

RACCOLTA, PREPARAZIONE, CONSERVAZIONE E STANDARD DI QUALITÀ DEL SANGUE E DEGLI EMOCOMPONENTI

PARTE A

A.1 Modalità per la raccolta del sangue intero e degli emocomponenti raccolti mediante aferesi

- 1.1 Per la raccolta del sangue intero e degli emocomponenti devono essere utilizzati dispositivi atti a consentire la diversione del primo volume di sangue raccolto, da destinare agli accertamenti diagnostici associati alla donazione.
- 1.2 Ad ogni donazione di sangue intero o emocomponenti viene prelevato al donatore un volume di sangue aggiuntivo necessario per l'esecuzione degli esami di laboratorio previsti dall'allegato IV, parte B. La quantità complessiva di sangue prelevato a tal fine non supera 40 mL.
- 1.3 I dispositivi di prelievo e i campioni ematici, prelevati per la qualificazione biologica dell'unità raccolta e per i controlli del donatore, devono essere etichettati prima della raccolta. Prima della venopuntura devono essere verificati dall'operatore responsabile del prelievo: l'identità del donatore mediante riconoscimento attivo dello stesso, la corrispondenza tra il codice identificativo della donazione, riportato sulle etichette apposte sul dispositivo di prelievo e sui campioni ematici, ed il suo collegamento univoco al donatore.
- 1.4 L'operatore sanitario responsabile di ciascuna procedura di raccolta della donazione deve essere identificato e la sua identificazione deve essere rintracciabile in ogni momento.

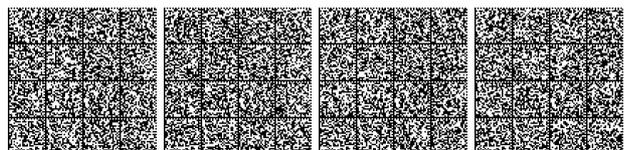
Per ciascuna tipologia di donazione devono essere rispettati i requisiti di seguito riportati.

A.2 Raccolta di sangue intero

- 2.1. Volume pari a 450 mL, al netto della soluzione anticoagulante impiegata. Eccezionalmente, in casi particolari e motivati ed ai fini dell'utilizzo dell'unità è possibile accettare uno scostamento del 10% del volume.
- 2.2 Flusso ematico adeguato ed ininterrotto in modo da consentire che la donazione avvenga in un tempo complessivo inferiore a 10 minuti; se la sua durata è superiore a 12 minuti la donazione non deve essere utilizzata per la preparazione di concentrati piastrinici, se superiore a 15 minuti il plasma ottenuto dalla donazione non deve essere utilizzato a scopo clinico e per la preparazione dei fattori della coagulazione.

A.3 Raccolta di plasma da aferesi

- 3.1 Volume minimo di 600 mL, massimo di 700 mL, al netto della soluzione anticoagulante impiegata, con un volume massimo complessivo di 1,5 litri al mese e 12 litri nell'anno.



A.4 Raccolta di piastrine da aferesi

- 4.1 Volume adeguato a contenere un minimo di $3,0 \times 10^{11}$ piastrine per unità, risospese in un volume di soluzione additiva adeguato a mantenere le caratteristiche biologiche delle piastrine stesse, con la minima necessaria presenza residua di plasma.

A.5 Raccolta di granulociti da aferesi:

- 5.1 Volume massimo di 400 mL, con un contenuto da $1,5$ a 3×10^8 granulociti per Kg di peso del ricevente

A.6 Raccolta mediante aferesi multicomponente

I diversi emocomponenti sono raccolti in contenitori separati. Le raccolte multicomponente comprendono:

6.1 Raccolta di globuli rossi e plasma (eritroplasmaferesi)

- volume di globuli rossi, risospesi in soluzione additiva, pari ad almeno 280 mL e di plasma pari a 450 mL, per un volume complessivo massimo di 730 mL, al netto della soluzione anticoagulante impiegata.

6.2 Raccolta di globuli rossi e piastrine (eritropiastrinoferesi)

- volume di globuli rossi, risospesi in soluzione additiva, pari ad almeno 280 mL e di una unità di concentrato piastrinico contenente almeno $2,0 \times 10^{11}$ piastrine risospese in un volume di soluzione additiva adeguato a mantenere le caratteristiche biologiche delle piastrine stesse, con la minima necessaria presenza residua di plasma.

6.3 Raccolta di globuli rossi, piastrine e plasma

- globuli rossi e piastrine come indicato al punto 6.2; è possibile raccogliere anche un volume di plasma pari a 350 mL per un volume massimo complessivo non superiore a 700 mL al netto della soluzione anticoagulante impiegata.

6.4 Raccolta di plasma e piastrine (plasmapiastrinoferesi)

- volume di plasma non inferiore a 450 mL e una unità di concentrato piastrinico contenente almeno $2,0 \times 10^{11}$ piastrine risospese in un volume di soluzione additiva adeguato a mantenere le caratteristiche biologiche delle piastrine stesse, con la minima necessaria presenza residua di plasma, per un volume massimo complessivo di 700 mL al netto della soluzione anticoagulante impiegata.

6.5 Raccolta di due unità di concentrato piastrinico

- ciascuna unità con un contenuto piastrinico non inferiore a $2,0 \times 10^{11}$, con risospensione in un volume di soluzione additiva adeguato a mantenere le caratteristiche biologiche delle piastrine stesse, con la minima necessaria presenza residua di plasma.

6.6 Raccolta di due unità di globuli rossi

- ciascuna unità con un contenuto minimo di emoglobina pari a 40 g, con il minimo residuo plasmatico possibile.

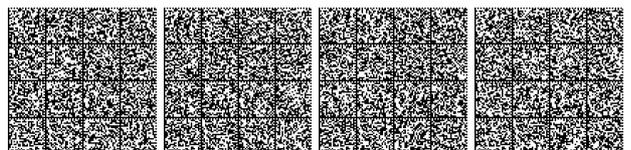


PARTE B

B.1 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEGLI EMOCOMPONENTI

B.1.1 Requisiti generali

1. La preparazione degli emocomponenti deve avvenire con procedure che garantiscano la sterilità dei prodotti.
2. Ciascun emocomponente deve rispondere ai requisiti di qualità stabiliti nel presente Allegato.
3. La qualità degli emocomponenti deve essere garantita attraverso l'esecuzione di specifici controlli, pianificati per quantità e frequenza sulla base di adeguate valutazioni statistiche (controllo statistico di processo), al fine di ottenere dati statisticamente rappresentativi rispetto al volume complessivo della produzione dei singoli emocomponenti.
4. Per il sangue intero e per gli emocomponenti eritrocitari la durata del periodo di conservazione del preparato è in rapporto alla soluzione conservante/additiva impiegata.
5. Se la preparazione del prodotto ha comportato l'apertura del sistema, il prodotto stesso deve essere trasfuso nel più breve tempo possibile e comunque non oltre le ventiquattro ore, garantendone la conservazione a 4°C.
6. Ai fini della prevenzione della TRALI (*Transfusion Related Acute Lung Injury* – Danno polmonare acuto da trasfusione):
 - a. nei concentrati eritrocitari deve essere minimizzato il contenuto di plasma residuo utilizzando adeguate soluzioni additive per la conservazione;
 - b. per quanto concerne il plasma fresco congelato, può essere rilasciato ad uso trasfusionale solo plasma da donatori di sesso maschile o da donatrici nulligravide, con anamnesi negativa per pregresse trasfusioni di emocomponenti (si applica anche alla trasfusione di crioprecipitato);
 - c. per quanto concerne la trasfusione di piastrine da aferesi (singolo donatore) risospese esclusivamente in plasma (quindi con volumi plasmatici significativi), possono essere rilasciati per uso trasfusionale solo concentrati piastrinici da aferesi da donatori di sesso maschile o da donatrici nulligravide, con anamnesi negativa per pregresse trasfusioni di emocomponenti;
 - d. i concentrati piastrinici da aferesi e da pool di buffy coat da donatori con storia di trasfusioni e/o da donatrici con precedenti di gravidanza o aborto devono essere risospesi in soluzione additiva, limitando al minimo la quota di plasma residuo per ogni unità da aferesi e per singola unità di buffy coat;
 - e. l'eventuale utilizzo di plasma preparato industrialmente come specialità medicinale (inattivato con solvente/detergente) è considerato equivalente all'uso di plasma da donatori di sesso maschile o da donatrici nulligravide, ai fini della prevenzione della TRALI;
 - f. i donatori con presenza accertata di anticorpi anti-HLA / anti-HNA o direttamente implicati in casi di TRALI sono esclusi dalle donazioni di sangue e di emocomponenti ad uso clinico.



B.2 SANGUE INTERO

1. Tutto il sangue intero raccolto deve essere impiegato per la preparazione degli emocomponenti. Nel caso in cui l'unità di sangue intero venga impiegata per la preparazione dei concentrati piastrinici, la stessa deve essere mantenuta a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ per il tempo strettamente necessario.

Requisiti del sangue intero

Parametro da verificare	Requisito
Volume	450 mL (al netto dell'anticoagulante)
Conservazione	$4^{\circ}\text{C} \pm 2$ ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$ per produzione piastrine)

B.3 CONCENTRATI ERITROCITARI

1. Per i concentrati eritrocitari ottenuti dalla scomposizione del sangue intero e da aferesi la rimozione del buffy coat o la leucoriduzione, unitamente alla rimozione della massima possibile quantità di plasma e alla risospensione in soluzione additiva, costituiscono requisiti minimi obbligatori.

B.3.1 Requisiti del concentrato eritrocitario privato del buffy-coat e risospeso in soluzione additiva

Parametro da verificare	Requisito
Volume	Definito sulla base del sistema utilizzato (soluzione additiva tra 80 e 110 mL)
Emoglobina	Minimo 43 g per unità
Ematocrito	0,50 – 0,70
Leucociti residui	$< 1,2 \times 10^9$ per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	$< 0,8\%$ della massa eritrocitaria
Conservazione	$4^{\circ}\text{C} \pm 2$

B.3.2 Requisiti del concentrato eritrocitario leucodepleto e risospeso in soluzione additiva

Parametro da verificare	Requisito
Volume	Definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	Minimo 40 g per unità
Ematocrito	0,50 – 0,70
Leucociti residui (leucodepleto)	$< 1 \times 10^6$ per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	$< 0,8\%$ della massa eritrocitaria
Conservazione	$4^{\circ}\text{C} \pm 2$

La rimozione dei leucociti può essere ottenuta mediante:



- a) filtrazione in linea del sangue intero (*pre-storage*), successiva centrifugazione e rimozione del plasma; questa può essere effettuata fino a 24 ore dopo la donazione;
- b) filtrazione in linea del concentrato eritrocitario (*pre-storage*); questa può essere effettuata fino a 24 ore dopo la donazione;
- c) filtrazione successiva alla produzione e conservazione del concentrato eritrocitario (*post-storage*). In ragione della dimostrata inferiorità in termini di qualità clinica dei concentrati eritrocitari leucodepleti ottenuti con questa modalità di leucodeplezione, la metodica di leucodeplezione *post-storage*, ove praticata, è dismessa a favore delle metodiche *pre-storage*.

B.3.3 Requisiti del concentrato eritrocitario leucodepleto da aferesi

Parametro da verificare	Requisito
Volume	Definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	Minimo 40 g per unità (leucodepleto)
Ematocrito	0,50 – 0,70
Leucociti residui (leucodepleto)	< 1 x 10 ⁶ per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	< 0,8% della massa eritrocitaria
Conservazione	4 °C ± 2

I concentrati eritrocitari da aferesi, se non leucodepleti, devono comunque rispondere ai requisiti minimi di rimozione del buffy coat, rimozione della massima possibile quantità di plasma e risospensione in soluzione additiva.

B.3.4 Requisiti del concentrato eritrocitario leucodepleto lavato

E' prodotto a partire dai concentrati eritrocitari indicati ai punti B.3.1, B.3.2, B.3.3. L'ematocrito varia in funzione delle necessità cliniche. Il preparato deve essere conservato a 4°C per un periodo di tempo il più breve possibile e comunque non superiore a ventiquattro ore se non vengono utilizzati metodi che ne garantiscono la lavorazione in circuito chiuso. Se la lavorazione avviene in circuito chiuso e se il preparato è conservato utilizzando soluzioni additive/conservanti, questo emocomponente può essere utilizzato fino a 7 giorni dalla preparazione.

Parametro da verificare	Requisito
Volume	Definito sulla base del sistema utilizzato
Emoglobina	Minimo 40 g per unità
Ematocrito	0,50 – 0,70
Contenuto in proteine del liquido sovranatante del prodotto finale	< 0,5 g per unità
Emolisi alla fine del periodo di conservazione	< 0,8% della massa eritrocitaria
Conservazione	4 °C ± 2



B.3.5 Requisiti del concentrato eritrocitario leucodepleto crioconservato

Parametro da verificare	Requisito
Volume	> 185 mL
Emoglobina nel sovranatante	< 0,2 g per unità
Ematocrito	0,65 – 0,75
Emoglobina	Minimo 36 g per unità
Osmolarità della soluzione di sospensione finale	< 340 mOsm/L, in assenza di soluzione additiva
Leucociti residui	< 1×10^6 per unità
Sterilità	Sterile
Conservazione	- 60 °C \pm 2

Le emazie crioconservate possono essere conservate a temperature inferiori a - 60°C fino a dieci anni (con possibile deroga in caso di unità negative per antigeni ad alta incidenza e per fenotipo Rh raro) e il loro impiego a scopo trasfusionale è condizionato ai criteri di idoneità previsti dalla normativa vigente all'atto dello scongelamento e dalla garanzia del mantenimento nel tempo della corretta temperatura di conservazione. Prima dell'uso le emazie sono scongelate, deglicerolizzate, lavate, risospese in soluzione fisiologica o soluzione additiva e utilizzate nel più breve tempo possibile; possono essere conservate a +4°C (\pm 2) per non più di ventiquattro ore se non vengono utilizzati metodi che garantiscono l'integrità del circuito chiuso. Nel caso in cui le emazie scongelate siano prodotte in circuito chiuso e risospese in soluzioni additive il tempo massimo di conservazione è di 7 giorni. Le procedure di deglicerolizzazione e lavaggio possono essere effettuate con l'ausilio di dispositivi automatizzati qualificati per lo specifico impiego, il cui utilizzo può comportare l'ottenimento di unità di emazie con valori di ematocrito inferiori a 0,65, che in ogni caso garantiscono un contenuto di emoglobina non inferiore a 36 g per unità. L'unità ricostituita di emazie congelate contiene minimi quantitativi di proteine, granulociti e piastrine.

B.4 CONCENTRATI PIASTRINICI

B.4.1 Requisiti del concentrato piastrinico da singolo buffy coat

Parametro da verificare	Requisito
Volume	> 40 mL per 60×10^9 piastrine
Piastrine	> 60×10^9 per unità
Leucociti residui	< $0,05 \times 10^9$ per unità
pH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	> 6,4
Conservazione	22 °C \pm 2

Il contenuto di piastrine nel volume indicato deve essere presente almeno nell'80% delle unità sottoposte a controllo. La conservazione deve essere effettuata con modalità che garantiscano la vitalità e il mantenimento dell'attività emostatica delle piastrine contenute. Il concentrato piastrinico da singolo buffy coat può essere preparato esclusivamente in circuito chiuso e, come tale, può essere conservato in agitazione continua fino a 5 giorni dal prelievo.



B.4.2 Requisiti del concentrato piastrinico da pool di buffy-coat leucodepleto

Parametro da verificare	Requisito
Volume	> 40 mL per 60×10^9 piastrine per singola unità che costituisce il pool
Piastrine nel prodotto leucodepleto	Minimo 2×10^{11}
Leucociti residui	< 1×10^6 per singolo pool
pH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	> 6,4
Conservazione	22 °C \pm 2

Il contenuto minimo di piastrine nel prodotto finale deve essere presente almeno nell'85% dei pool sottoposti a controllo.

Il sistema di identificazione del pool deve garantire la rintracciabilità di ciascuna unità che entra nella composizione del pool.

Il volume di plasma o di soluzione additiva deve essere tale da garantire durante il periodo di conservazione il valore di pH indicato in tabella.

La conservazione deve essere effettuata con modalità che garantiscano la vitalità e il mantenimento dell'attività emostatica delle piastrine contenute. Il concentrato piastrinico da pool di buffy coat, preparato in sistema chiuso, può essere conservato a 22°C (\pm 2) in agitazione continua non oltre 5 giorni dal prelievo.

Da questo prodotto possono essere preparati concentrati piastrinici lavati; i lavaggi comportano la riduzione proteica, ma contemporaneamente comportano la perdita del 10-20% delle piastrine presenti.

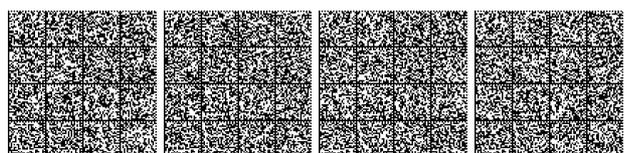
B.4.3 Requisiti del concentrato piastrinico da aferesi leucodepleto

Parametro da verificare	Requisito
Volume	> 40 mL per 60×10^9 piastrine per unità
Piastrine	3×10^{11} (minimo 2×10^{11} se ottenuto da aferesi multicomponent)
Leucociti residui	< 1×10^6 per singola unità
pH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	> 6,4
Conservazione	22 °C \pm 2

Il contenuto minimo di piastrine nel prodotto finale deve essere presente almeno nel 90% dei concentrati sottoposti a controllo.

L'emocomponente, preparato in sistema chiuso, può essere conservato in agitazione continua per un periodo di tempo non superiore a 5 giorni dal prelievo. La conservazione deve essere effettuata con modalità che garantiscano la vitalità e il mantenimento dell'attività emostatica delle piastrine contenute. Il volume di plasma o di soluzione additiva deve essere in quantità tale da garantire, durante tutto il periodo di conservazione, il mantenimento del pH al valore indicato in tabella.

Da questo prodotto possono essere preparati concentrati piastrinici lavati; i lavaggi comportano la riduzione proteica, ma comportano la perdita del 10-20% delle piastrine presenti. Le piastrine devono essere risospese in soluzione additiva.



B.4.4 Requisiti del concentrato piastrinico crioconservato (da aferesi)

Parametro da verificare	Requisito
Volume	50 – 200 mL
Piastrine	> 40% del contenuto piastrinico pre-congelamento

Il preparato può essere conservato in congelatore meccanico a -80°C fino ad un anno, o in vapori di azoto liquido a -150°C, fino a dieci anni. E' necessario utilizzare un crioprotettivo. Prima dell'uso le piastrine devono essere scongelate e risospese in appropriata soluzione. Dopo scongelamento devono essere usate immediatamente. In caso di breve periodo di conservazione vanno mantenute in adeguata agitazione a +22°C ± 2°C. Per il trasporto allo stato congelato devono essere adottate misure volte a mantenere adeguate condizioni di conservazione.

B.5 LEUCOCITI

B.5.1 Requisiti del concentrato granulocitario da aferesi

Parametro da verificare	Requisito
Volume	≤ 400 mL
Granulociti	1,5 – 3 x 10 ⁸ granulociti/Kg di peso del ricevente
Conservazione	22 °C ± 2

La preparazione deve essere sottoposta ad irradiazione prima di essere trasfusa. La trasfusione deve essere effettuata quanto prima e comunque entro ventiquattro ore dalla preparazione.

B.6 PLASMA

B.6.1 Requisiti del plasma fresco congelato per uso clinico

Parametro da verificare	Requisito
Volume	Definito sulla base della metodica utilizzata ± 10%
Fattore VIIIc	In media non meno di 70 IU per 100 mL
Eritrociti residui	< 6 x 10 ⁹ /L
Leucociti residui	< 0,1 x 10 ⁹ /L, se leucodepleto < 1 x 10 ⁶
Piastrine residue	< 50 x 10 ⁹ /L
Gocciolamento/Perdite	Nessuna perdita all'ispezione visiva dopo pressione nell'estrattore di plasma, prima del congelamento e dopo scongelamento
Aspetto	No colore anomalo o evidenti coaguli

Qualora il plasma sia ottenuto da sangue intero deve essere separato e avviato al congelamento preferibilmente entro sei ore dalla raccolta; il plasma può essere anche separato e avviato al congelamento entro diciotto ore dalla raccolta se l'unità di partenza viene refrigerata e mantenuta ad una temperatura inferiore a +10 °C.

Qualora il plasma sia ottenuto da aferesi, il congelamento deve preferibilmente iniziare entro sei ore dalla raccolta e, in ogni caso, non oltre le 18 ore se l'unità di partenza viene refrigerata e mantenuta ad una temperatura inferiore a +10°C.



Il plasma ottenuto da sangue intero e da aferesi deve essere congelato utilizzando una apposita apparecchiatura, che consenta il completo congelamento ad una temperatura a valori inferiori a -30°C entro un'ora.

Il plasma fresco congelato (PFC), se mantenuto costantemente a temperatura inferiore a -25°C può essere conservato fino a ventiquattro mesi, se a temperatura compresa tra -18 e -25°C fino a tre mesi. Trascorsi i periodi anzidetti il preparato è utilizzabile solo per il frazionamento industriale, con esclusione dell'avvio alla produzione di fattori coagulativi.

Lo scongelamento del PFC deve avvenire in condizioni controllate a temperatura compresa tra 30°C e 37°C in bagno termostatico con agitazione o con altra strumentazione idonea, tale da consentire il controllo della temperatura; dopo lo scongelamento deve essere usato il più presto possibile e comunque non oltre ventiquattro ore se conservato a $+4^{\circ}\text{C}$ (± 2) $^{\circ}\text{C}$. Il PFC scongelato non può essere ricongelato.

Il plasma, sottoposto ad inattivazione dei patogeni mediante tecnologie approvate ai sensi delle normative vigenti, deve avere un contenuto di Fattore VIIIc superiore a 50 UI/dL nella media dei controlli ed un contenuto di fibrinogeno $\geq 60\%$ del prodotto fresco.

Il plasma contenente anticorpi anti-eritrocitari irregolari clinicamente significativi non deve essere utilizzato a scopo clinico.

Il plasma fresco congelato ad uso clinico può essere sottoposto a quarantena al fine di ridurre il rischio di trasmissione di malattie infettive nel periodo finestra. La procedura di quarantena consiste nel conservare l'unità donata per un tempo minimo di almeno 60 giorni fino alla successiva donazione del donatore. L'unità è rilasciata a fronte di test consecutivi negativi.

B.6.2 *Requisiti del plasma per frazionamento industriale e per la produzione industriale di plasma virus inattivato*

Per questo emocomponente si applicano i requisiti previsti dalle rispettive Monografie della Farmacopea europea e dalle altre norme europee applicabili.

B.6.3 *Requisiti del crioprecipitato*

Parametro da verificare	Requisito
Volume	30 – 40 mL
Fattore VIIIc	≥ 70 IU per unità
Fibrinogeno	> 140 mg per unità
Fattore Von Willebrand	> 100 IU per unità

Le condizioni di conservazione sono quelle del plasma fresco congelato (PFC).

Lo scongelamento, da effettuare immediatamente prima dell'uso, deve seguire le modalità indicate per il PFC.

B.7 *Requisiti degli emocomponenti irradiati.*

Le unità di emocomponenti, nel caso ne sia indicata l'irradiazione, devono essere sottoposte a una dose di radiazioni compresa tra 25 e 50 Gray, allo scopo di ridurre il rischio di *Graft versus Host Disease* (GvHD) post-trasfusionale. Il tempo di esposizione deve essere standardizzato per ogni apparecchio emittente ed aggiustato ad intervalli regolari per tener conto del decadimento dell'isotopo. Al fine di prevenire la consegna di emocomponenti non irradiati per pazienti con specifica indicazione clinica a trasfondere prodotti irradiati, deve



essere adottato un sistema convalidato indicatore dell'avvenuta irradiazione. L'irradiazione delle emazie deve avvenire entro quattordici giorni dal prelievo; le unità irradiate devono essere trasfuse in tempi brevi e comunque entro ventotto giorni dal prelievo. In particolari condizioni quali la trasfusione intrauterina e la trasfusione neonatale massiva, gli emocomponenti eritrocitari devono essere irradiati entro i 5 giorni successivi alla donazione ed utilizzati entro 24 ore dall'irradiazione. L'irradiazione non modifica la scadenza dei concentrati piastrinici. Le unità di sangue ed emocomponenti irradiate possono essere assegnate anche a pazienti immunologicamente competenti, fatte salve le dovute precauzioni per categorie a rischio di iperpotassiemia.

