al microscopio

1.2.4 Il plasma

Il plasma costituisce la parte liquida del sangue. In esso sono sospese le cellule sanguigne. Il plasma contiene proteine, nutrienti, prodotti del metabolismo, ormoni e elettroliti inorganici.

Il plasma ha un colore molto simile al giallo paglierino. È composto per il 90% da acqua, per il 7% da proteine, per lo 0,1% da altre sostanze organiche e per lo 0,9% da sostanze inorganiche.

Funge da mezzo di trasporto per il glucosio, i lipidi, gli ormoni, i prodotti del metabolismo, anidride carbonica ed ossigeno.

La capacità di trasporto dell'ossigeno è relativamente bassa se comparata a quella dell'emoglobina contenuta nei globuli rossi; può essere aumentata in condizioni iperbariche.

Il plasma è anche il mezzo di immagazzinamento e trasporto dei fattori della coagulazione, quali la fibrina, ed il suo contenuto di proteine è necessario per mantenere la pressione osmotica del sangue.

Negli uomini il plasma occupa il 55% del volume, nelle donne il 60%.

1.3 Dal sangue al plasma

1.3.1 Produzione di plasma e plasmaferesi

Per effettuare un esame del sangue, il plasma è ottenuto da sangue intero (SI) oppure da aferesi.

Nella donazione standard il sangue viene raccolto in un sistema di sacche sterili, sottoposto a centrifugazione per permettere la separazione dei globuli rossi e plasma e successivamente sottoposto a filtrazione per rimuovere globuli bianchi e piastrine.

Per prevenire la coagulazione, viene aggiunto al campione di sangue, subito



Figura 1.3: Centrifuga

dopo il prelievo, un anticoagulante, come l'eparina.

Il plasma da sangue intero è ottenuto separandolo dal sangue intero e raccolto in una sacca con contenitori satelliti pre connessi utilizzando elevate velocità di centrifugazione preferibilmente entro sei ore dalla raccolta e comunque non oltre le diciotto ore se l'unità è refrigerata.

Dopo la centrifugazione il sangue è visibilmente separato dal plasma (fig. 1.4) e viene inserito in una macchina automatica a sensori ottici (fig. 1.5) che ne effettua una separazione definitiva in due sacche. Essa permette, mediante una azione meccanica di spremitura, il passaggio delle varie componenti del sangue dalla sacca di partenza alle sacche satelliti collegate.

La sacca di plasma che ne risulta ha mediamente un volume di 300 ml.

La procedura di aferesi manuale o automatica è estremamente vantaggiosa perché consente di raccogliere selettivamente i singoli componenti del sangue.

Durante la plasmaferesi, al donatore viene sottratta la sola parte liquida del



Figura 1.4: Sangue separato dal plasma dopo la centrifugazione

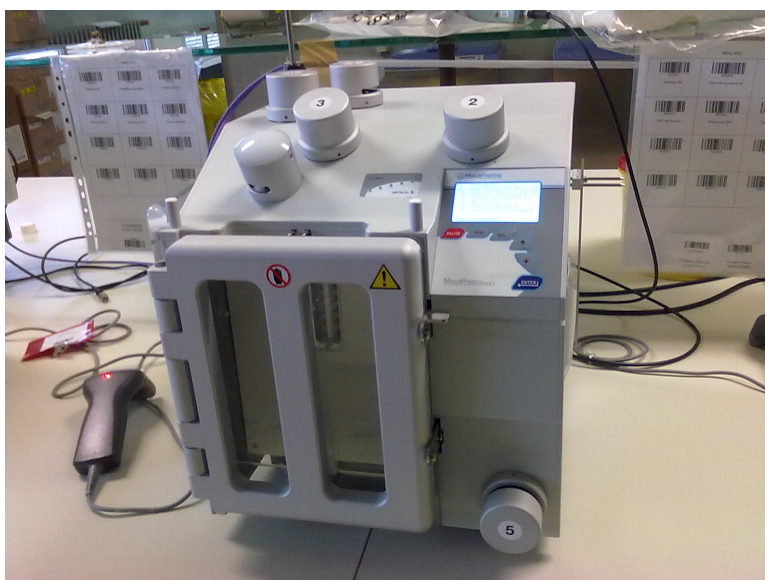


Figura 1.5: Macchina automatica a sensori ottici per l'estrazione di plasma

sangue, il plasma, mentre la componente cellulare gli viene restituita tramite lo stesso ago di prelievo.

Il separatore cellulare, infatti, funziona a cicli costituiti da una prima fase di prelievo ematico con separazione e raccolta del plasma e da una successiva fase di reinfusione della componente corpuscolata.

La plasmaferesi è una procedura fondamentale per la produzione dei cosiddetti farmaci plasmaderivati.

Nella componente liquida del sangue, infatti, troviamo notevoli quantità di proteine, quindi anticorpi (immunoglobuline), ormoni peptidici, fattori della coagulazione e proteine necessarie al trasporto delle sostanze insolubili. Nel plasma sono inoltre presenti gas respiratori e tutti i vari nutrienti tra cui glucosio, vitamine, aminoacidi, acidi grassi.

La componente proteica del plasma è fondamentale per la produzione di farmaci da destinare ai pazienti con deficit di specifiche sostanze plasmatiche; i soggetti colpiti da emofilia A e B, ad esempio, presentano una forte carenza dei fattori VIII o IX della coagulazione, che possono essere estratti e purificati dal plasma del donatore quindi somministrati al ricevente.

Al termine della procedura di aferesi può avvenire il congelamento (da effettuarsi entro sei ore) e ad una temperatura inferiore a -30°C .

1.3.2 Plasma fresco congelato

Il plasma fresco congelato (PFC) è un emocomponente preparato da sangue intero o raccolto da plasma mediante aferesi, congelato entro un limite di tempo e a temperature tali da preservare i fattori labili della coagulazione. Le singole unità di PFC da sangue intero o da aferesi valutate idonee all'utilizzo clinico sono sottoposte ad inattivazione virale con blu di metilene (MB) oppure mediante una metodologie di inattivazione di tipo industriale, note con i nomi di PlasmaSafe o Octaplas.

Tutti gli emocomponenti sono preparati, conservati e assegnati direttamente dal servizio immunotrasfusionale (SIMT).

Il plasma fresco congelato da sangue intero ed il plasma da aferesi presentano proprietà e caratteristiche biologiche equivalenti. Le unità di PFC da sangue intero hanno un volume variabile tra 230 e 315 *ml*. Le unità di PFC da aferesi hanno un volume di 470 - 630 *ml*.

Il principio attivo del plasma è costituito dalle proteine plasmatiche umane

(albumina, immunoglobuline, fattori stabili e labili della coagulazione) per una quantità totale di proteine superiore a 50 g/l. Contiene fattore VIII_c in quantità maggiore di 70 IU per 100 ml e quantità simili degli altri fattori labili e degli inibitori naturali della coagulazione. Tra le cellule residue vi sono le emazie, i leucociti e le piastrine.

Il plasma è inoltre privo di anticorpi irregolari clinicamente significativi.

Il suo pH è di circa 7.2 – 7.4 (7.383 è il pH di una soluzione fisiologica). Affinché possa essere impiegato per trasfusioni o studi non deve presentare nessuna colorazione anormale o presenza di emolisi.

Gli esami di laboratorio prescritti: HIV1/2-Ab, HCV-Ab, Lue, HBsAg, ALT, HIV1 RNA - HCV RNA – HBV DNA devono avere tutti esito negativo.

Il congelamento deve avvenire a -30°C entro un'ora dal prelievo per il plasma ottenuto da aferesi ed entro 6 ore per quello ottenuto da centrifugazione da sangue intero.

Può essere conservato a temperature inferiori ai -25°C fino a 24 mesi, tra -18°C e -25°C per 3 mesi; tra -25°C e -40°C per 6 mesi. Trascorsi questi periodi, il preparato è utilizzabile solo per la produzione di frazioni plasmatiche. Se il plasma deve essere trasportato bisogna fare attenzione che la temperatura di conservazione sia mantenuta durante il trasporto.

Il plasma fresco congelato può essere utilizzato per ripristinare i disordini della coagulazione, particolarmente in quelle situazioni cliniche in cui coesistono deficit coagulativi multipli. Ad esempio:

- deficit congeniti o acquisiti di singoli fattori della coagulazione, in presenza di emorragia o quando devono essere sottoposti a procedura invasiva, quando il tempo di protrombina (PT), e/o il tempo di tromboplastina (PTT), espresso come rapporto paziente/controllo sia uguale o maggiore a 1.5;
- pazienti con sanguinamento massivo che sono a rischio di deficit dei

fattori della coagulazione in attesa dei risultati del PT e PTT;

- nella fase acuta della coagulazione intravascolare disseminata (CID), con coagulopatia da consumo accertata con comparsa contemporanea di alterazioni di PT, PTT, significativa diminuzione del fibrinogeno e delle piastrine, in presenza di FDP;
- Porpora Trombotica Trombocitopenica, Sindrome Emolitico-Uremica, Sindrome HELLP;
- coagulopatia da anticoagulanti orali, in range terapeutico o sovradosaggi.

Il suo maggiore impiego è quello di materia prima per il frazionamento plasmatico (preparazione dei plasmaderivati dell'industria).

Nella terapia trasfusionale vanno rispettate alcune precauzioni d'uso.

Deve essere usato un plasma AB0 compatibile con il ricevente.

Prima dell'impiego il PFC deve essere correttamente scongelato ad una temperatura compresa tra 30°C e 37°C in un'apparecchiatura opportunamente controllata, valutando l'integrità del contenitore.

Alla fine del processo di scongelamento non deve essere visibile crioprecipitato insolubile. Il plasma così scongelato deve essere usato il più presto possibile (entro 6 ore dallo scongelamento) e comunque non oltre le 24 ore se conservato fra +2°C e +6°C e non può essere ricongelato. E' consigliata l'infusione rapida (entro 20 minuti) per ottenere un picco di attività dei fattori della coagulazione.

Il PFC non deve essere utilizzato:

- in riceventi con intolleranza alle plasmaproteine;
- per correggere un deficit della volemia in assenza di alterazioni della coagulazione, né come sorgente di immunoglobuline;

- come apporto nutritivo;
- per correggere stati ipo-disprotidemicici;
- nei deficit congeniti o acquisiti dei fattori della coagulazione non accompagnati da emorragia;
- a scopo profilattico in caso di circolazione extracorporea o di trasfusione massiva;
- nelle epatopatie croniche senza emorragie in atto;
- per trattare emorragie in assenza di deficit dei fattori della coagulazione.

La terapia trasfusionale oltre ad evidenti benefici, presenta anche dei rischi. La conoscenza di questi rischi è particolarmente importante per tutti coloro che hanno il compito di prescrivere la trasfusione di sangue o di suoi componenti.

Anche i pazienti devono essere informati dei rischi, dei benefici, e delle eventuali alternative alla trasfusione.

Tra gli effetti collaterali potrebbero esserci:

- intossicazione da citrato in caso siano trasfusi grandi quantità di plasma fresco congelato;
- reazioni trasfusionali non emolitiche quali brividi, ipertermia, orticaria;
- sepsi dovuta ad involontarie contaminazioni batteriche;
- trasmissioni di malattie virali, possibili anche in presenza di una attenta e scrupolosa selezione di donatori;
- trasmissioni di altri agenti patogeni non conosciuti o non testati.

Inoltre l'effetto della trasfusione va controllato con i test emocoagulativi a distanza di quattro ore dalla somministrazione.

Per tutti questi motivi, se la trasfusione di plasma fresco congelato non è l'unica terapia possibile, è fortemente consigliato, in quei casi, di utilizzare altri prodotti alternativi sottoposti ad inattivazione virale.

Capitolo 2

Procedura di congelamento del plasma

2.1 Normative europee

La farmacopea è un codice farmaceutico che contiene un insieme di disposizioni tecniche e amministrative volte a permettere il controllo di qualità dei medicinali (sostanze e preparati finali) mediante l'indicazione di metodi di verifica analitica e tecnologia delle specifiche di qualità e dei metodi di preparazione.

Ogni stato del mondo ha una propria farmacopea ufficiale, un testo compilato da organismi statali di controllo delle varie nazioni, che si basa su ricerche e giudizi di istituti universitari accreditati.

Essa descrive i requisiti di qualità delle sostanze ad uso farmaceutico, le caratteristiche che i medicinali preparati (farmaci galenici) debbono avere ed il loro metodo di preparazione, elencando composizione qualitativa e quantitativa delle sostanze che lo compongono.

Affinché sia efficace, la farmacopea deve comprendere tutte le sostanze importanti dal punto di vista delle terapie.

2.1.1 Farmacopea Europea

La Farmacopea Europea è una farmacopea a livello europeo che ha lo scopo di accordare i testi delle principali farmacopee ufficiali degli stati europei e di ricercare norme comuni riconosciute sulla qualità dei medicinali. Inoltre serve a facilitare la libera circolazione dei medicinali prodotti in Europa ed assicurare la qualità dei prodotti importati.

Ogni stato europeo ha una propria farmacopea ufficiale nazionale, ma insieme si sono accordati per adottare una farmacopea comune.

La Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana (indicata come F.U.) è una raccolta di disposizioni con contenuto tecnico ed efficacia normativa, destinate ad assicurare l'uniformità dell'origine, della qualità e della composizione dei medicinali. Oltre a disposizioni relative al servizio di farmacia ed alla produzione di medicinali, essa contiene, in appositi testi chiamati monografie, le specifiche relative all'identità della qualità ed alla purezza di materie prime e di preparazioni farmaceutiche (Formulario Nazionale), così come i metodi ufficiali per effettuare analisi svolte all'accertamento della identità, della qualità e della sicurezza.

Una parte considerevole delle monografie e dei metodi riguarda sostanze di natura biologica, la cui descrizione e il cui controllo analitico richiedono spesso un linguaggio adeguato che va sempre più specializzandosi, seguendo il progresso tecnologico e scientifico della progettazione e della realizzazione di nuovi farmaci.

La Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana contiene testi nazionali e in base alla convenzione europea per l'elaborazione della Farmacopea Europea, adottata a Strasburgo il 22 luglio 1964, recepisce in italiano i testi della Farmacopea Europea, che viene pubblicata in due lingue, inglese e francese.

Con il decreto del Ministero della sanità del 9 ottobre 1988 entrano diretta-

mente in vigore i testi in inglese e in francese del Supplemento 1988 della terza edizione della Farmacopea Europea.

La XII edizione della Farmacopea Ufficiale Italiana, è entrata in vigore il 31 marzo del 2009 è stata edita dall'Istituto Poligrafico dello Stato.

Questa nuova edizione sostituisce a tutti gli effetti il testo base ed il primo supplemento dell'XI edizione. Il volume è articolato in 8 tabelle che raccolgono prescrizioni con valore legale, caratteristiche e metodi di analisi e controllo di farmaci e formule. Sono presenti elenchi dei pesi atomici, delle sostanze medicinali obbligatorie (comprese quelle velenose da conservare in luogo sicuro), degli apparecchi e strumenti obbligatori e dei prodotti da vendere solo dietro prescrizione medica. Nella farmacopea è inclusa inoltre una nomenclatura completa dei composti farmaceutici con relative modalità di conservazione e di etichettatura.

La FU viene inoltre integrata dai testi della VI edizione della Farmacopea Europea (PhEur), entrata in vigore dal primo gennaio del 2008, al fine di armonizzazione i testi delle principali farmacopee ufficiali degli stati europei e di individuare norme comuni riconosciute sulla qualità dei medicinali, per facilitare la libera circolazione dei prodotti medicinali in Europa ed assicurare la qualità di quelli importati.

L'Italia è uno dei paesi europei che accanto alla propria farmacopea, utilizza la Farmacopea Europea come farmacopea nazionale. Nelle etichette dei farmaci la sigla PE accanto al nome delle sostanze indica che la sostanza utilizzata risponde a tutte le specifiche di qualità richieste dalla farmacopea europea.

La PhEur è articolata in 2 volumi.

Il primo riporta una parte generale, che comprende una prefazione, un'introduzione, l'elenco dei membri della commissione che si occupa di elaborare i testi, di approvarli, pubblicarli e revisionarli, i capitoli generali e le mono-

grafie generali.

Il secondo volume tratta delle monografie specifiche delle sostanze (prodotti chimici, organici, di sintesi o estrattivi, inorganici, vegetali, biotecnologici). Per ciascuna sostanza vengono descritte le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche, le reazioni di identificazione, i saggi cui ciascuna sostanza deve rispondere, il metodo di determinazione quantitativa e in qualche caso anche le modalità di conservazione. Oltre ai principi attivi, in questa parte sono riportati anche i composti utilizzati come eccipienti o anche i prodotti utilizzati come materie prime per i contenitori o prodotti che comunque entrano a far parte di un medicamento.

Non è prevista alcuna indicazione riguardante l'attività terapeutica, la tossicità o il dosaggio, in quanto la farmacopea europea corrisponde ad un codice di qualità.

2.2 Raccomandazioni del Consiglio d'Europa del Comitato dei Ministri

Il Comitato dei Ministri, ai sensi dell'articolo 15.b dello Statuto del Consiglio d'Europa, raccomanda che i governi degli Stati membri prendano tutte le misure e facciano i passi necessari per assicurare che preparazione, uso e controllo di qualità degli emocomponenti vengano condotti in accordo con le linee-guida della Raccomandazione n° R 95 (15).

2.2.1 Recommendation n° R (95) 15

Lo scopo di questa Raccomandazione è quello di fornire ai Servizi Trasfusionali europei una serie di linee-guida e di principi sulla preparazione, uso e garanzia di qualità degli emocomponenti.

Le linee-guida, così come la descrizione dei diversi emocomponenti, dovrebbero essere valide anche per le strutture trasfusionali ospedaliere e per i clinici, fruitori di tali prodotti terapeutici.

Dato che tali linee-guida erano state primitivamente e originariamente formulate per fornire informazioni sulle garanzie di qualità, ci si deve attendere una particolare enfasi a questo riguardo, soprattutto sulla selezione dei donatori e sul controllo dei reagenti, come sui test di efficienza del personale che esegue le procedure necessarie ad una sicura preparazione, selezione e trasfusione del sangue e dei suoi componenti.

Questa raccomandazione riguarda tutti i normali componenti del sangue che possono essere preparati, routinariamente, dai Servizi Trasfusionali, mentre non contempla i prodotti ottenuti dal plasma umano per frazionamento. Quest'ultimo aspetto della trasfusione del sangue è sotto la responsabilità della Farmacopea Europea e della Commissione delle Comunità Europee. E' inevitabile che, anche nei migliori laboratori, qualche materiale fallisca e che sia necessario stabilire un severo protocollo delle procedure da adottare in tali eventualità.

Risulta essenziale quindi, che tutto il personale di un Servizio Trasfusionale sia istruito ad accettare i controlli di qualità (CQ) come parte necessaria dell'attività quotidiana.

2.2.2 Good Manufacturing Practise (GMP) per gli emocomponenti

Una buona qualità è cruciale per gli emocomponenti, se si considera l'uso cui sono destinati.

Di conseguenza, raccolta, lavorazione, conservazione e distribuzione del sangue e dei suoi componenti debbono essere organizzati in modo tale da assicurare la più alta qualità possibile.

Questo fine può essere raggiunto solamente se la struttura trasfusionale ha un sistema di organizzazione della qualità.

L'organizzazione della qualità richiede un sistema integrato di garanzie che riguardano tutte le componenti e le attività, individuali e collettive, in grado di influenzare la qualità totale. Un tale sistema comprende: GMP, CQ e un programma di verifica retrospettiva (chiamato audit programme), tutti strettamente collegati fra loro.

La GMP riguarda sia i procedimenti che il CQ della produzione degli emocomponenti, mentre il CQ interno e i test di efficienza rivestono aspetti che concernono l'esame del materiale in uso e delle attività del personale, al fine di accertare che entrambi soddisfino precisi requisiti.

Tali requisiti riguardano:

- controlli di qualità e test di efficienza;
- verifiche interne ed esterne;
- organizzazione generale e specifica del personale;
- locali, apparecchiatura e materiali;
- registrazioni;
- lavorazione del sangue;
- reclami;
- gestione degli errori e degli incidenti.

2.2.3 Raccolta del sangue

E' fondamentale la scelta dei donatori.

I principi basilari dell'autosufficienza basata su donazioni volontarie e non-remunerate sono stati raccomandati e promossi dal Consiglio d'Europa e

sono stati definiti nell'art. 2 della raccomandazione n° R (95) 15 del Consiglio d'Europa come segue:

”Una donazione si considera volontaria e non-remunerata se la persona dà sangue, plasma, o prodotti cellulari ematici di sua propria volontà e non riceve alcun pagamento per questo, sia sotto forma di contante sia sotto altre forme che possono essere considerate un sostituto di monetizzazione. In queste forme dovrebbero essere comprese anche astensioni remunerate dal lavoro, tolte quelle relative al tempo ragionevolmente necessario alla donazione e all'itinere. Minimi pagamenti simbolici, ristori e rimborsi delle spese di viaggio effettivamente sostenute sono compatibili con il principio di donazione volontaria, non-remunerata”.

Sono stati anche adottati dalla Commissione Europea nella Direttiva 39/381 che, all'articolo 3, paragrafo 4, stabilisce che il plasma e il sangue umano sono da considerarsi materiale di base per la produzione di prodotti farmaceutici:

”Gli Stati membri debbono prendere tutte le misure atte a promuovere l'autosufficienza in sangue e plasma umano. A questo fine, essi debbono incoraggiare la donazione volontaria gratuita di sangue e di plasma e prendere anche i provvedimenti necessari per sviluppare la produzione e l'uso di prodotti derivati dal sangue o dal plasma umano, che provengano da donazioni gratuite e volontarie. Sono tenuti a notificare alla Commissione le misure adottate”.

La Comunità Europea ha adottato la Raccomandazione del Consiglio Direttivo 98/463/EC del 29 giugno 1998 sulla idoneità dei donatori di sangue e di plasma e sullo screening del sangue donato.

È possibile effettuare donazioni di sangue intero oppure donazioni in aferesi. Per "aferesi", parola di derivazione greca che significa sottrazione, si intende un procedimento tecnico che comporta un prelievo di sangue ad un soggetto e la sua successiva separazione nelle singole componenti, destinate poi a seguire destini differenti, a seconda delle necessità.

L'emaferesi può essere distinta in produttiva e terapeutica a seconda del fine ultimo che si propone. La prima ha come scopo quello di ottenere ognuna delle componenti ematiche in quantità utili per usi successivi, generalmente d'ordine terapeutico, la seconda offre invece la possibilità di rimuovere dal sangue componenti patogene per quantità e qualità.

Il problema principale nella selezione di un soggetto che si presenta per una donazione di sangue è quello di stabilire se egli è in buona salute e ciò al fine di tutelarlo contro possibili danni per la sua salute e di proteggere, al tempo stesso, il ricevente dall'eventuale trasmissione di malattie, farmaci o droghe. Soltanto una persona in buona salute e con una idonea storia clinica può essere accettato come donatore di sangue.

Una visita approfondita e un esame obiettivo completo del donatore sono, in genere, non facilmente realizzabili nella pratica. Si deve far affidamento sulle risposte fornite dal donatore a semplici domande relative alla sua storia clinica, insieme a un semplice esame ispettivo e a esami di laboratorio routinari.

Viene fatto compilare a ciascun donatore un questionario prestampato al fine di ottenere pertinenti informazioni sulla storia clinica e sullo stato di salute del donatore.

Devono essere rispettate particolari specifiche riguardo la quantità di sangue donato, età e peso del donatore, intervallo fra le donazioni ed esami di laboratorio. Molto importante è l'anamnesi clinica del donatore.

Una donazione standard è di $450 \text{ ml} \pm 10\%$ escluso l'anticoagulante; il

donatore deve avere un'età minima di 18 anni e una massima di 65, non può essere prelevato più del 13% della volemia in una donazione di sangue intero e comunque non può essere prelevato sangue a una persona che pesi meno di 50 *kg*.

Non devono essere superate ordinariamente 4 donazioni annuali per gli uomini e 3 per le donne, per fornire ai donatori una maggior protezione e conferire al sistema una flessibilità tale di poter affrontare, su larga scala, situazioni di emergenza.

Bisogna prendere nota particolare di: pletora, gracilità, iponutrizione, anemia, ittero, cianosi, dispnea, instabilità psichica, intossicazioni da alcool o droghe. La pelle nella sede della venipuntura deve essere esente da lesioni. Si raccomanda di controllare sistematicamente polso e pressione sanguigna. Il polso deve essere ritmico, regolare ed essere compreso fra 50 e 110 battiti al minuto. Di norma, la pressione sistolica non dovrebbe superare i 180 *mm* di mercurio e quella diastolica non dovrebbe essere superiore a 100.

L'emoglobina deve essere misurata a ogni donazione, a meno che non venga sostituita dalla determinazione dell'ematocrito o *Hct*.

Valori minimi dell'emoglobina pre-donazione per femmine sono: 125 *g/l*; 7,4 *mmole/l* (minimo: *Hct* = 0,38); per maschi: 135 *g/l*; 8,4 *mmole/l* (minimo: *Hct* = 0,40). Sotto questi livelli, una donazione può essere accettata esclusivamente a discrezione del medico responsabile.

L'anamnesi del donatore deve essere valutata da una persona qualificata in materia. Egli deve agire sotto la supervisione di un medico. Ogni condizione anomala deve essere riferita al medico responsabile, al quale spetta la decisione finale di prelevare sangue al donatore. Se il medico resta in dubbio, il donatore deve essere sospeso.

Basandosi sulle informazioni ottenute dal questionario, si dovrebbero seguire le linee guida riguardanti le seguenti malattie:

sindrome di immunodeficienza acquisita (AIDS), allergie, malattie autoimmuni, β -talassemia, bronchiti, malattia di Creutzfeldt-Jacob, diabete, epilessia, febbre al di sopra di 38°C , ipertensione, immunizzazioni profilattiche, intossicazioni, alcool, droghe, ittero ed epatiti, malattie cardio-circolatorie, malattie infettive, malattie renali, malattie tropicali, malaria, malattia di Chagas, assunzione di medicine, neoplasie e malattie maligne, osteomielite, policitemia rubra vera, gravidanza, febbre reumatica, chirurgia, trasfusione, trattamento con cateteri.

Per quanto riguarda la donazione in aferesi bisogna innanzitutto rispondere ai requisiti richiesti per la donazione di sangue intero. Devono in aggiunta essere osservati criteri che riguardano la storia clinica del paziente, ponendo particolare attenzione ad episodi di sanguinamento anormale, assunzione di medicinali contenenti acido acetilsalicilico nei cinque giorni antecedenti una piastrinoafèresi, anamnesi positiva per disturbi gastrici, episodi di reazioni negative o complicazioni a precedenti salassi, anamnesi suggestiva di ritenzione idrica, l'esame clinico pre-aferesi, ovvero plasmaferesi, plasmaferesi ripetute e citafèresi.

Per la raccolta in aferesi di 2 unità di globuli rossi, l'Hb deve avere un valore minimo del 140 g/l o $8,7\text{ mmol/l}$.

L'ematocrito deve essere uguale a 0,42 e il peso corporeo non deve essere inferiore a 70 kg .

I donatori non possono essere sottoposti a plasmaferesi più di una volta ogni 2 settimane. Questa frequenza può essere aumentata, in eccezionali circostanze e a discrezione del medico responsabile, ma devono sempre essere rispettate le linee guida. Non possono essere prelevati più di 15 litri di plasma per anno ad un singolo donatore.

A ogni procedura di plasmaferesi, non possono essere prelevati più di 650 ml da un singolo donatore, e si deve prevedere, se occorre, un opportuno

reintegro quando la quantità di plasma sottratto in una procedura superi i 600-650 *ml*.

La perdita di emazie deve essere mantenuta, preferibilmente, al di sotto di 20 *ml* di sedimento eritrocitario per settimana.

L'intervallo fra una donazione in aferesi e una donazione di sangue intero deve essere di almeno 48 ore. L'intervallo fra una donazione di sangue intero o la mancata restituzione di eritrociti durante l'aferesi e la successiva procedura aferetica deve essere di almeno un mese.

L'intervallo fra una donazione di sangue intero e la donazione in aferesi di due unità di globuli rossi deve essere almeno di 3 mesi; l'intervallo fra la raccolta aferesi di 2 unità di globuli rossi e una donazione di sangue intero o fra due raccolte in aferesi di 2 unità di globuli rossi deve essere almeno di 4 mesi. La perdita eritrocitaria annuale non deve essere superiore a quella accettata per la donazione di sangue intero.

2.3 Preparazione degli emocomponenti

Dopo aver effettuato un prelievo del sangue (intero o tramite plasmaferesi) in conformità ai requisiti del Servizio Trasfusionale, si passa alla raccolta degli emocomponenti.

Alcuni emocomponenti possono essere preparati direttamente dopo il prelievo attraverso la procedura in aferesi: con questa tecnica si ottengono plasma, piastrine e leucociti. In alternativa, dopo la raccolta di sangue nelle modalità tradizionali, gli emocomponenti saranno preparati con le tecniche di lavorazione post-prelievo, (filtrazione, centrifugazione e separazione).

Tutte queste tecniche hanno tempi e modalità di preparazione differenti.

Importantissimi sono da rispettare le condizioni di conservazione e il tempo che intercorre tra il prelievo e l'inizio dei procedimenti di preparazione, poiché



Figura 2.1: Sacca da plasmaferesi dopo prelievo

ritardi nella preparazione o conservazioni inadeguate possono influenzare negativamente la qualità del prodotto finale.

Una tecnica che serve per isolare le proteine plasmatiche, le più importanti delle quali sono il Fattore VIII, la fibronectina e il fibrinogeno, consiste nella crioprecipitazione. Ciò si ottiene congelando le unità di plasma, scongelandole e successivamente centrifugandole a bassa temperatura.

2.3.1 Congelamento del plasma

Il congelamento è un punto critico per la conservazione del Fattore VIII. Durante il congelamento, si forma ghiaccio e i soluti presenti nel plasma sono concentrati nell'acqua restante. Quando la solubilità dei soluti viene superata, ogni soluto forma cristalli e tale formazione viene influenzata dalle caratteristiche dell'anticoagulante usato. Sono in corso ulteriori studi al riguardo.

La formazione di ghiaccio viene direttamente influenzata dalla velocità di sottrazione delle calorie, mentre la velocità di diffusione dei soluti determina

la loro rimozione.

Quando sono contemporaneamente rimossi tutti i soluti, le molecole di Fattore VIII sono esposte, per un lungo periodo di tempo, a una aumentata concentrazione salina e vengono inattivate.

Con una bassa velocità di congelamento, la diffusione dei soluti avviene contemporaneamente con la formazione del ghiaccio e i soluti aumentano la loro concentrazione nel plasma. Al contrario, ad un'elevata velocità di congelamento, la formazione di ghiaccio supera la rimozione dei soluti e piccoli agglomerati di soluti solidificati sono omogeneamente intrappolati nel ghiaccio senza possibilità di contatto prolungato fra sali altamente concentrati e Fattore VIII.

Per ottenere il maggior recupero di Fattore VIII, il plasma deve essere rapidamente congelato a -30°C o a temperature ancora più basse.

Un decremento di ricavo di Fattore VIII si ha quando la solidificazione del plasma avviene in un tempo superiore a un'ora. Ciò può essere monitorato, misurando il contenuto totale in proteine della parte centrale del plasma congelato: la concentrazione proteica dovrebbe essere identica al contenuto totale in proteine del plasma, prima del congelamento.

E' possibile ottenere un'ottima velocità di congelamento quando si realizza una sottrazione calorica di 38 kcal/ora per unità di plasma. Il processo può essere misurato mediante l'uso di termocoppie.

2.3.2 Metodi di congelamento

La velocità di congelamento, quando si congela plasma citratato, ovvero plasma con aggiunta di anticoagulante (citrato di sodio), deve essere la più rapida possibile e, idealmente, la parte centrale dell'unità di plasma dovrebbe raggiungere la temperatura di -30°C (o inferiore) al massimo entro

60 minuti dal congelamento.

Se non è possibile ottenere ciò, il minimo accettabile di velocità è quello che fa raggiungere tale temperatura entro 4 ore.

L'esperienza ha dimostrato che, talvolta, sono necessarie più ore per arrivare alla temperatura predetta, anche in un ambiente di $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In realtà, sarebbe ideale ridurre il tempo di congelamento a meno di 1 ora e, se possibile, anche a meno di mezz'ora, per esempio grazie ai seguenti accorgimenti:

- il plasma deve presentare una configurazione regolare per permettere la massima esposizione alla fonte di freddo (con le sacche distese o in contenitori, se poste verticalmente);
- immersione in ambiente liquido a bassissima temperatura;
- se si utilizza un ambiente liquido, è necessario assicurarsi che il liquido di congelamento non possa penetrare nella sacca.

2.3.3 Metodi di scongelamento

Le unità di plasma congelate devono essere maneggiate con cura perché le sacche possono essere fragili.

Deve essere verificata l'integrità delle sacche prima e dopo lo scongelamento per escluderne eventuali difetti o perdite. I contenitori difettosi devono essere scartati.

Il prodotto deve essere scongelato immediatamente dopo essere stato rimosso dal congelatore in un ambiente opportunamente controllato a $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ secondo una procedura validata.

Dopo lo scongelamento del plasma congelato, si deve ispezionare il contenuto per assicurarsi che non sia visibile del crioprecipitato insolubile. Una volta completata la procedura di scongelamento, il prodotto che presenta materiale

insolubile non deve essere impiegato. Per preservare i fattori labili della coagulazione, il plasma deve essere utilizzato immediatamente dopo lo scongelamento e comunque non oltre le 6 ore. Non dovrebbe essere ricongelato. Lo scongelamento del plasma è una parte inevitabile degli attuali processi di inattivazione virale, dopo che i prodotti sono stati ricongelati.

Al fine di mantenere attivi i componenti labili, il componente finale deve essere usato immediatamente dopo il successivo scongelamento, solo per usi clinici e non può essere ulteriormente congelato.

Devono essere evitati congelatori con sbrinamento automatico a meno che non possa essere garantito che la bassa temperatura venga mantenuta durante lo sbrinamento. I congelatori dovrebbero essere connessi ad una sorgente di alimentazione di riserva come ad esempio l'alimentazione principale.

Capitolo 3

Studio di validazione presso l'ULSS 17

3.1 Azienda ULSS 17

L'azienda ULSS 17 della regione Veneto ispira la sua attività al soddisfacimento dei bisogni di salute della persona, riconosciuti come espressione di un diritto fondamentale del cittadino ad ottenere appropriate prestazioni sanitarie e socio-sanitarie di prevenzione, diagnosi, cura e riabilitazione nel rispetto di principi di uguaglianza, equità di accesso e umanizzazione.

Nelle sue azioni programmatiche l'Azienda pone il cittadino-utente come centro di interesse a cui indirizzare l'attività, finalizzando ogni intervento al perseguimento del benessere della persona e privilegiando le scelte che conseguono questo risultato.

Nel perseguimento di tali finalità l'Azienda si adegua alle disposizioni normative di carattere nazionale e regionale emanate in materia, ma anche alle specifiche disposizioni di attuazione, di organizzazione e di programmazione divulgate dalla Regione Veneto, attuando, nel rispetto dei principi prima descritti, una politica sanitaria aziendale che tenga conto delle effettive

esigenze di salute della popolazione servita e superando eventuali aree di criticità che comprimono il diritto alla salute del cittadino.

Il Distretto è l'articolazione organizzativo-funzionale dell'Azienda, finalizzata a realizzare un elevato livello di integrazione tra i diversi servizi che erogano le prestazioni sanitarie e tra questi e i servizi socio-assistenziali, in modo da consentire una risposta coordinata e continuativa ai bisogni socio-sanitari della popolazione.

L'Azienda ULSS 17 è aggregata in 2 distretti: il Distretto di Este-Montagnana e il Distretto di Monselice-Conselve. In particolare attraverso il Distretto l'Azienda provvede:

- all'analisi e valutazione dei bisogni della popolazione;
- alla gestione diretta di servizi e interventi che rientrano nei "livelli di assistenza distrettuali";
- al governo dei consumi di prestazioni "indirette" (farmaceutiche, specialistiche ambulatoriali e ospedaliere) instaurando in modo continuativo e strutturale appropriate relazioni con i medici di Medicina Generale e i pediatri di libera scelta;
- alla realizzazione dell'integrazione socio-sanitaria a livello istituzionale, gestionale e operativo.

Nel livello di assistenza distrettuale rientrano anche le attività sociali a rilevanza sanitaria e le attività sociali quando sono delegate dai comuni.

Inoltre possono essere affidate al distretto alcune attività del Dipartimento di Prevenzione.

3.2 Il Servizio di Ingegneria Clinica

I Servizi di Ingegneria Clinica garantiscono, all'interno di una struttura sanitaria e ospedaliera l'utilizzo sicuro, corretto ed economico delle strumentazioni biomediche. Grazie a questo servizio, avvalendosi delle figure professionali di ingegneri e tecnici qualificati è possibile:

- realizzare l'inventario tecnico ed economico delle strumentazioni della struttura. L'attività si articola nella identificazione delle apparecchiature con la relativa codifica (definizione di classe, produttore e modello), la targhettazione, la stima di valore e la produzione degli opportuni documenti;
- installare e mantenere programmi di gestione informatizzata dei servizi erogati fornendo report statistici sull'attività e sull'efficienza del parco macchine;
- contribuire attraverso questi dati a definire i piani di rinnovo del parco tecnologico;
- organizzare e gestire le opportune attività di formazione in ordine alle apparecchiature biomediche e ai connessi adempimenti legislativi nei confronti dei medici, del personale paramedico e dei tecnici.

Attraverso la collaborazione di aziende interne o esterne alla struttura ospedaliera, il Servizio di Ingegneria Clinica (SIC) si occupa di effettuare i collaudi di accettazione; svolge periodicamente le verifiche di sicurezza seguendo i protocolli redatti secondo le indicazioni della Guida CEI 62-122. Il SIC effettua sistematicamente i controlli di qualità (o controlli funzionali) consentendo di individuare, mediante l'utilizzo di specifici strumenti di misura appositamente tarati, il degrado delle prestazioni delle apparecchiature elettromedicali.

Il SIC in questo modo coordina le attività tecniche svolte dalle ditte produttrici in caso di intervento del servizio di assistenza esterno. La maggior parte degli interventi di manutenzione è eseguita da tecnici che sono chiamati in supporto specialistico nelle diverse aree operative, garantendo la massima tempestività di intervento. Se sono disponibili invece, tecnici specializzati presso la struttura ospedaliera si riducono sia i costi di manutenzione delle apparecchiature biomediche sia la riduzione delle chiamate verso le ditte produttrici.

La manutenzione, come definita dalla norma CEI 62-122 - UNI 9910, è la combinazione di tutte le azioni tecniche ed amministrative, incluse quelle di supervisione, volte a mantenere o riportare un dispositivo medico in uno stato in cui possa eseguire la funzione richiesta.

Si possono distinguere varie modalità di manutenzione:

- manutenzione preventiva: eseguita a intervalli regolari e volta a ridurre la probabilità di guasto o la degradazione del funzionamento di un dispositivo medico;
- manutenzione correttiva: eseguita a seguito della rivelazione di una avaria e volta a riportare un'entità nello stato in cui essa possa eseguire la funzione richiesta;
- manutenzione straordinaria: interventi, la cui convenienza economica è da valutare per ogni caso specifico, che sono eseguiti una tantum per riportare un'apparecchiatura all'ultima versione disponibile in commercio (aggiornamento hardware e/o software).

Il Servizio di Ingegneria Clinica riesce ad ottenere informazioni di vario tipo riguardanti l'attività dell'azienda attraverso un sistema informativo dedicato alla gestione del parco tecnologico. Grazie ad esso è possibile elaborare le informazioni trovate e tramutarle in dati significativi utilizzabili per il

raggiungimento degli obiettivi prefissati dall'ospedale.

3.3 Descrizione dello studio di validazione

Lo studio di validazione del congelamento del plasma è stato condotto nell'arco di 3 settimane. Il Servizio di Ingegneria Clinica dell'ULSS 17 in collaborazione con l'UOC Centro Trasfusionale dell'ULSS 17 ha eseguito la validazione del processo di congelamento.

Lo studio è stato effettuato presso l'ospedale di Este; in questa struttura, tutto il plasma viene avviato a frazionamento industriale.

Esso si propone i seguenti obiettivi:

- verificare che l'unità di plasma raggiunge la temperatura di -30°C in meno di un'ora nel core della sacca, come definito dai requisiti di trasfusione del plasma, nella Guida del Consiglio Europeo;
- verificare che l'unità di plasma raggiunge la temperatura di -25°C in meno di 12 ore, (dai requisiti di frazionamento del plasma, Monografia della Farmacopea Europea).

Verificando il primo dei due obiettivi, sarà di conseguenza verificato anche l'altro. I materiali utilizzati per effettuare tale studio sono quelli presenti nel Centro Trasfusionale dell'ULSS 17, situato nel distretto di Este.

Il congelatore (fig. 3.1) della ditta Angelantoni è il modello SF44 ed ha le seguenti caratteristiche:

temperatura minima raggiunta in $^{\circ}\text{C}$: -75

400/3 +N +G V, 50 Hz;

Volume: 250 l;

Gas refrigerante contenuto: R404a/R23

Numero di serie: 36713;

Provvisto di 4 ripiani metallici.

È stato opportunamente tarato prima di effettuare le misure e la taratura ha validità di un anno.

Le misure sono state effettuate con un multimetro digitale, anch'esso tarato e con validità di taratura di un anno a partire dalle data di taratura.

Specifiche dell'unità di misura:

Fluke 187 True RMS Multimeter

Numero di serie: 82700093 + 0.0207.

Altro strumento fondamentale per effettuare le misurazioni è stato l'utilizzo di una "sacca test"; ovvero una sacca utilizzata per il monitoraggio del processo di congelamento, della stessa tipologia di quelle regolarmente usate per congelare il plasma, riempita di fisiologica, con un volume di 300 *ml* per simulare plasma da separazione, e di 600 *ml* per plasma da aferesi.

All'interno della sacca con soluzione fisiologica è stata inserita una sonda a cavo semirigido, provvista di sensore di rilevamento sospeso nel core della sacca. (fig. 3.2)

La soluzione fisiologica è una soluzione acquosa di sali inorganici la cui concentrazione è isotonica rispetto al plasma sanguigno. La soluzione fisiologica più semplice è quella di cloruro di sodio allo 0,9% (900*mg*/100*ml* di acqua distillata).

È stata scelta la soluzione fisiologica poiché essa è capace di simulare il plasma umano molto fedelmente; la sua densità (1,0 *g/ml*) differisce di pochissimo da quella del plasma di 1,026 *g/ml*.



Figura 3.1: Congelatore



Figura 3.2: Multimetro con sonda inserita nella "sacca test"

3.3.1 Raccolta dei dati

Per garantire il raggiungimento della temperatura minima consentita (ovvero -75°C) è necessario accendere il congelatore almeno 60 minuti prima dell'utilizzo con il tasto ON.

Al momento delle misurazioni il congelatore si trovava in un ambiente a temperatura di 24°C con un'incertezza di $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

La temperatura iniziale della sacca provvista di sonda, monitorata da circa una mezz'ora prima delle misurazioni, è risultata in media di $24,4^{\circ}\text{C}$.

La sacca test usata in giornata è stata tenuta sempre nello stesso ambiente prima dello studio (il laboratorio di separazione).

Le unità di plasma da separazione e da aferesi, preparate secondo le procedure dettate dalle linee guida del Consiglio d'Europa, presso laboratorio del Centro Trasfusionale, sono state posizionate sui piani del congelatore in un unico carico e nel minor tempo possibile dopo l'apertura dello sportello, per evitare di avere sbalzi di temperatura.

Le letture dei valori di misurazione della temperatura all'interno della sacca test rilevate dal multimetro sono state effettuate ad intervalli di 1 minuto per la durata di 60 minuti e memorizzati in tabelle.

Sono state condotte due tipologie di misurazione, una con sonda in sacca test da 300 ml e una con sonda in sacca test da 600 ml .

Le prove di congelamento sono state condotte posizionando la sacca test su tutti e quattro i ripiani del congelatore e in diverse posizioni, sia lateralmente che nel centro.

Dopo test preliminari (prove con un carico di 15 e 20 unità) ed in base alla quantità di plasma separata giornalmente, lo studio sul congelamento è stato effettuato con 24 unità di plasma così disposte:

- *primo ripiano*: 5 unità di plasma + 1 plasmaferesi

- *secondo ripiano*: 5 unità di plasma + 1 plasmaferesi
- *terzo ripiano*: 5 unità di plasma + 1 plasmaferesi
- *quarto ripiano*: 5 unità di plasma + 1 plasmaferesi

La sacca test, venticinquesima sacca, è stata posizionata su un ripiano diverso ad ogni misurazione.

Le misure rilevate dalla sonda in sacca test da da 300 *ml* sono risultate molto più simili tra loro indipendentemente dalla posizione sul ripiano; quelle misurate invece per la sacca da 600 *ml*, variano a seconda che la sacca sia posizionata più o meno vicino all'apertura del congelatore. Le sacche di plasma lontane dall'apertura congelano in un tempo minore rispetto alle altre.



Figura 3.3: Congelatore durante il caricamento delle sacche

Sono state inoltre effettuate anche delle misurazioni in casi che possono essere definiti "critici". Una con sacca test da 600 *ml* a temperatura di partenza superiore alla media (32°C); la sacca test è stata posta in acqua calda prima del posizionamento nel congelatore.

L'altra misura è stata eseguita con sacca test da 600 *ml* sovrapposta ad

altre 2 unità di plasma, quindi non a contatto con il piano metallico del congelatore.

In entrambi i casi si è comunque raggiunto l'obiettivo di misura prestabilito. La sacca test ha raggiunto la temperatura stabilita al più entro i 60 minuti. Si riportano nell'appendice le medie dei valori misurati per tutti e 4 i ripiani del congelatore con la sacca test da 600 ml posizionata sia nei lati che nel centro.



Figura 3.4: Lettura della temperatura sul multimetro dopo il raggiungimento di -30°C

3.4 Analisi dei risultati ottenuti

Dalle prove effettuate si è stabilito che il tempo necessario massimo affinché tutte le unità di plasma siano completamente congelate è di 27 minuti per il plasma da separazione, e di 42 minuti per il plasma da aferesi. Le condizioni di congelamento sono risultate in conformità con i requisiti della Guida del Consiglio Europeo per la trasfusione del plasma, e anche con

i requisiti della Monografia della Farmacopea Europea per il frazionamento del plasma.

In conclusione, lo studio di validazione risulta accettato e resta valido per tre anni, salvo modifiche significative delle condizioni operative (ad esempio una modifica significativa potrebbe essere la sostituzione del congelatore). In quel caso è opportuno effettuare un nuovo studio; ripetere la taratura per gli eventuali nuovi strumenti da utilizzare e validare nuovamente la procedura di congelamento del plasma.

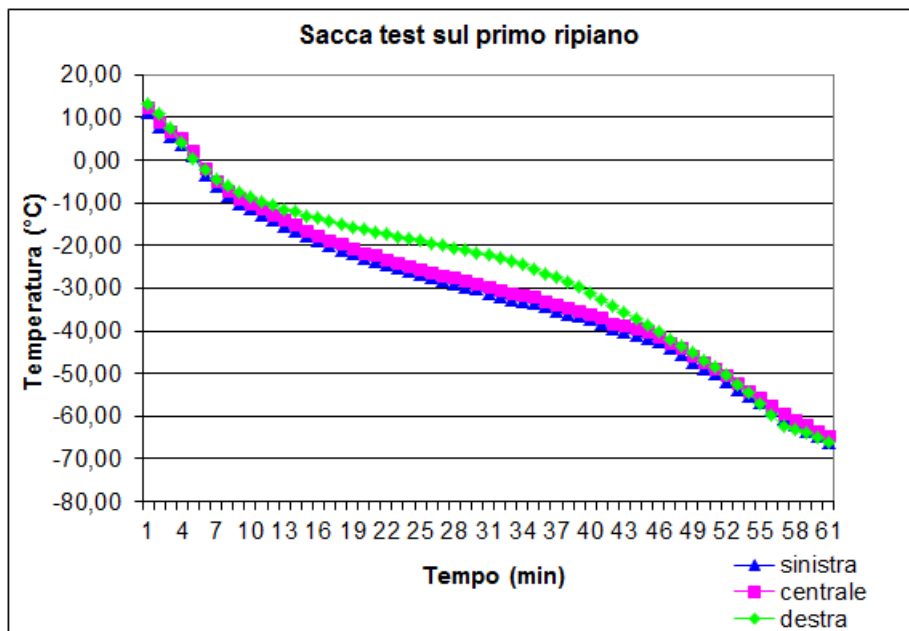


Figura 3.5: Andamento della temperatura in funzione del tempo: le tre curve mostrano la differente posizione della sacca test da 600 ml sul primo ripiano

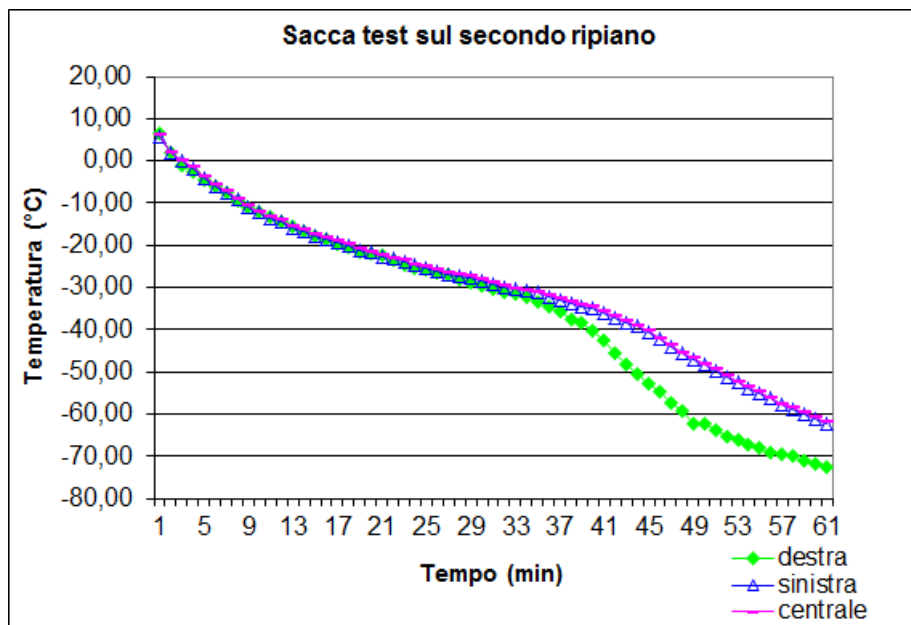


Figura 3.6: Andamento della temperatura in funzione del tempo: le tre curve mostrano la differente posizione della sacca test da 600 ml sul secondo ripiano

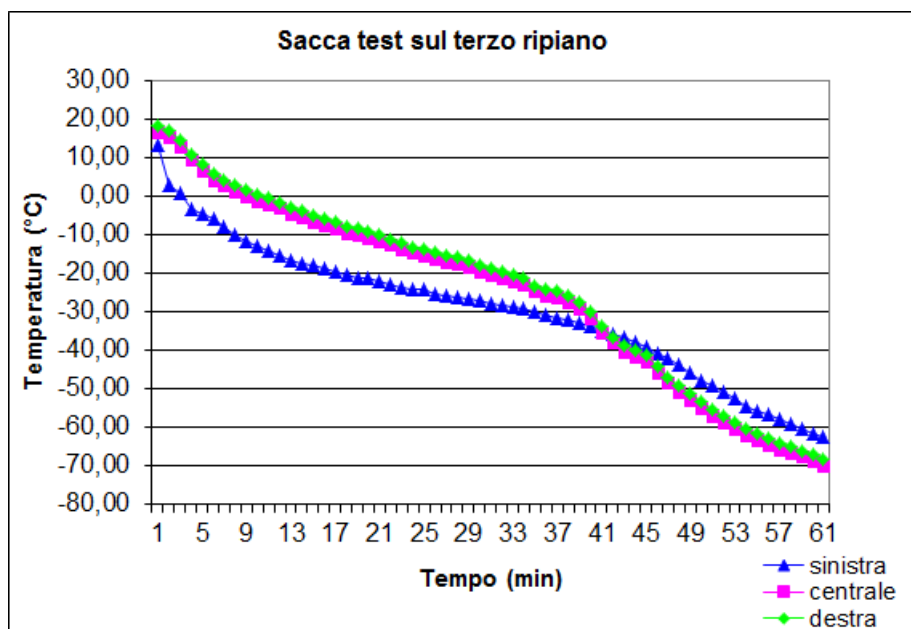


Figura 3.7: Andamento della temperatura in funzione del tempo: le tre curve mostrano la differente posizione della sacca test da 600 ml sul terzo ripiano

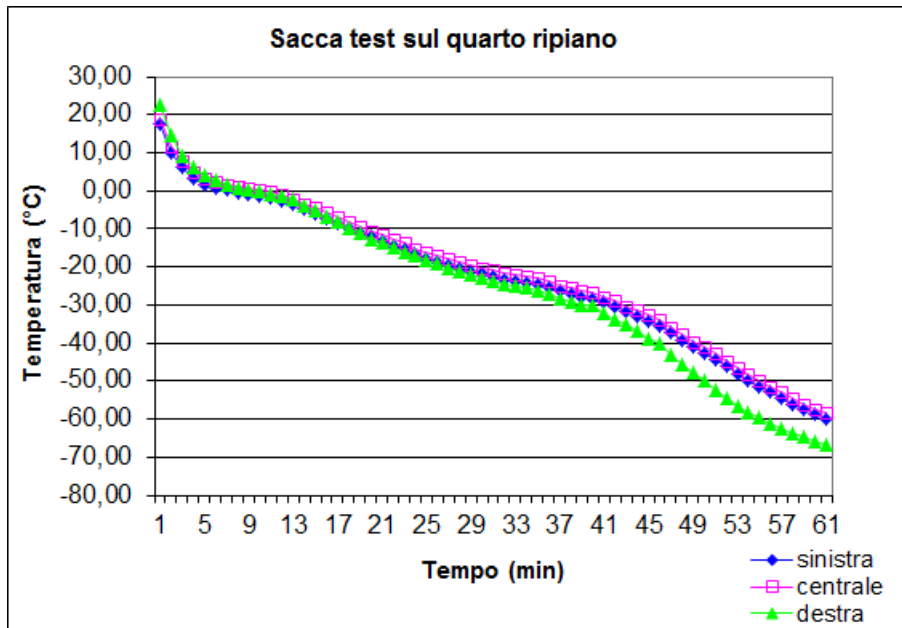


Figura 3.8: Andamento della temperatura in funzione del tempo: le tre curve mostrano la differente posizione della sacca test da 600 ml sul quarto ripiano

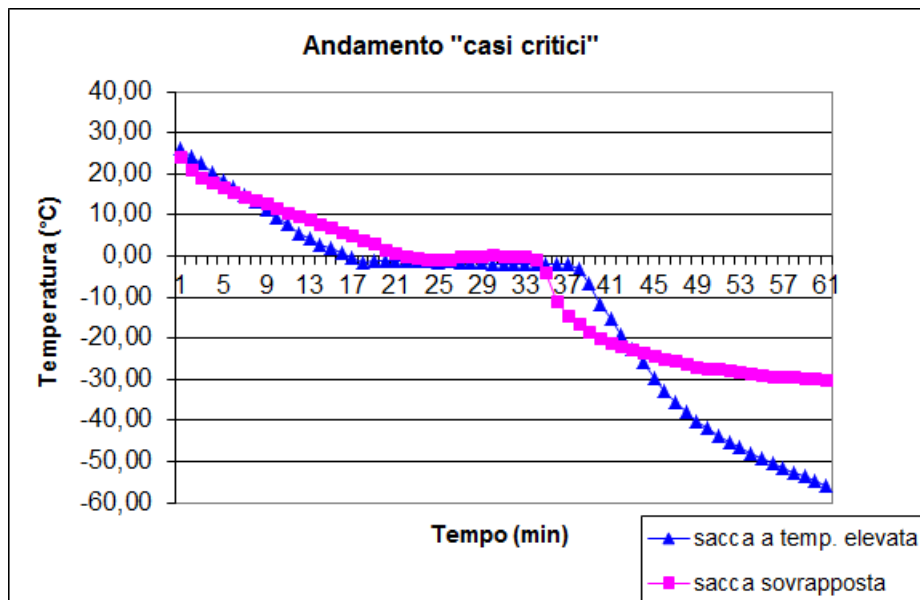


Figura 3.9: Andamento della temperatura per 2 casi "critici": con sacca da 600 ml a temperatura di partenza elevata e poi sovrapposta ad altre due unità

Conclusioni

Lo studio presentato in questo breve lavoro, è necessario affinché il plasma prodotto in una struttura ospedaliera, in questo caso l'ULSS 17, sia avviato a frazionamento industriale.

E' stato indispensabile verificare le condizioni operative del Centro Trasfusionale, utilizzando tutti gli strumenti tarati ed effettuando varie misurazioni, in modo da essere sicuri che fossero rispettati gli obiettivi prestabiliti all'inizio dello studio, e cioè:

- verificare che l'unità di plasma raggiunge la temperatura di -30°C in meno di un'ora nel core della sacca, come definito dai requisiti di trasfusione del plasma, nella Guida del Consiglio Europeo;
- verificare che l'unità di plasma raggiunge la temperatura di -25°C in meno di 12 ore, (dai requisiti di frazionamento del plasma, Monografia della Farmacopea Europea).

I dati ottenuti dalle ripetute misurazioni sono risultati perfettamente in conformità con i risultati attesi.

Come già detto, nella terapia trasfusionale, l'utilizzo dei soli emocomponenti a volte è molto più utile (e spesso meno pericoloso) di una trasfusione di sangue intero, dove potrebbero essere trasfusi al paziente componenti inutili. Lo studio di validazione del congelamento del plasma è quindi indispensabile, in quanto, il plasma separato all'interno di un Centro Trasfusionale sia congelato secondo le specifiche normative per presentare la miglior qualità dei

costituenti (importantissima è la conservazione del fattore VIII), e può così essere avviato, nelle strutture che lo richiedono, a frazionamento industriale.

Appendice A

Dati rilevati

A.1 Rilevamento della temperatura per la sacca da 600 ml riempita di soluzione fisiologica posta sul primo e secondo ripiano

<i>minuti</i>	<i>posizione su ripiano 1 (°C)</i>			<i>posizione su ripiano 2 (°C)</i>		
	<i>sinistra</i>	<i>centrale</i>	<i>destra</i>	<i>sinistra</i>	<i>centrale</i>	<i>destra</i>
0	11,20	12,50	13,30	5,90	6,20	6,40
1	7,70	9,00	10,90	1,80	2,10	1,80
2	5,60	6,90	7,40	-0,10	0,20	-1,10
3	3,90	5,20	4,30	-1,90	-1,60	-2,70
4	1,10	2,40	0,20	-4,20	-3,90	-4,40
5	-3,20	-1,90	-2,40	-6,00	-5,70	-6,00
6	-6,10	-4,80	-4,40	-7,60	-7,30	-7,70
7	-8,30	-7,00	-6,10	-9,20	-8,90	-9,30
8	-10,20	-8,90	-7,50	-10,90	-10,60	-10,80
9	-11,40	-10,10	-8,50	-12,30	-12,00	-12,10
10	-12,70	-11,40	-9,70	-13,60	-13,30	-13,40
11	-13,90	-12,60	-10,50	-14,50	-14,20	-14,60
12	-15,30	-14,00	-11,60	-15,80	-15,50	-15,60
13	-16,50	-15,20	-12,20	-16,70	-16,40	-16,70
14	-17,80	-16,50	-13,00	-17,70	-17,40	-17,70
15	-18,90	-17,60	-13,70	-18,60	-18,30	-18,70
16	-19,90	-18,60	-14,40	-19,40	-19,10	-19,60
17	-21,00	-19,70	-15,00	-20,20	-19,90	-20,50
18	-21,90	-20,60	-15,60	-21,10	-20,80	-21,50
19	-22,90	-21,60	-16,30	-21,80	-21,50	-22,00
20	-23,60	-22,30	-16,90	-22,60	-22,30	-22,50
21	-24,50	-23,20	-17,40	-23,30	-23,00	-23,40
22	-25,20	-23,90	-17,90	-24,00	-23,70	-24,60

23	-26,00	-24,70	-18,40	-24,80	-24,50	-25,30
24	-26,70	-25,40	-18,90	-25,50	-25,20	-26,00
25	-27,40	-26,10	-19,50	-26,20	-25,90	-26,70
26	-28,20	-26,90	-20,00	-26,80	-26,50	-27,10
27	-28,90	-27,60	-20,60	-27,30	-27,00	-28,00
28	-29,50	-28,20	-21,10	-27,70	-27,40	-29,00
29	-30,10	-28,80	-21,70	-28,30	-28,00	-29,70
30	-31,00	-29,70	-22,30	-29,20	-28,90	-30,40
31	-31,90	-30,60	-22,90	-29,90	-29,60	-31,00
32	-32,50	-31,20	-23,50	-30,50	-30,20	-31,40
33	-32,90	-31,60	-24,40	-30,90	-30,60	-32,20
34	-33,40	-32,10	-25,50	-31,30	-31,00	-33,40
35	-34,30	-33,00	-26,60	-32,20	-31,90	-34,50
36	-35,20	-33,90	-27,60	-32,90	-32,60	-35,70
37	-36,00	-34,70	-28,60	-33,70	-33,40	-37,50
38	-36,60	-35,30	-29,80	-34,40	-34,10	-38,30
39	-37,20	-35,90	-31,20	-35,00	-34,70	-40,10
40	-38,20	-36,90	-32,80	-36,10	-35,80	-42,60
41	-39,50	-38,20	-34,30	-37,30	-37,00	-45,40
42	-40,10	-38,80	-35,70	-38,20	-37,90	-48,10
43	-40,80	-39,50	-37,30	-39,30	-39,00	-50,50
44	-41,50	-40,20	-38,50	-40,60	-40,30	-52,80
45	-42,50	-41,20	-40,20	-42,30	-42,00	-54,90
46	-44,10	-42,80	-42,00	-44,10	-43,80	-57,20
47	-45,40	-44,10	-43,60	-45,70	-45,40	-59,30
48	-47,20	-45,90	-45,20	-47,10	-46,80	-62,20
49	-48,70	-47,40	-46,90	-48,40	-48,10	-62,50
50	-50,00	-48,70	-48,60	-49,80	-49,50	-63,70
51	-51,80	-50,50	-50,50	-51,30	-51,00	-65,30
52	-53,60	-52,30	-52,70	-52,60	-52,30	-66,20
53	-55,20	-53,90	-54,60	-53,90	-53,60	-67,40
54	-56,70	-55,40	-57,10	-55,00	-54,70	-68,20
55	-58,60	-57,30	-59,70	-56,40	-56,10	-69,00
56	-60,50	-59,20	-62,40	-57,90	-57,60	-69,70
57	-62,00	-60,70	-63,10	-58,90	-58,60	-70,00
58	-63,40	-62,10	-63,90	-60,00	-59,70	-71,20
59	-64,60	-63,30	-64,80	-61,00	-60,70	-71,80
60	-65,90	-64,60	-66,20	-62,20	-61,90	-72,40

A.2 Rilevamento della temperatura per la sacca da 600 ml riempita di soluzione fisiologica posta sul terzo e quarto ripiano

<i>minuti</i>	<i>posizione su ripiano 3 (°C)</i>			<i>posizione su ripiano 4 (°C)</i>		
	<i>sinistra</i>	<i>centrale</i>	<i>destra</i>	<i>sinistra</i>	<i>centrale</i>	<i>destra</i>
0	13,40	16,90	18,50	17,40	19,00	22,50
1	3,20	15,70	17,30	9,90	11,50	14,80
2	0,80	13,00	14,60	6,10	7,70	9,30
3	-3,10	9,50	11,10	3,40	5,00	6,30
4	-4,50	6,80	8,40	1,70	3,30	4,20
5	-5,70	4,30	5,90	0,80	2,40	2,70
6	-7,70	2,80	4,40	0,10	1,70	1,70
7	-9,80	1,30	2,90	-0,40	1,20	0,90
8	-11,70	0,00	1,60	-0,80	0,80	0,20
9	-13,00	-1,10	0,50	-1,20	0,40	-0,20
10	-14,10	-2,00	-0,40	-1,80	-0,20	-0,80
11	-15,40	-3,00	-1,40	-2,70	-1,10	-1,20
12	-16,50	-4,40	-2,80	-3,70	-2,10	-2,30
13	-17,30	-5,40	-3,80	-4,90	-3,30	-3,80
14	-18,00	-6,40	-4,80	-6,10	-4,50	-5,30
15	-18,50	-7,30	-5,70	-7,30	-5,70	-6,90
16	-19,60	-8,20	-6,60	-8,60	-7,00	-8,30
17	-20,40	-9,40	-7,80	-9,80	-8,20	-9,80
18	-21,00	-10,00	-8,40	-10,90	-9,30	-11,10
19	-21,40	-10,90	-9,30	-12,10	-10,50	-12,70
20	-22,10	-11,70	-10,10	-13,20	-11,60	-13,60
21	-23,00	-12,60	-11,00	-14,40	-12,80	-14,80
22	-23,60	-13,60	-12,00	-15,40	-13,80	-16,00
23	-24,00	-14,70	-13,10	-16,70	-15,10	-17,20
24	-24,30	-15,50	-13,90	-17,80	-16,20	-18,20
25	-25,20	-16,10	-14,50	-18,50	-16,90	-19,20
26	-25,90	-16,90	-15,30	-19,40	-17,80	-20,20
27	-26,40	-17,40	-15,80	-20,40	-18,80	-21,10
28	-26,80	-18,30	-16,70	-21,10	-19,50	-22,00
29	-27,10	-19,40	-17,80	-21,80	-20,20	-22,90
30	-27,90	-20,30	-18,70	-22,50	-20,90	-23,70
31	-28,50	-21,10	-19,50	-23,30	-21,70	-24,40
32	-28,90	-22,00	-20,40	-23,80	-22,20	-25,00
33	-29,20	-23,00	-21,40	-24,20	-22,60	-25,50
34	-29,90	-24,70	-23,10	-24,70	-23,10	-26,30
35	-30,80	-25,60	-24,00	-25,40	-23,80	-27,30
36	-31,50	-26,30	-24,70	-26,40	-24,80	-28,20

37	-32,10	-27,60	-26,00	-27,10	-25,50	-29,10
38	-32,90	-29,20	-27,60	-27,80	-26,20	-29,90
39	-33,80	-31,70	-30,10	-28,40	-26,80	-30,10
40	-34,90	-35,50	-33,90	-29,40	-27,80	-32,20
41	-35,70	-38,10	-36,50	-30,30	-28,70	-33,70
42	-36,60	-40,30	-38,70	-31,90	-30,30	-35,20
43	-37,80	-41,60	-40,00	-33,10	-31,50	-36,90
44	-39,20	-42,70	-41,10	-34,10	-32,50	-38,70
45	-40,80	-45,70	-44,10	-35,60	-34,00	-40,30
46	-42,20	-48,50	-46,90	-37,40	-35,80	-43,20
47	-43,80	-50,80	-49,20	-39,40	-37,80	-45,50
48	-45,90	-53,00	-51,40	-41,20	-39,60	-47,80
49	-47,70	-55,00	-53,40	-42,80	-41,20	-50,00
50	-49,30	-57,00	-55,40	-44,40	-42,80	-52,40
51	-50,90	-58,80	-57,20	-46,20	-44,60	-54,60
52	-52,30	-60,40	-58,80	-48,10	-46,50	-56,60
53	-54,40	-61,90	-60,30	-49,90	-48,30	-58,20
54	-55,80	-63,20	-61,60	-51,40	-49,80	-59,60
55	-56,80	-64,50	-62,90	-53,00	-51,40	-61,20
56	-57,90	-65,70	-64,10	-54,40	-52,80	-62,60
57	-59,10	-66,70	-65,10	-56,10	-54,50	-63,70
58	-60,40	-67,70	-66,10	-57,60	-56,00	-64,70
59	-61,60	-68,80	-67,20	-58,90	-57,30	-65,90
60	-62,70	-70,00	-68,40	-60,00	-58,40	-66,60

Bibliografia

1. Paolo Larizza, *Trattato delle malattie del sangue, introduzione allo studio delle malattie del sangue*, vol. 1, Piccin
2. Renzo Dionigi, *Chirurgia, basi teoriche e chirurgia generale*, quarta edizione, Elsevier
3. *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, 13th edition, Council of Europe 2007
4. *Linee guida per la selezione del donatore di sangue e di Emocomponenti*, Edizioni SIMTI 2006
5. World Health Organization, *The Clinical Use of Blood: handbook*, Edizione SIMTI 2002
6. *Affidamento del Servizio di gestione e manutenzione di apparecchiature elettromedicali ed attrezzature tecnicospettive in unione d'acquisto tra Asl 2 Savonese in qualità di capofila, Asl 3 Genovese ed Asl 5 Spezzino ai sensi del D. Lgs. 12.04.2006 n°163*
7. *Raccomandazioni SIMTI sul corretto utilizzo degli emocomponenti e dei plasmaderivati*, 1^a Edizione
8. Istituto Superiore di Sanità, *Farmacopea europea: guida alla traduzione e glossario di termini utilizzati nelle monografie dei prodotti biologici e relativi metodi*, Maria Cristina Galli, Anna Maria Cappelli , 1999

9. norma CEI 62-122

10. Direttiva 39/381

Riferimenti web

- <http://www.officinabiomedica.it/>
- <http://www.avis.it/>
- <http://www.ema.europa.eu/>
- <http://www.wikipedia.org/>
- <http://www.iss.it/>
- <http://www.ulss17.it/>
- <http://www.cre.regione.lombardia.it/>
- <http://www.asl2.liguria.it/>
- <http://web.genie.it/>
- <http://www.centronazionale sangue.it/>
- <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/>

Ringraziamenti

Il grazie più grande va ai miei genitori e a mia sorella Marinella, che mi hanno permesso di intraprendere questo percorso, senza farmi mai mancare nulla e sostenendomi sempre in tutte le mie scelte.

Ringrazio il mio relatore, il prof. Enrico Grisan per aver accettato di seguirmi in questo lavoro, primo traguardo importante della mia carriera universitaria. Voglio ringraziare l'azienda ULSS 17 per avermi concesso di acquisire familiarità con il mondo del lavoro. Grazie in particolar modo al mio tutor, l'ing. Lorenzo Camiletti, per la fiducia riposta in me e per essersi dimostrato sempre disponibile nei miei confronti. Grazie a tutto il Servizio di Ingegneria Clinica, che mi ha accolta nello staff durante il mio periodo di stage, facendomi sentire a mio agio.

Grazie anche al dottor Cicuto, per avermi guidata durante le misurazioni e per aver contribuito alla stesura di questa tesi rispondendo alle mie domande e a tutti i miei dubbi.

Ringrazio di cuore i miei "zii padovani", zia Rita, zio Gino e i miei cugini Giuseppe e Francesco che mi hanno ospitata per il primo anno di università facendomi sentire a casa anche a molti chilometri di distanza.

Un grazie a tutti gli amici che mi sono stati accanto durante questo percorso; a quelli che conoscevo già e a quelli che ho conosciuto nel corso degli anni. Soprattutto ringrazio Antonella, mia amica, coinquilina e compagna di studi, che mi ha supportata e sopportata sempre in questi anni.

Grazie a Vanessa, che, nonostante la mia scelta universitaria ci tenga lontane, è sempre pronta ad ascoltarmi e condividere con me i miei successi, le gioie e anche i miei problemi.

Infine ringrazio Sergio, Jay e Paride, per aver trascorso con me quest'ultimo e impegnativo anno, grazie per tutti i bei momenti passati insieme, i pranzi in mensa e i pomeriggi al DEI, e per aver alleggerito lo studio con risate e spritz.