

Tecniche di preparazione e conservazione degli emocomponenti

Franco Verlicchi - Centro Trasfusionale Faenza/Lugo - AUSL Ravenna

La Legge 21/10/2005, n° 219 - Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati, definisce come **emocomponenti** 'i prodotti ricavati dal frazionamento del sangue con mezzi fisici semplici o con aferesi', e come **emoderivati** 'le specialità medicinali estratte dall'emocomponente plasma mediante processo di lavorazione industriale': poichè, allo stato, l'unico componente suscettibile di lavorazione industriale è il plasma, la norma, di fatto, considera equivalenti le definizioni di emoderivato e di plasmaderivato.

La produzione di emocomponenti ed emoderivati offre, rispetto al sangue intero, il doppio vantaggio di consentire l'utilizzo di una terapia trasfusionale mirata e di permettere la conservazione di ogni componente del sangue nelle condizioni ad esso più idonee.

EMOCOMPONENTI

La centrifugazione del sangue intero costituisce il cardine per la produzione di emocomponenti; un ruolo può essere giocato, in misura meno rilevante, dalla filtrazione. Il primo step è rappresentato dalla separazione del sangue nei suoi componenti fondamentali, eritrociti, leucociti, piastrine e plasma. Partendo dall'unità di sangue intero il risultato non è immediato, a causa dell'impossibilità di isolare le piastrine: a seconda della velocità di centrifugazione, le piastrine si troveranno associate al plasma (Plasma Ricco di Piastrine - PRP) o, per centrifugazione più energica, utilizzata più di frequente, associate ai leucociti (buffy-coat); in entrambi i casi sarà necessaria una successiva centrifugazione per ottenere la separazione dei due componenti. Nel caso delle procedure di aferesi la separazione è più semplice: a seconda dell'impostazione lo strumento provvederà autonomamente, in corso di prelievo, alle operazioni necessarie a fornire il prodotto o i prodotti (aferesi multi-component) desiderati. Il prelievo in aferesi offre anche altri vantaggi: consente la raccolta di una quantità maggiore dell'emocomponente desiderato, può fornire direttamente emocomponenti più elaborati (es. emazie leucodeplete), consente di ottenere emocomponenti non ricavabili dal prelievo di sangue intero (es. concentrati granulocitari). Gli emocomponenti possono essere distinti a seconda della loro origine. La Legge 219 stabilisce le caratteristiche e le modalità di conservazione di ognuno di essi.

ERITROCITI	LEUCOCITI	PIASTRINE	PLASMA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Emazie concentrate ▪ Emazie concentrate private del buffy coat ▪ Emazie concentrate con aggiunta di soluzioni additive ▪ Emazie concentrate private del buffy-coat e risospese in soluzioni additive ▪ Emazie lavate ▪ Emazie leucodeplete ▪ Emazie irradiate ▪ Emazie congelate ▪ Concentrato di emazie da aferesi 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrato granulocitario da aferesi • Cellule staminali emopoietiche periferiche 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrato piastrinico da aferesi • Concentrato piastrinico da plasma-piastrinoafèresi • Concentrato piastrinico da singola unità di sangue intero • Concentrato piastrinico da pool di buffy-coat • Concentrato piastrinico lavato • Concentrato piastrinico irradiato • Piastrine crioconservate (da aferesi) • Gel piastrinico 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma fresco congelato • Crioprecipitato • Plasma privo di crioprecipitato • Colla di fibrina <p style="text-align: center;">PLASMADERIVATI</p> <ul style="list-style-type: none"> • Albumina e soluzioni di proteine plasmatiche • Immunoglobuline <ul style="list-style-type: none"> • Uso ev • Specifiche anti-HBV • Specifiche anti-tetano • Fattori della coagulazione

ERITROCITI

Emazie concentrate - Emazie concentrate private del buffy coat

Si ottengono dalla centrifugazione del sangue intero e rimozione, rispettivamente, del plasma o di plasma e buffy-coat. Sono conservati in frigoemoteche con temperatura controllata a 2-6°C. Il periodo di conservazione è di 35 gg.

Emazie concentrate con aggiunta di soluzioni additive - Emazie concentrate private del buffy-coat e risospese in soluzioni additive

Si ottengono dalle precedenti aggiungendo alla sacca di eritrociti una soluzione glucidica (generalmente mannitolo), che consente il prolungamento del periodo di conservazione. La soluzione è contenuta in una delle sacche di prelievo, per cui l'operazione può essere effettuata a sistema chiuso. Costituiscono i componenti eritrocitari di più frequente utilizzo. Sono conservati in frigoemoteche con temperatura controllata a 2-6°C. Il periodo di conservazione è di 42 gg.

Emazie lavate

Si ottengono aggiungendo al concentrato eritrocitario una soluzione salina (fisiologica) a 4°C, centrifugando la sacca e poi scartando il sovrantante. Ripetendo più volte l'operazione si ottiene un concentrato eritrocitario privo di plasma. Viene utilizzato nei casi in cui la somministrazione di proteine plasmatiche debba essere evitata: pazienti con deficit congenito di IgA (che possono produrre anticorpi anti-IgA e andare incontro a gravi reazioni anafilattiche in caso di contatto con quantità anche modeste di immunoglobuline) o pazienti affetti da Emoglobinuria parossistica notturna (in cui l'infusione di fattori del complemento scatena crisi emolitiche). Vanno conservate a 2-6°C per il tempo più breve possibile, non oltre 24 ore se la procedura ha comportato l'apertura del sistema, per il rischio di contaminazione batterica.

Emazie leucodeplete

Si ottengono mediante filtrazione del concentrato eritrocitario, che può essere effettuato in laboratorio o, al letto del paziente, in corso di trasfusione. In teoria presentano numerosi vantaggi rispetto ai preparati precedenti:

- Riduzione alloimmunizzazione
- Riduzione infezioni post-operatorie
- Riduzione reazioni trasfusionali non-emolitiche
- Riduzione Graft Versus Host Disease (GVHD)
- Riduzione trasmissione patogeni (CMV, CJD)
- Riduzione mortalità post-operatoria (cardio-chirurgia)
- Riduzione ospedalizzazione

In alcuni paesi (Gran Bretagna, Olanda) la leucodeplezione viene effettuata su tutti i concentrati eritrocitari (leucodeplezione universale); in altri (Italia, USA, Canada) viene impiegata solo in casi selezionati, ritenendo che non vi sia la dimostrazione di un vantaggio tale, rispetto alla rimozione del buffy-coat, da giustificare l'aumento dei costi.

Il preparato viene conservato nelle stesse condizioni (2-6°C) e per lo stesso tempo del componente eritrocitario da cui deriva (35-42 gg).

Emazie irradiate

Si ottengono sottoponendo il concentrato eritrocitario a gamma-irradiazione (25-50 cGy), al fine di inattivare i linfociti causa di GVHD. L'irradiazione deve avvenire entro 14 giorni dal prelievo e il prodotto deve essere trasfuso entro 28 gg dal prelievo, conservandolo a 2-6°C. A causa del danno causato dall'irradiazione ai globuli rossi, con conseguente aumento della concentrazione di potassio nell'unità, la trasfusione va effettuata entro 48 ore dall'irradiazione nei neonati e nei pazienti con iperpotassemia.

Emazie congelate

Si ottengono aggiungendo un idoneo crioprotettore (glicerolo) e congelando il concentrato eritrocitario. A seconda della concentrazione di glicerolo impiegata si distinguono due metodiche:

- A bassa concentrazione di glicerolo (15-20%): il componente va portato a temperatura di -150°C impiegando congelamento con azoto liquido
- Ad elevata concentrazione di glicerolo (40%): il componente va congelato a -80° con apposito congelatore

A tali temperature l'emocomponente può essere conservato 10 anni.

Prima della trasfusione il concentrato va scongelato e, nel più breve tempo possibile, deglicerolizzato. La deglicerolizzazione si ottiene mediante lavaggi successivi con soluzioni a concentrazione decrescente di glicerolo; una volta allontanato completamente il glicerolo l'unità va trasfusa nel più breve tempo possibile. Sono disponibili strumentazioni che consentono l'automazione

delle procedure. Date le modalità di preparazione il concentrato presenta le caratteristiche delle emazie lavate.

Concentrato di emazie da aferesi

Si ottiene mediante l'impiego di separatori cellulari, ed è costituito da 1-2 unità di emazie: l'emocomponente ottenuto ha le caratteristiche delle emazie private del buffy-coat o delle emazie leucodeplete. Le modalità di conservazione sono identiche ai corrispondenti concentrati eritrocitari (35-42 gg, a seconda dell'impiego di soluzioni additive).

LEUCOCITI

Concentrato granulocitario da aferesi

Si ottiene mediante l'utilizzo di separatori cellulari, utilizzando agenti sedimentanti (amido idrossietilico) per favorire la raccolta di granulociti sospesi in plasma. Per ottenere un numero di cellule sufficiente il donatore, prima della procedura di aferesi, va sottoposto a trattamento con steroidi o con G-CSF. Il concentrato va conservato a 20-24°C per non più di 24 ore.

Cellule staminali emopoietiche periferiche

Le cellule staminali del sangue periferico (peripheral blood stem cells - PBSC) sono utilizzate in oncematologia per consentire il recupero ematologico dopo chemioterapia mieloablativa: l'uso autologo sta progressivamente sostituendo il trapianto di midollo osseo e il loro utilizzo si espande progressivamente anche nel campo del trapianto allogenico. La raccolta delle cellule staminali CD34+ si ottiene in due modi:

- Da aferesi
- Da sangue del cordone ombelicale

Nel caso della raccolta con separatore cellulare il paziente/donatore va sottoposto, prima della procedura, ad un trattamento finalizzato alla mobilizzazione delle cellule CD34+. In ambito autologo il trattamento è costituito da un chemioterapico ad alte dosi (ciclofosfamide) e/o fattore di crescita (G-CSF): 1-2 procedure di aferesi vengono effettuate dopo 8-10 gg, nella fase del recupero ematologico, quando è massima la presenza in circolo delle cellule staminali. Nel caso della donazione omologa il donatore viene trattato per 4-5 gg con infusioni s.c di G-CSF, e poi sottoposto a 1-2 procedure di aferesi della durata di 2-3 ore. Il preparato può essere soggetto, prima dell'utilizzo, a trattamenti in vitro finalizzati alla rimozione di cellule neoplastiche (purging) o, al fine di ridurre la gravità della GVHD, dei linfociti T.

Le cellule staminali da sangue di cordone ombelicale vengono raccolte, al momento del parto, dal sangue placentare: presentano alcune caratteristiche tali da suscitare grande interesse:

- Facilità della raccolta
- Migliore tolleranza da parte del sistema immunitario del ricevente, con ridotto rischio di rigetto anche nel caso di compatibilità HLA incompleta (mis-matched) e possibilità di regimi di condizionamento più blandi
- Ridotta gravità della GVHD

La limitata quantità di cellule CD34+ ha comportato l'impiego prevalente in ambito pediatrico: l'impiego di tecniche di espansione cellulare in vitro consente il progressivo utilizzo anche nell'adulto. Le cellule staminali periferiche vengono congelate, con l'impiego di crioprotettori, a -80°C in azoto liquido; per l'utilizzo devono essere scongelate a 37°C immediatamente prima dell'impiego.

PIASTRINE

Concentrato piastrinico da aferesi - Concentrato piastrinico da plasma-piastrinoafèresi

Si ottengono mediante l'impiego di separatori cellulari. Una unità è, di norma, sufficiente per il trattamento giornaliero di un paziente. Il concentrato può essere conservato per 5 gg a 20-24°C in agitazione continua.

Concentrato piastrinico da singola unità di sangue intero

Si ottiene da una unità di sangue intero fresco, mantenuto a 20-24°C. Con una prima centrifugazione si ottiene una unità di plasma ricco di piastrine (PRP): la successiva centrifugazione consente di ottenere il concentrato piastrinico. Per il trattamento giornaliero di un paziente è necessaria, di norma, una unità ogni 10 Kg di peso corporeo. Il concentrato può essere conservato per 5 gg a 20-24°C in agitazione continua.

Concentrato piastrinico da pool di buffy-coat

I buffy-coat ottenuti dalla centrifugazione ad elevata velocità di 5-6 unità di sangue intero fresco, mantenuto a 20-24°C, dello stesso gruppo ABO, sospesi in una quantità variabile di plasma (30-50 ml), vengono raccolti in un'unica sacca: al pool di buffy-coat può essere aggiunta una soluzione nutriente, riducendo la relativa quota di plasma. Il pool viene sottoposto ad una nuova centrifugazione, al termine della quale si raccoglie il sovranatante, che costituisce il concentrato piastrinico, che è, di norma, sufficiente per il trattamento giornaliero di un paziente. Il concentrato può essere conservato per 5 gg a 20-24°C in agitazione continua.

Concentrato piastrinico lavato

Si ottiene aggiungendo al concentrato piastrinico una soluzione salina (fisiologica) a 20-24°C, centrifugando la sacca, scartando il sovranatante, e risospendendo il preparato in soluzioni additive. La tecnica comporta una riduzione del contenuto piastrinico. L'utilizzo dopo il lavaggio deve avvenire nel più breve tempo possibile.

Concentrato piastrinico irradiato

Si ottiene sottoponendo il concentrato piastrinico a gamma-irradiazione (25-50 cGy), al fine di inattivare i linfociti causa di GVHD. L'irradiazione non modifica la scadenza.

Piastrine crioconservate (da aferesi)

Si ottengono congelando a temperature inferiori a -80°C un concentrato piastrinico da aferesi prelevato da non oltre 24 ore, utilizzando un agente crioprotettivo. Il preparato può essere conservato 1 anno a -80°C, 10 anni a -150°C; al momento della trasfusione va scongelato, risospeso in soluzioni additive e utilizzato immediatamente.

Gel piastrinico

Si ottiene da sangue intero, previa produzione di concentrato piastrinico da singola unità. Sono disponibili in commercio sistemi semiautomatici per la preparazione di gel a partire da piccole quantità di sangue intero (30-50 mL). L'impiego è prevalentemente per uso autologo. Al pellet piastrinico, ottenuto per centrifugazione del PRP, si aggiungono, al momento dell'uso, calcio e trombina. Il gel non viene utilizzato a scopo emostatico ma, sfruttando la ricchezza in fattori di crescita contenuti negli alfa-granuli, per favorire i processi di riparazione tissutale. L'impiego prevalente è in chirurgia maxillo-faciale, in ortopedia e nel trattamento delle ulcere cutanee.

PLASMA

Plasma fresco congelato

In base alla legge 219 il plasma fresco congelato (PFC), al fine di preservare i fattori labili della coagulazione, va separato di preferenza entro 6 ore, e comunque non oltre 18 ore, dal prelievo; le procedure di congelamento devono essere tali da portare l'emocomponente a -30°C in 1 ora. Il PFC, se destinato all'uso clinico, può essere conservato 2 anni a temperatura di -25°C o inferiore, 3 mesi a temperatura compresa tra -18 e -25°C; al termine di tali periodi va avviato all'industria per la produzione di plasmaderivati. Prima dell'utilizzo il PFC deve essere scongelato con idonea apparecchiatura a 37°C; una volta scongelato deve essere utilizzato nel più breve tempo possibile e comunque non oltre 24 ore di conservazione a 0-4°C.

In realtà ai fini della lavorazione industriale è in uso una diversa definizione:

- Plasma di tipo A: da aferesi, congelato entro 6 ore dal prelievo
- Plasma di tipo B: da scomposizione, congelato entro 6 ore dal prelievo
- Plasma di tipo C: da scomposizione, congelato da 6 a 72 ore dal prelievo

L'industria di lavorazione utilizza solo i tipi A e B per la produzione di fattori della coagulazione (FVIII, FIX, ATIII, complesso protrombinico), riservando il tipo C alla sola produzione di albumina e immunoglobuline. Questa classificazione è sostanzialmente adottata anche nell'impiego clinico, per cui si tende a considerare PFC solo il plasma congelato entro 6 ore dal prelievo.

Le caratteristiche biologiche del plasma (lunga conservabilità, assenza di membrane cellulari) consentono l'applicazione di metodiche atte alla riduzione del rischio infettivo.

- **Quarantena:** il plasma viene tenuto in 'stand-by' per un periodo di tempo pari alla lunghezza del periodo finestra delle principali malattie trasmissibili (120 gg). Il suo utilizzo è condizionato alla negatività delle indagini virologiche ripetute sul donatore al termine di tale periodo. Ovviamente questo comporta notevoli difficoltà di gestione

- Trattamento con solvente-detergente: applicabile solo su pool di plasma, è sostanzialmente abbandonato in quanto efficace solo su microrganismi ad involucro lipidico e per il rischio di iperfibrinolisi nel ricevente
- Trattamento con blu di metilene: applicabile su singola unità e attivo anche su microrganismi privi di involucro lipidico provoca però una perdita nel contenuto di fattori della coagulazione
- Trattamento con Psoralene (Amatosalene) ed esposizione a UV: presenta le caratteristiche del trattamento con blu di metilene senza la riduzione dei fattori della coagulazione; è in corso di studio

Crioprecipitato - Plasma privo di crioprecipitato

Si ottengono scongelando il PFC a 1-6°C: in questo modo si ottengono un sovrantante (cryosupernatant) e un pellet (crioprecipitato), che possono essere raccolti in contenitori separati.

Il crioprecipitato contiene FVIII, FXIII, vWF, fibrinogeno, fibronectina, può essere ricongelato e conservato con le stesse caratteristiche del PFC: una volta scongelato deve essere utilizzato nel più breve tempo possibile e comunque non oltre 24 ore di conservazione a 0-4°C.

Il plasma privo di crioprecipitato viene utilizzato, in sostanza, solo come liquido di rimpiazzo in corso di plasma-exchange in pazienti con Porpora Trombotica Trombocitopenica (s. di Moschowitz), sfruttandone il contenuto in ADAMTS13, la metalloproteasi carente, ed evitando di fornire fattori della coagulazione in pazienti con una patologica tendenza alla ipercoagulabilità.

Colla di fibrina

Si ottiene da un crioprecipitato autologo, mediante l'aggiunta di calcio e trombina. Il preparato può essere ottenuto con procedura manuale, ma sono in commercio strumenti semiautomatici e prodotti industriali. Viene utilizzata in ambito chirurgico, utilizzandone le proprietà emostatiche allo scopo di favorire la cicatrizzazione delle suture. L'emocomponente può essere congelato e conservato con le stesse modalità del PFC; una volta scongelato va utilizzato nel più breve tempo possibile. Sono allo studio preparati composti da colla di fibrina associata a piastrine congelate (gel criopiastrinico) che tentano di sfruttare contemporaneamente le proprietà del gel piastrinico e delle colle di fibrina.

PLASMADERIVATI

Si ottengono dalla lavorazione industriale del plasma con la combinazione di metodi fisici (crioprecipitazione), chimico-fisici (precipitazione all'etanolo - metodo di Cohn) e cromatografici (gel precipitazione, cromatografia a scambio ionico, cromatografia di affinità). La lavorazione parte da un batch di 4.500-7.500 Kg di plasma. I prodotti di maggiore importanza sono:

- Albumina e soluzioni di proteine plasmatiche
- Immunoglobuline
 - Uso ev
 - Specifiche anti-HBV
 - Specifiche anti-tetano
- Fattori della coagulazione

Le immunoglobuline specifiche sono ottenute da plasma raccolto da donatori appositamente immunizzati contro l'HBV o la tossina tetanica. Data la necessità di unire in batch, prima della lavorazione, il plasma proveniente da migliaia di donatori, e del conseguente rischio infettivo, vengono sempre applicate misure di inattivazione virale:

- Pastorizzazione (riscaldamento in soluzione acquosa, 60°C, 10h)
- Riscaldamento di prodotti liofilizzati
- Trattamento solvente/detergente (Triton X, Tween 80)
- Nanofiltrazione
- Basso pH