

**DOCUMENTO TECNICO
DELLA CONSULTA PERMANENTE
E DEL
CENTRO NAZIONALE PER I TRAPIANTI**

**LINEE GUIDA PER IL PRELIEVO, LA PROCESSAZIONE
E L'UTILIZZO DI CELLULE
(ISOLE PANCREATICHE, EPATOCITI UMANI)**

7/9/2007

SEZIONE A

INDICAZIONI GENERALI

1. Scopo e campo di applicazione

Le presenti linee guida si applicano al prelievo, alla processazione e all'utilizzo a scopo di trapianto di cellule umane, nello specifico al prelievo di pancreas da donatore cadavere e alla sua processazione finalizzata alla preparazione di isole pancreatiche per trapianto nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo I, e al prelievo di fegato da donatore cadavere e alla sua processazione per la preparazione di epatociti destinati al trapianto e per applicazioni di fegato bioartificiale.

2. Definizione delle strutture coinvolte

2.1 Definizione di Unità di Processazione

Si definisce Unità di Processazione ogni struttura sanitaria, che operi nel rispetto delle seguenti linee guida, dopo valutazione della Regione di competenza e sentito il parere del Centro Regionale e Interregionale di Riferimento. Il suo campo di azione è rappresentato dall'isolamento, dalla coltura e dal controllo di qualità delle cellule ai fini di utilizzo nei pazienti in cui vi sia indicazione, garantendone qualità e sicurezza. L'Unità di Processazione deve fornire un servizio di qualità che, attraverso la ricerca, il continuo aggiornamento e la collaborazione con altre organizzazioni similari, in ambito nazionale ed internazionale, consenta continuamente di approfondire e migliorare i metodi di isolamento, trattamento ed impiego clinico delle cellule.

Il Centro Nazionale Trapianti identifica le Unità di Processazione di interesse nazionale, a cui si possono rivolgere i Centri Regionali di Riferimento, in assenza di una propria struttura, per l'acquisizione di cellule destinate all'utilizzo clinico.

2.2 Definizione di Centri di Prelievo

Centro di Prelievo è la struttura che, in accordo con una Unità di Processazione, prelevi pancreas o fegato da donatore cadavere e li trasferisca all'Unità competente per la processazione. L'attività di prelievo è coordinata dal Centro Regionale di Riferimento

2.3 Definizione di Centro di Utilizzo

Centro di utilizzo è la struttura identificata dalla Regione come idonea all'utilizzo clinico delle cellule isolate dall'Unità di Processazione. L'uso clinico delle cellule è consentito dopo la valutazione effettuata dall'Unità di Processazione, che ne dovrà certificare la sicurezza e la qualità. Non è consentito l'utilizzo di cellule non provviste della documentazione completa relativa alla donazione ed alla processazione dell'organo, nonché della certificazione rilasciata dall'Unità di Processazione.

3 Terminologia

- **Allotrapianto:** trapianto di organo, cellule o tessuti da un individuo all'altro della stessa specie.
- **Assicurazione di Qualità:** tutte quelle azioni sistematiche definite e pianificate necessarie per fornire la garanzia che un prodotto o un servizio rispondano ai requisiti richiesti di sicurezza e qualità.
- **BAL:** fegato bioartificiale
- **Coltura:** fase finale dell'isolamento durante la quale le isole pancreatiche o gli epatociti vengono mantenuti in condizioni chimico-fisiche adatte ad impedire il deterioramento biologico e fisico in attesa di rilascio.
- **Controllo della qualità:** le tecniche operative e le attività impiegate per soddisfare requisiti qualitativi definiti.
- **Distribuzione:** trasporto e consegna di un preparato cellulare ad un Centro di Utilizzo
- **Evento avverso grave:** qualunque evento negativo collegato con il prelievo, la processazione, la coltura o il trapianto che possa potenzialmente provocare la trasmissione di patologie o la morte, o produca invalidità o incapacità dei pazienti, o ne possa produrre o prolungare l'ospedalizzazione o lo stato di malattia.
- **Imballaggio:** confezionamento addizionale usato per proteggere uno o più contenitori di tessuti/organi durante il trasporto.
- **Isolamento:** insieme di procedure finalizzate alla separazione e purificazione della componente endocrina da quella connettiva ed esocrina del pancreas.
- **Preparato di cellule epatiche:** il prodotto finito, risultante da una serie di operazioni incluse il prelievo, la processazione, il controllo di qualità, pronto per essere consegnato ed usato sull'uomo.
- **Preparato di isole pancreatiche:** il prodotto finito, risultante da una serie di operazioni incluse il prelievo, la processazione, il controllo di qualità, pronto per essere consegnato ed usato sull'uomo.
- **Procedure operative standard (POS):** documento che descrive in un ordine stabilito, logico, dettagliato e riproducibile le modalità operative finalizzate al corretto svolgimento di un processo.
- **Reazione avversa grave:** una risposta non voluta collegata all'applicazione sull'uomo di cellule che provochi la morte, metta in pericolo la vita o produca invalidità o incapacità dei pazienti, o ne produca o prolunghi l'ospedalizzazione o lo stato di malattia.
- **Rintracciabilità:** la facoltà di localizzare e individuare le cellule in ogni fase dell'approvvigionamento, della lavorazione, del controllo e dello stoccaggio fino alla distribuzione al ricevente o al luogo di smaltimento, compresa la capacità di individuare il donatore e l'Unità di Processazione che riceve, lavora o conserva le cellule e, a livello di strutture mediche, la capacità di individuare i responsabili che effettuano la applicazione delle cellule sui riceventi; la rintracciabilità comporta inoltre la facoltà di reperire e individuare tutti i dati pertinenti relativi ai prodotti e ai materiali che entrano in contatto con tali cellule.
- **Sistema di Qualità:** La struttura organizzativa, le responsabilità, le procedure, i procedimenti e le risorse destinati ad attuare la gestione della qualità, comprese tutte le attività che direttamente o indirettamente contribuiscono alla qualità;

Procedura operativa standard (POS): documento che descrive in un ordine stabilito, logico, dettagliato e riproducibile le modalità operative finalizzate al corretto svolgimento di un processo

- **Standard:** parametri e procedure applicabili per lo screening del donatore, il prelievo dell'organo, i test, la lavorazione, la conservazione e il trattamento, finalizzate ad assicurare l'efficacia terapeutica e la sicurezza d'uso.
- **Validazione:** la produzione di prove documentate, in grado di garantire con un elevato livello di certezza che determinati procedimenti, attrezzature o ambienti diano luogo a un prodotto conforme alle specifiche e alle caratteristiche qualitative prestabilite; un procedimento è convalidato al fine di valutare se un sistema funziona efficacemente in rapporto all'impiego previsto

SEZIONE B

REQUISITI ORGANIZZATIVI GENERALI DELLA UNITA' DI PROCESSAZIONE

1. Identità istituzionale

Lo scopo della Unità di Processazione deve essere chiaramente stabilito e documentato.

Deve avere organizzazione, strutture e procedure operative adeguate alle attività per cui è stata identificata e descritta nel relativo Manuale della Qualità. Si raccomanda che l'Unità abbia un proprio Comitato scientifico che fornisca consulenze tecniche e scientifiche.

2. Organizzazione della Unità di Processazione

2.1. Responsabile dell'Unità

Ciascuna Unità di Processazione designa un responsabile che soddisfi le seguenti condizioni e possieda le seguenti qualifiche minime:

- possesso di un diploma di laurea nel settore delle scienze mediche o biologiche rilasciato al termine di un corso di studi universitari
- esperienza pratica di almeno tre anni nei settori pertinenti.

Procedure e regolamenti della Unità di Processazione devono essere prodotti sotto la sua supervisione.

Il Responsabile:

- assicura che il prelievo degli organi, la processazione, i controlli di qualità, lo stoccaggio e la distribuzione dei preparati cellulari siano eseguiti nel rispetto della legislazione vigente e delle presenti linee guida.
- è garante della validazione dei preparati cellulari e dell'avviamento delle procedure in caso di reazioni ed eventi avversi.

Interagisce inoltre con il Centro di Trapianto, al fine di garantire il rispetto delle procedure per la preservazione delle cellule in tutte le fasi immediatamente pre-trattamento.

Se il Responsabile non è un medico, dovrà essere identificato un laureato in medicina quale responsabile dell'idoneità medica delle cellule, delle attività cliniche della Unità di Processazione e la valutazione clinica dei risultati dei tessuti utilizzati.

2.2 Personale

Il personale operante nella Unità deve essere di numero sufficiente e qualificato per i compiti da svolgere. Il mantenimento dei livelli di competenza del personale deve essere valutata ad intervalli adeguati precisati nel sistema di qualità.

I mansionari di tutto il personale devono essere chiari, documentati e aggiornati. I relativi compiti, competenze e responsabilità devono essere ben documentati e compresi.

Deve essere definito un organigramma che indichi chiaramente i rapporti in materia di responsabilità.

2.2.1 Addestramento del personale

Tutti i membri del personale devono possedere un adeguato addestramento iniziale e devono adeguare la propria competenza al progresso scientifico e tecnico attraverso la partecipazione a corsi di aggiornamento, ad incontri tecnici o ad altri programmi formativi documentabili. Tutto il personale dovrà conoscere ed aggiornarsi periodicamente sulla normativa di riferimento e sulle procedure applicative.

Il programma di addestramento deve assicurare e documentare

- che ogni soggetto è competente per i compiti che gli sono affidati,
- che ha una conoscenza e comprensione adeguata del processo tecnico-scientifico inerente i propri compiti,
- che ha compreso l'organizzazione, il sistema di qualità e le norme di sicurezza della struttura in cui lavora
- e che è adeguatamente informato sul contesto etico e legale del proprio lavoro.

3 Gestione della Qualità

Il Responsabile dell'Unità di Processazione stabilisce e mantiene un programma di Gestione della Qualità che garantisca che l'attività complessiva sia conforme alle presenti linee guida, ai manuali tecnici e ai manuali di procedura propri dell'istituzione (POS).

A tale scopo deve essere identificato un Responsabile del programma di Gestione della Qualità che non sia direttamente coinvolto nelle attività di processazione della Unità.

Il sistema di gestione della qualità deve comprendere un manuale e/o procedure operative standard (POS) che descrivano tutte le attività critiche, comprese le politiche per la qualità, i manuali di formazione del personale, schede per la gestione della strumentazione/attrezzature, e deve prevedere inoltre documenti, moduli, schede e registrazioni. La documentazione e le procedure devono essere periodicamente verificate e aggiornate dal responsabile qualità, per l'adeguamento alle modifiche dell'attività o ai requisiti di leggi e norme. Deve esserci una procedura di controllo dei documenti che garantisca che venga utilizzata solo la versione in corso. Copie del manuale e delle procedure devono essere disponibili per tutto il personale e, dietro richiesta, per tutti coloro che sono autorizzati ad ispezionare la Unità di Processazione. Una copia di riferimento deve essere conservata a cura del Responsabile della Unità di Processazione.

Le procedure devono garantire la standardizzazione dell'attività svolta e la rintracciabilità in tutte le sue fasi.

Tutte le registrazioni critiche per la sicurezza e la qualità dei prodotti devono essere conservate per almeno 30 anni, e l'accesso deve essere regolamentato e ottemperare alle prescrizioni di riservatezza.

Deve essere predisposta una procedura che garantisca che, in caso di cessazione dell'attività della Unità di Processazione, gli eventuali prodotti cellulari stoccati siano trasferiti ad altra banca identificata, compresi i dati sulla rintracciabilità ad essi collegati e quelli relativi alla qualità e sicurezza.

Devono essere predisposti procedimenti di verifica del funzionamento del sistema di gestione della qualità per garantirne il progresso costante e sistematico.

4. Produzione

L'Unità di Processazione produrrà cellule con finalità di trattamento nel paziente attenendosi scrupolosamente alle procedure standard approvate e riportate nei manuali (POS).

L'Unità deve tenere un manuale delle POS che descriva in dettaglio tutti gli aspetti delle fasi della processazione, dei controlli di qualità dei preparati, della coltura, del rilascio. Il Manuale delle POS deve inoltre descrivere le norme per l'accesso ai locali di produzione degli organi, dei reattivi, dei materiali, il loro stoccaggio e le procedure per la manutenzione e il controllo periodico di tutta la strumentazione utilizzata nel processo. Sono parte integrante del manuale delle POS il piano per la pulizia dei materiali, degli ambienti ed il relativo calendario di controllo periodico. Il manuale contiene le istruzioni riguardanti tutta la documentazione che deve accompagnare le cellule rilasciate dalla Unità. Tutte queste POS devono, ogniqualvolta necessario, essere modificate ed approvate dal responsabile della Unità di Processazione. Il manuale delle POS deve essere disponibile a tutto il personale e a tutti coloro che sono autorizzati all'ispezione dietro richiesta. Il manuale delle POS deve essere disponibile per la consultazione in ogni momento in un locale attiguo alla zona di produzione ed una copia di riferimento (master copy) deve essere conservata a cura del responsabile dell'Unità di processazione.

5. Documentazione

5.1 Generalità

La documentazione deve essere riservata, accurata e completa.

Tutte le registrazioni devono essere leggibili ed indelebili. Possono essere manoscritti o avvalersi di altro sistema convalidato, compreso supporto elettronico. In questo caso devono essere prese tutte le misure di sicurezza contro gli accessi esterni e gli attacchi di eventuali virus e deve essere prevista una procedura di back up giornaliera e comunque tale da evitare la perdita dei dati.

L'esecuzione di ogni fase del processo: prelievo, preparazione, test di laboratorio, deposito, distribuzione e trapianto delle cellule deve essere documentata, in maniera tale che ogni passaggio possa essere chiaramente rintracciato e sia identificata la persona che ha svolto il lavoro, inclusi i dati di diverse unità operative, e mostrare i risultati dei test così come l'interpretazione dei risultati, i dati relativi ai prodotti o materiali che vengono a contatto con le cellule.

La documentazione deve essere dettagliata in modo che sia possibile una chiara comprensione di ogni passaggio eseguito e deve essere disponibile per

ispezioni su richiesta da parte di soggetti autorizzati entro i limiti di riservatezza medico-legale.

L'accesso alla documentazione e ai dati deve essere limitato ai soggetti autorizzati dalla persona responsabile, nonché all'autorità competente, a fini di applicazione di misure di ispezione e di controllo. Tutta la documentazione concernente la storia del donatore e le informazioni di processazione del prodotto cellulare deve essere messa a disposizione, su richiesta, del chirurgo responsabile del trapianto, ad eccezione di quelle informazioni che infrangono la riservatezza relativa al donatore. La documentazione attestante la conformità del prodotto cellulare (in termini di sicurezza e qualità) rispetto ai requisiti fissati deve accompagnare le cellule distribuite ai Centri di Trapianto.

Devono essere definite procedure volte a risolvere le divergenze tra dati tra loro contrastanti.

5.2 Rintracciabilità

Ad ogni preparato di cellule deve essere assegnata una sigla ed un numero identificativo unico che servirà per identificare il materiale durante tutti i passaggi, dal prelievo fino alla distribuzione ed al trapianto; questi sigla e numero unico devono mettere in relazione il preparato con il donatore. Il codice utilizzato deve riportare identificazione della donazione (con numero unico della donazione e identificazione della banca) e identificazione del prodotto (codice prodotto e data di scadenza).

In particolare, per ogni donatore, i Centri di Riferimento Regionali sono tenuti a registrare tutta la documentazione relativa al prelievo e all'utilizzo. Possono delegare in tal senso la Unità di Processazione .

5.3 Protezione dati e riservatezza

Devono essere adottate tutte le misure necessarie per assicurare che tutti i dati raccolti, comprese le informazioni genetiche, e a cui abbiano accesso terzi siano resi anonimi in modo tale che né il donatore né il ricevente siano identificabili.

Devono quindi essere adottate misure di protezione dei dati e misure di salvaguardia per prevenire aggiunte, soppressioni o modifiche non autorizzate dei dati negli archivi riguardanti i donatori e qualunque trasferimento di informazioni.

Non deve esservi alcuna divulgazione non autorizzata di informazioni garantendo al tempo stesso la rintracciabilità delle donazioni.

Deve essere garantito l'anonimato fra donatore e ricevente.

5.4 Archivio

La documentazione relativa agli organi non processati, processati, eliminati e la documentazione relativa alla preparazione, all'utilizzo delle cellule o all'eliminazione, devono essere conservate per 30 anni.

6. Tutela della sicurezza e della salute del personale

E' compito del Responsabile della Unità di Processazione assicurare l'attuazione degli adempimenti previsti dal D.Lgs. 626/94 e norme collegate, ai fini della tutela della sicurezza e della salute del personale.

Nel manuale devono essere incluse le procedure e le precauzioni per mantenere un ambiente di lavoro sicuro che devono uniformarsi alla normativa europea, nazionale e locale.

E' necessario assicurare che il rischio inerente l'uso e la manipolazione del materiale biologico sia identificato e ridotto al minimo, pur mantenendo un livello di qualità e sicurezza dei tessuti adeguato allo scopo prefissato.

7. Strutture e attrezzature

7.1 Generalità

Le strutture adibite alla produzione di cellule per utilizzo clinico devono essere usate esclusivamente a tale scopo. Le strutture adibite ad operazioni ad essa collegate (sterilizzazione, stoccaggio, preparazione materiali, decontaminazione) possono essere in comune con altre strutture a finalità cliniche, fermo restando che deve essere evitata ogni sovrapposizione con attività, attrezzature e materiali usati (inclusi lo stoccaggio dei materiali) per sperimentazioni su cellule e tessuti animali. I locali devono essere di dimensione e di collocazione appropriate ed essere designati per gli scopi specifici per i quali verranno usati, mantenendo ben separate le zone per la produzione e coltura, quella per i controlli di qualità e quella per i lavaggi e lo stoccaggio dei materiali.

Le strutture devono essere mantenute pulite ed ordinate, da personale opportunamente addestrato, secondo un piano dettagliatamente specificato.

Tutto il materiale di scarto deve essere eliminato in accordo con le regole di smaltimento di materiale biologico potenzialmente infetto

7.2 Requisiti delle strutture

Tutti i locali devono essere mantenuti a temperatura costante e pressione d'aria controllata; l'ambiente deve essere controllato periodicamente al fine di prevenire le contaminazioni e garantire una qualità costante della produzione.

I locali della Unità di Processazione sono a contaminazione controllata con ambienti a pressione positiva rispetto all'esterno; essi devono essere dotati di sistemi filtranti terminali con flusso di aria turbolento (filtri assoluti) per ridurre al minimo la carica microbica nell'ambiente di fondo. L'ambiente di fondo a riposo deve mantenere una qualità dell'aria con numeri di particelle e numeri di colonie microbiche equivalenti a quelli di grado B di cui alla Guida europea alle buone pratiche di fabbricazione (Good Manufacturing Practices: GMP), allegato 1 e alla direttiva 2003/94/CE della Commissione¹, mentre nelle 2 cappe biohazard con flusso d'aria unidirezionale laminare il livelli di pulizia dell'aria deve essere di grado A.

7.3 Controllo dell'accesso

L'ingresso ai locali di produzione deve essere rigorosamente limitato alle sole persone direttamente coinvolte nel processo o a visitatori autorizzati dal Responsabile, accompagnati da personale interno. L'accesso deve prevedere una vestizione specifica, che permetta di minimizzare le possibili contaminazioni dall'esterno e che salvaguardi la sicurezza personale.

I materiali e l'equipaggiamento, necessari all'isolamento e stoccati in altro locale, raggiungeranno i locali di produzione solo dopo essere stati privati dell'involucro più esterno, registrati e decontaminati opportunamente.

Le procedure per l'ingresso dei materiali e del personale devono essere accuratamente riportate nelle POS e facilmente consultabili da tutti. Un registro dell'accesso ai locali con nominativi, data e tempo di permanenza deve far parte della documentazione generale dell'Unità di Produzione e conservata insieme alle altre documentazioni.

7.4 Aree per lo stoccaggio

La struttura deve prevedere anche la presenza di un locale per lo stoccaggio dei materiali per l'isolamento, reattivi e/o equipaggiamento monouso, avente temperatura e caratteristiche idonee. Tali locali debbono prevedere la presenza di tre zone di stoccaggio:

- zona del materiale e/o dei reagenti idonei (in uso)
- zona del materiale e/o dei reagenti in fase di verifica (in quarantena)
- zona del materiale e/o dei reagenti non idonei (da scartare) dell'Unità di produzione.

Tali aree sono soggette al controllo dell'accesso da parte del personale.

7.5 Attrezzature

La progettazione e la manutenzione di tutte le attrezzature e i materiali devono corrispondere alle destinazioni previste e minimizzare ogni rischio per i riceventi e/o il personale.

Tutte le attrezzature e i dispositivi tecnici critici devono essere identificati e validati periodicamente ispezionati e preventivamente sottoposti a manutenzione conformemente alle istruzioni del fabbricante. Le attrezzature o i materiali che incidono su parametri critici di lavorazione o stoccaggio (ad esempio temperatura, pressione, numero di particelle, livello di contaminazione microbica) devono essere identificati ed eventualmente sottoposti a osservazioni, vigilanza, allarmi e interventi correttivi adeguati per individuarne le disfunzioni e i difetti e per garantire che i parametri critici rimangano costantemente al di sotto dei limiti accettabili. Tutte le attrezzature che dispongono di una funzione di misurazione critica devono essere tarate su un determinato parametro di riferimento, se disponibile.

Le attrezzature nuove e riparate devono essere controllate al momento dell'installazione e convalidate prima dell'uso. I risultati dei controlli devono essere documentati.

E' necessario procedere periodicamente alla manutenzione, alla pulizia, alla disinfezione e all'igienizzazione di tutte le attrezzature critiche e alle relative registrazioni.

Occorre disporre di norme di funzionamento per ogni attrezzatura critica, con indicazioni dettagliate di come intervenire in caso di disfunzioni o guasti.

Le Procedure Operative devono indicare dettagliatamente le specifiche di tutti i materiali e i reagenti critici. Devono essere in particolare definite le specifiche per gli additivi (ad esempio soluzioni) e i materiali d'imballaggio. I reagenti e i materiali critici devono corrispondere alle prescrizioni e alle specifiche documentate e, se del caso, alle prescrizioni della direttiva 93/42/CEE del 14 giugno 1993 concernente i dispositivi medici e della direttiva 98/79/CE del 27 ottobre 1998 relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

8. Sicurezza ambientale

8.1 Piano dell'Igiene

Il locale adibito alla processazione e tutti i locali attigui appartenenti alla Unità devono essere mantenuti ordinati, puliti e sanificati.

Il piano per l'igiene prevede che la zona di produzione sia fisicamente separata dalle altre e che l'accesso alla stessa sia limitato alle sole persone autorizzate, regolato in modo da permettere un progressivo aumento del livello di pulizia man mano che si avvicina alla zona di produzione. Ciò viene realizzato mantenendo l'area di produzione a pressione maggiore rispetto alle aree circostanti, realizzando l'accesso dei materiali e del personale in modo sequenziale attraverso aree a progressivo aumento del grado di pulizia secondo le POS.

Tutte le aree, le strumentazioni e i materiali riutilizzabili devono essere pulite e sanificate da personale qualificato secondo le procedure indicate nelle POS e periodicamente controllate.

8.2 Accesso del Personale

Il personale addetto deve conoscere le procedure da adottare nei locali dell'Unità e deve essere sottoposto a verifica delle sue conoscenze prima di poter ricevere l'autorizzazione a svolgere il proprio lavoro all'interno dell'Unità. Il personale deve accedere ai locali di produzione seguendo il percorso indicato a progressivo grado di pulizia, sottoporsi ad accurata pulizia delle parti esposte e indossare il materiale monouso per la vestizione che deve essere a disposizione, rispettando rigorosamente le indicazioni delle POS.

8.3 Accesso dei Materiali

I materiali utilizzati nei locali di produzione e di controllo di qualità devono essere privati dell'imballaggio esterno e decontaminati prima di accedere alla zona di produzione.

8.4 Igiene dei locali e delle superfici di lavoro e relativi controlli

Tutti i locali e le superfici di lavoro devono essere sottoposte quotidianamente ad accurata pulizia e decontaminazione con appropriate soluzioni disinfettanti secondo procedure descritte nelle POS.

Tutte le aree controllate dei laboratori dell'Unità devono essere sottoposte (ad intervalli di tempo regolari) a controlli di contaminazione ambientale riferiti a livelli di contaminazione microbica. I limiti di riferimento di questi livelli di contaminazione devono essere equivalenti a quelli indicati dalla normativa GMP e sono ripresi nelle POS con l'indicazione specifica della cadenza con cui tali controlli devono essere effettuati.

8.5 Igiene della strumentazione e dei materiali e relativi controlli

La strumentazione che viene utilizzata durante l'isolamento deve essere sterilizzata ove sia possibile o decontaminata dopo ogni utilizzo.

I materiali riutilizzabili devono essere accuratamente decontaminati, puliti dopo ogni utilizzo e mandati ad opportuna sterilizzazione.

E' importante ricordare che per tali materiali si deve provvedere una validazione delle procedure di lavaggio e di sterilizzazione. A tale scopo deve essere valutata la presenza residua di tensioattivi anionici, ionici e non ionici sulle superfici di questi materiali così come devono essere posti indicatori di avvenuta sterilizzazione sui materiali in uscita da processi di sterilizzazione.

8.6 Raccolta dei rifiuti

Tutto il materiale di origine umana deve essere trattato dal personale come potenzialmente infetto e come tale il materiale di scarto deve essere raccolto in modo tale da minimizzare i rischi per il personale dell'Unità o l'ambiente e devono uniformarsi alla regolamentazione europea, nazionale e locale.

8.7 Piano della Sicurezza

L'attuazione del piano d'igiene garantisce la sicurezza dell'operatore e del prodotto in termini di malattie trasmissibili e contaminazione da patogeni.

Deve esistere anche un programma e procedure atte a garantire la sicurezza del personale anche nell'utilizzo della strumentazione.

La sicurezza per quanto attiene all'affidabilità della strumentazione e degli impianti siti nella Unità viene garantita attraverso piani di verifica periodica effettuati da personale qualificato e secondo procedure validate.

9. Collaborazioni esterne

9.1 Idoneità delle strutture in rapporto di collaborazione

Qualora la Unità non disponga di tutte le attrezzature organizzative e di laboratorio necessarie ad una ottimale processazione o distribuzione del prodotto cellulare, che ne consentano il migliore utilizzo clinico, potrà avvalersi per le procedure mancanti, ma non per l'intero processo, di strutture esterne pubbliche o private. Il ricorso a strutture esterne potrà avvenire anche nel caso di impossibilità temporanea, strutturale e/o organizzativa, da parte della Unità di condurre tutte le operazioni previste. Tale collaborazione sarà regolamentata da apposite convenzioni o mediante contratti.

Le metodologie operative di laboratori e strutture di cui al precedente punto devono garantire i requisiti qualitativi definiti dalla Unità.

Il Responsabile della Unità di Processazione deve garantire che tutto il personale delle strutture terze coinvolto nelle attività effettuate per conto della

Unità di Processazione, sia a conoscenza della normativa di riferimento e del contenuto delle presenti linee guida, e che operi in ottemperanza ad esse

9.2 Controllo

Il Responsabile deve poter controllare l'attività delle strutture organizzative e/o dei laboratori esterni, acquisire e conservare la certificazione sulla perfetta corrispondenza delle attività svolte alle disposizioni contenute nelle presenti linee guida e al manuale delle procedure.

10. Misurazioni, analisi e miglioramento

L'Unità di processazione si prefigge lo scopo di produrre:

- a) epatociti che soddisfino al criterio della "utilizzabilità in vivo" sia in extracorporeo (BAL) che come trapianto, quindi in numero adeguato al peso corporeo del ricevente, vitali, con purificazione superiore al 90%, sterili
- b) isole pancreatiche per trapianto vitali, in numero adeguato al peso corporeo del ricevente, con purificazione superiore al 20%, sterili.

Il rapporto tra organi processati e procedure di trapianto effettuate rappresenta un parametro per analizzare l'efficacia delle procedure di processo attuate e la qualità generale della Unità di Processazione.

Nel caso in cui la percentuale di successo della Unità di Processazione si discosti significativamente da quella media o da quella auspicata dal Centro di Riferimento Regionale, è compito del responsabile della Unità di Processazione analizzare i problemi e stabilire le misure correttive.

SEZIONE C

PRELIEVO

1. Premesse

Devono essere definite Procedure Operative Standard per tutte le fasi del prelievo, dall'identificazione del donatore al trasporto dei tessuti alla Unità di Processazione,

2. Autorizzazione e consenso al prelievo

Deve essere seguita la legge nazionale e i regolamenti che governano la manifestazione di volontà alla donazione, l'approvvigionamento di organi provenienti da donatori cadavere (Legge 1 aprile 1999, n 91 - Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e di tessuti).

La manifestazione di volontà alla donazione deve essere accertata secondo le norme stabilite dalla legislazione vigente.

Deve essere strettamente mantenuto l'anonimato di donatore e ricevente.

La rintracciabilità di organi e preparati viene garantita mediante l'utilizzo di sigle e codici di identificazione.

3. Accertamento di morte

L'accertamento di morte del donatore cadavere è effettuato ai sensi della Legge 29 dicembre 1993 n. 578 e del decreto del Ministro della Sanità 22 agosto 1994 n. 582.

4. Idoneità del donatore

4.1. Valutazione dell'idoneità generale del donatore

L'idoneità alla donazione di pancreas o fegato dovrà basarsi sulla storia medica e sociale, sullo stato clinico, sull'esame fisico, sui risultati degli esami sierologici effettuati sul sangue prelevato e sull'autopsia, se effettuata

La raccolta di notizie approfondite della storia medica/sociale/sexuale del potenziale donatore deve essere effettuata da parte di personale competente.

Se il personale che effettua la selezione del donatore non fa parte della Unità di Processazione devono esservi accordi scritti riguardo alle procedure da seguire per la valutazione del donatore, la tipologia dei tessuti ed i campioni di sangue da prelevare in conformità con le presenti linee guida.

Per quanto riguarda l'anamnesi, le domande poste sotto forma di questionario o di intervista verranno rivolte ai familiari, al medico curante o ad altra fonte attendibile ed esauriente.

Devono inoltre essere prese in considerazione le informazioni contenute nella cartella clinica, gli esiti degli accertamenti effettuati, i risultati degli esami di laboratorio eseguiti.

Le fonti delle informazioni devono essere specificate nella documentazione di accompagnamento dell'organo prelevato.

4.2. Cause generali di esclusione dalla donazione

Le seguenti condizioni costituiscono una causa di esclusione assoluta alla donazione:

- causa di morte sconosciuta.
- patologia ad eziologia sconosciuta
- storia, evidenza clinica o di laboratorio di infezione in atto da HIV, HBV o HCV o ittero di eziologia sconosciuta
- soggetti con fattori di rischio per HIV, HBV o HCV:
 - soggetti con comportamenti sessuali a rischio negli ultimi 12 mesi
 - prostituzione negli ultimi 12 mesi
 - uso e.v, i.m. o s.c. di droghe negli ultimi 12 mesi
 - soggetti emofilici sottoposti a infusione di fattori della coagulazione di origine umana
 - esposizione percutanea o attraverso ferite aperte o mucose a sangue potenzialmente infetto da HIV, HBV o HCV nei 12 mesi precedenti
 - soggetti in emodialisi cronica
 - soggetti che hanno trascorso un periodo di detenzione carceraria negli ultimi 12 mesi
 - malattie veneree diagnosticate o trattate negli ultimi 12 mesi
 - tatuaggi, piercing o agopuntura negli ultimi 12 mesi, se non eseguiti con materiale sterile, monouso
 - partners di soggetti con rischio di infezione da HIV, HBV o HCV, come precedentemente definito, negli ultimi 12 mesi
- Infezioni sistemiche che non sono state controllate al momento della donazione, comprese malattie batteriche e infezioni sistemiche virali, fungine e parassitarie
- soggetti con fattori di rischio per malattie da prioni:
 - soggetto o familiare con m. di Creutzfeldt-Jakob, o variante di m. di Creutzfeldt-Jakob
 - presenza di demenza o malattie croniche degenerative centrali ad eziologia sconosciuta (m. di Alzheimer, sclerosi multipla, sclerosi laterale amiotrofica, panencefalite acuta sclerosante, m. di Parkinson, leucoencefalite multifocale progressiva)
 - soggetti che hanno utilizzato ormoni di derivazione ipofisaria, o allotrapianto di dura madre o siano stati sottoposti ad interventi intracranici non specificati
 - soggetti sottoposti ad intervento chirurgico o trasfusione di sangue o emoderivati in Gran Bretagna negli anni dal 1984 al 1996
- sindrome di Reye
- neoplasia maligna in atto o precedente – fanno eccezione:
 - il carcinoma basocellulare
 - il carcinoma in situ della cervice uterina
 - il carcinoma in situ delle corde vocali
 - il carcinoma in situ della vescica
- soggetti sottoposti a trapianto di organo o tessuto oculare o xenotrapianto
- ingestione o esposizione a sostanza tossica che può essere trasmessa in dose nociva (p.es. cianuro, piombo, mercurio, oro)

- storia di trattamenti farmacologici scopo immunosoppressivo
- chemioterapia o terapia radiante
- vaccinazione con virus vivo attenuato (morbillo, rosolia, parotite, varicella, febbre gialla e vaiolo) nelle quattro settimane antecedenti alla donazione
- Rischio di trasmissione di patologia infettiva legato a viaggi o esposizione ad agente infettivo
- malattie emopoietiche quali: gammopatie monoclonali, mielodisplasia, policitemia vera

4.3. Requisiti supplementari di esclusione del donatore di pancreas finalizzato alla preparazione di isole pancreatiche

Deve inoltre essere escluso:

- L'abuso e/o la dipendenza da alcolici di lunga durata.
- precedenti malattie del pancreas in grado di comprometterne l'integrità morfostrutturale
- diabete mellito di tipo 1
- traumi addominali con grave compromissione del pancreas
- Pancreatite acuta (si pone il limite superiore di amilasi seriche di un donatore idoneo al prelievo a 3 volte il valore massimo del range di riferimento).
- Età inferiore ai 18 anni e superiore ai 65

5. Ispezione fisica del donatore

Prima del prelievo il corpo del donatore deve essere esaminato per evidenziare eventuali segni sufficienti di per sé a escludere il donatore, se nell'esame vengono riscontrate condizioni che possano richiederlo si dovrà procedere ad un approfondimento dell'anamnesi, all'esecuzione di adeguati esami di laboratorio o strumentali al fine di escludere la presenza di controindicazioni alla donazione.

La completezza dell'indagine anamnestica e dell'esame obiettivo devono essere sottoscritte da un medico responsabile della valutazione dell'idoneità del donatore.

6. Esame autoptico

Nel caso in cui venga effettuata un'autopsia, ciò deve essere tempestivamente comunicato alla Unità di Processazione.

Trasmissione scritta dei risultati deve avvenire non appena questi sono disponibili: prima che il tessuto sia messo a disposizione per la distribuzione il Responsabile della Banca o persona designata devono rivedere il referto dell'autopsia o, se i tempi non lo consentono, almeno un risultato preliminare della stessa.

7. Test sierologici

I potenziali donatori devono essere testati in relazione a malattie trasmissibili in conformità con il presente documento.

Devono essere effettuati i test su campioni di sangue del donatore. I test devono essere effettuati da un laboratorio accreditato.

Tutti i campioni di sangue devono essere prelevati prima della perfusione del donatore.

Se il donatore è stato sottoposto a trasfusioni di sangue, emocomponenti o plasma-expanders nelle 48 ore precedenti il prelievo del campione ematico e non è possibile effettuare i test su di un prelievo precedente alle infusioni, i risultati devono essere valutati tenendo conto della diluizione: se la diluizione è superiore al 50% il risultato non è attendibile ed il donatore è da considerarsi quindi non idoneo.

Nella documentazione di accompagnamento dei tessuti deve essere specificato che il campione non supera i livelli di diluizione indicati, o devono essere comunicati tutti i parametri necessari per calcolare tale dato.

7.1 Laboratori di analisi

I test devono essere effettuati da un laboratorio qualificato, che deve osservare le seguenti raccomandazioni per quanto riguarda gli accertamenti per i soggetti potenzialmente donatori di tessuti:

- adozione di procedure informatiche per il trasferimento dei risultati dagli strumenti di misura al sistema gestionale informatico di laboratorio , eliminando trascrizioni manuali dei risultati
- adozione di procedure informatiche e/o strumenti grafici utili alla messa in evidenza dei risultati che determinino inidoneità assoluta del donatore (grassetto, maiuscolo, sottolineato, etc.)
- indicazione nel referto, oltre alla valutazione positivo/negativo, del valore numerico prodotto dallo strumento e della relativa soglia di positività
- controllo da parte di 2 operatori della congruità dei risultati strumentali con i risultati repertati, producendo un referto a doppia firma

7.2 Archivio sieri

I sieri di tutti donatori devono essere opportunamente identificati e devono essere conservati adeguatamente sigillati ad una temperatura adeguata (<40°C) in un archivio per almeno 25 anni dall' utilizzo del tessuto.

7.3 Test sierologici obbligatori

In caso di positività ad uno dei seguenti test obbligatori, il soggetto risulta non idoneo alla donazione e le cellule non possono essere utilizzate per il trapianto:

- antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg)
- anticorpi al virus dell'epatite C (HCV)
- anticorpi anti HIV 1 e 2
- TPHA/VDRL
- anticorpi anti-HTLV-I e II, per soggetti originari di aree endemiche.

E' obbligatorio effettuare inoltre la ricerca degli anticorpi anti antigene c dell'epatite B (HBcAb): se il risultato è positivo, in assenza di HBsAg, deve essere eseguita la ricerca degli anticorpi anti antigene s dell'epatite B (HBsAb). Se HBsAb è positivo, il donatore è idoneo. Se HBsAb è negativo, deve essere effettuata la ricerca di HBV DNA. Se questa risulta negativa con un test in grado di rilevare almeno 50 UI/ml, i tessuti possono essere utilizzati per trapianto.

Nel caso in cui venissero eseguiti, in aggiunta alle sierologie obbligatorie, anche indagini NAT per HIV, HBV e HCV, il periodo finestra da considerare per i fattori di rischio di cui al punto 5.2 può essere ridotto a 6 mesi.

SEZIONE D

PRELIEVO

1. Prelievo del pancreas o del fegato

Il prelievo deve essere effettuato da donatore cadavere a cuore battente (morte cerebrale).

Prima del prelievo il medico che lo esegue deve effettuare l'identificazione del donatore, accertarsi che sia stata verificata l'idoneità del donatore sulla base dei criteri prima indicati e sia stata accertata la manifestazione di volontà alla donazione.

Qualora il donatore sia sottoposto ad autopsia, il risultato della stessa, se rilevante, deve essere comunicato tempestivamente alla Unità di Processazione.

2. Modalità di prelievo

Il prelievo deve essere effettuato in condizioni di asepsi, secondo le modalità con cui si svolge un intervento chirurgico.

L'équipe deve essere di norma formata da due operatori tra cui un medico prelevatore.

Il prelievo deve essere effettuato in sala operatoria o in altra sala che possa mantenere lo stesso indice di pulizia per un tempo adeguato (6-8 ore) poiché di solito il prelievo è effettuato contestualmente al prelievo di altri organi.

Qualora il donatore sia sotto la tutela della magistratura o di un medico legale, il permesso deve essere chiesto a questi ultimi.

La rimozione di dispositivi o apparecchi invasivi (cannule, sondini, cateteri) deve essere autorizzata dal Patologo.

Per il prelievo di fegato risulta necessario conservare 2-3 cm di vena porta utili per il suo incannulamento durante le procedure di isolamento epatocitario. La colecisti viene prelevata assieme al fegato e deve essere lavata con soluzione a freddo .

Il pancreas è rimosso immediatamente dopo l'epatectomia o dopo la perfusione fredda se il fegato non viene prelevato. Non vi è necessità di preservare l'assetto vascolare del pancreas. Il duodeno viene prelevato contestualmente alla testa pancreatico: i due monconi duodenali devono essere ben chiusi con una suturatrice lineare per evitare fuoriuscita di materiale enterico.

L'organo prelevato viene adagiato in una sacca sterile contenente soluzione di preservazione a temperatura fra 0°e +4° C. La sacca viene sigillata e quindi posta nella seconda sacca sterile contenente ghiaccio sterile che viene a sua volta richiusa e posta nella terza sacca su cui va apposta un'etichetta contenente i dati identificativi della donazione:

- nome o codice di identificazione del donatore
- organo prelevato
- data e ora di prelievo

- ospedale di prelievo
- indicazione della soluzione utilizzata per la conservazione durante il trasporto

L'organo così confezionato viene posto in un adeguato contenitore per il trasporto, contenente ghiaccio.

Al termine delle operazioni di prelievo la salma del donatore è ricomposta in modo da risultare più somigliante possibile all'originaria forma anatomica

3. Procedure finali e trasporto

Il medico prelevatore deve redigere il verbale del prelievo effettuato annotando data, ora, luogo e durata della procedura, i nominativi degli operatori e del donatore con conferma scritta della idoneità dello stesso al prelievo ed infine le sedi del prelievo.

I contenitori esterni per il trasporto devono recare un'etichetta che specifichi:

- origine umana del tessuto destinato al trapianto
- identificazione del Centro di Prelievo
- identificazione della Unità di Processazione

Il trasporto deve avvenire in modo che siano assicurati sia l'integrità del contenitore, sia il mantenimento di una temperatura di +2°C/+10°C all'interno

4. Documentazione di accompagnamento:

Gli organi devono essere inviati alla Unità di Processazione con la seguente documentazione:

- Verbale di prelievo con data, ora, luogo, i nominativi degli operatori e del donatore con firma leggibile del medico responsabile del prelievo
- dati identificativi del donatore con indicazione di chi ha identificato il soggetto e con quali modalità
- indicazione organi inviati
- lotto/identificazione soluzione di conservazione
- dichiarazione sottoscritta dal medico responsabile della valutazione dell'idoneità del donatore secondo le presenti linee guida che indichi l'assenza di criteri di esclusione dalla donazione, sulla base dell'indagine anamnestica e dell'esame obiettivo
- risultati dei test sierologici se disponibili

SEZIONE E

ISOLAMENTO DELLE CELLULE

1. Ricevimento

1.1. Verifiche all'arrivo

All'arrivo dell'organo presso la Unità, si devono eseguire controlli atti a verificare l'idoneità delle condizioni di trasporto e quindi dell'organo stesso. In particolare si dovrà verificare la integrità del contenitore esterno (eventuale lettura dell'unità di registrazione della temperatura), la presenza di una sufficiente quantità residua di ghiaccio, la presenza ed integrità dei sacchetti che contengono l'organo, (quello esterno con ghiaccio). Per ottenere un massimo recupero di cellule vitali è necessario ridurre quanto più possibile il tempo di ischemia fredda: non superiore a 16-18 h per il fegato e di 14 h per il pancreas.

L'organo viene quindi introdotto all'interno del locale per l'isolamento dove, sotto cappa, ne viene valutata l'integrità morfo-strutturale:

- a) Per il fegato devono essere valutati: la eventuale presenza di vaste aree parenchimali francamente emorragiche o necrotiche, il grado di conservazione degli accessi vascolari venosi ed arteriosi (vena porta ed arteria epatica) e la integrità della Glissoniana;
- b) per il pancreas deve essere verificata la chiusura dei due monconi duodenali.

Se l'organo è, in base ai criteri definiti nella relativa POS, ritenuto accettabile per la processazione, si preleva un campione della soluzione di conservazione per le prove di sterilità, e si prepara l'organo.

2. Procedure di isolamento

2.1. Terreni di coltura, soluzioni, reattivi e materiali

il terreno standard di isolamento delle isole è costituito da una soluzione salina contenente elementi nutritivi di base (glucosio, aminoacidi, sali minerali e vitamine) addizionata di antibiotici, siero umano, albumina, e priva di fattori di crescita

Il siero e tutte le altre soluzioni utilizzate durante il processo di isolamento, devono essere certificate come soluzioni con un contenuto di endotossine <0,25 EU/ml.

Le preparazioni destinate al trapianto devono essere esenti da componenti di origine animale (siero bovino). Devono essere utilizzati come supplementi solo sostanze proteiche di origine umana (albumina e siero umano).

Per proteggere i pazienti da ogni possibile effetto collaterale, che potrebbe essere causato dalla contaminazione durante il processo di produzione, tutti i reagenti e le soluzioni utilizzate nel processo che vengono a contatto con le isole, devono essere certificate per uso clinico, o laddove non sia reperibile sul mercato un prodotto con queste caratteristiche, preparate in accordo a POS specifiche in accordo con i principi delle Good Manufacturing Practice. In questo modo vengono applicate procedure di controllo della qualità che

assicurano livelli qualitativi necessari per l'applicazione della terapia nell'uomo (recepimento delle direttive 91/356/EEC)

Le uniche eccezioni sono rappresentate dagli enzimi usati per la digestione del pancreas, la cui produzione ancora in molti casi non è ben standardizzata, migliorabile e non eseguita secondo le indicazioni GMP. Devono tuttavia essere specificate le caratteristiche critiche per la sicurezza e la qualità degli enzimi.

I terreni, i reagenti, i materiali, la processazione del pancreas, la purificazione, la coltura e la distribuzione delle isole isolate devono essere appropriati al processo da svolgere e sterili. I terreni, i reagenti e contenitori devono essere corredati da certificati di sterilità e di qualità forniti dalle Ditte produttrici. In caso contrario è richiesta documentazione pubblicata su riviste nazionali o internazionali o su linee guida approvate o dopo approvazione del Comitato Scientifico.

I materiali usati per la costruzione di dispositivi impiegati durante l'isolamento devono essere appropriati all'uso e certificati.

La ditta produttrice, le caratteristiche, il numero di lotto, codice, data di produzione e/o scadenza devono essere registrati su schede di un opportuno registro ad uso interno. Queste informazioni dovranno essere accuratamente registrate sulla scheda di ciascun isolamento.

2.2. Preparazione di isole pancreatiche

Il pancreas, prelevato sterilmente dal contenitore di trasporto, viene separato dal tratto di duodeno e decontaminato e successivamente privato delle componenti grasse e fibrose, ponendo attenzione a non danneggiare l'integrità dell'organo.

Tutte le operazioni di pulizia dell'organo sono eseguite a bassa temperatura, con l'ausilio di ghiaccio sterile e utilizzando soluzioni conservate in frigorifero. Una volta pulito e pesato il pancreas è perfuso a temperatura di 4°C con l'enzima ricostituito in un volume noto di soluzione salina bilanciata. L'organo perfuso verrà posto all'interno della camera di digestione dove, sottoposto all'azione meccanica ed enzimatica, verrà disgregato fino ad ottenere un preparato di isole pancreatiche, dotti e tessuto acinare.

Le operazioni di pulizia, perfusione e digestione dell'organo avverranno in condizioni asettiche, sotto cappa a flusso laminare.

La purificazione della componente endocrina da quella esocrina avviene grazie alla diversa densità delle isole isolate dalla restante componente esocrina/duttale. Le isole sono poste in opportuno gradiente di densità e sottoposte a centrifugazione all'interno di un separatore cellulare. I gradienti di densità possono essere continui o discontinui, a seconda delle caratteristiche dei preparati e dei protocolli in uso nei laboratori. Al termine della procedura, le isole che si stratificano in uno degli strati a bassa densità, sono raccolte e lavate in soluzioni adeguate.

Le operazioni di purificazione della componente endocrina devono avvenire in condizioni asettiche, sotto cappa a flusso laminare verticale e all'interno del separatore cellulare in sacche sterili monouso.

2.2.1. Coltura delle isole isolate

Le isole pancreatiche purificate e accuratamente lavate vengono conservate in incubatori in condizioni controllate di temperatura, umidità e CO₂. Tali parametri devono essere continuamente controllati, monitorati e registrati, per dimostrarne la conformità alle condizioni previste.

E' necessario utilizzare le isole entro 96 ore dall'isolamento; questo limite di tempo è fissato dalla necessità di mantenere funzionalità residua sufficiente. La conservazione di isole pancreatiche per un tempo maggiore va convalidata mediante la dimostrazione della conservazione della vitalità insulare.

2.2.2. Controllo di qualità

Devono essere eseguiti test e procedure per valutare la quantità e la qualità del preparato isolato.

I dati ottenuti vanno opportunamente registrati.

2.2.3. Valutazione della massa totale di isole pancreatiche isolate

Per ciascun isolamento deve essere valutato il numero equivalente (NE) di isole pancreatiche isolate.

Dalla preparazione finale purificata si preleva un campione di volume noto. Mediante colorazione , specifica per le isole pancreatiche, è possibile effettuare un conteggio al microscopio, diversificato per diametro, del numero di isole nel campione, e attraverso il fattore di diluizione risalire al numero di isole totali della preparazione (NA = numero assoluto).

metodo di conta diretta

Il numero assoluto di isole è convertito in numero equivalente (NE) tramite una conversione di ciascuna classe di isole, in isole da 150 µm di diametro secondo i seguenti fattori di conversione (n è il numero di isole di ciascuna classe):

range diametro isola (µm)	volume medio isola (µm ³)	fattore di conversione in NE
50-100	294,525	n/6
100-150	1145,373	n/1,5
150-200	2977,968	n*1,7
200-250	6185,010	n*3,5
250-300	11159,198	n*6,3
300-350	18293,231	n*10,4
>350	27979,808	n*15,8

In questo modo è possibile convertire il numero assoluto di ciascuna preparazione in numero equivalente che, ottenuto correggendo il NA con coefficienti basati sul volume delle isole, rappresenta una stima della massa β cellulare ottenuta. In questo campione è possibile inoltre stimare la purezza della preparazione (intesa come percentuale di isole sulla totalità del tessuto). Il valore minimo di purezza accettabile è 20%.

La procedura deve essere eseguita da personale qualificato, utilizzando un microscopio ottico, con oculare provvisto di griglia calibrata.

I dati ottenuti vanno opportunamente registrati sulla documentazione relativa all'isolamento.

2.2.4. Valutazione della vitalità

Deve essere valutata la percentuale di cellule vitali rispetto alle necrotiche, in modo da conoscere la vitalità della preparazione destinata al trapianto. Le modalità di valutazione devono essere specificate nelle procedure operative di ciascuna Unità di Processazione.

2.3. Isolamento di Epatociti

Gli epatociti vengono isolati con una metodica enzimatica (collagenasi) che prevede la perfusione del parenchima epatico attraverso la vena porta (o i suoi rami) con diverse soluzioni ossigenate e tamponate. Tali soluzioni vengono utilizzate sequenzialmente ed hanno lo scopo congiunto di lavare/pulire (con antibiotico), arricchire di substrati energetici e dissociare/digerire il fegato. Al termine della fase di digestione il parenchima epatico viene frammentato per digitoclasia e le cellule ottenute vengono filtrate attraverso filtri da 500 e 250 micron. Le operazioni di pulizia, perfusione e digestione dell'organo devono avvenire in condizioni asettiche.

2.3.1. Raccolta e lavaggio degli epatociti

Il tessuto digerito viene raffreddato e raccolto in uscita dai filtri mediante sacche a circuito chiuso e terreno completo, tamponato e ricco in aminoacidi. Sempre utilizzando una metodica a circuito chiuso in sacche le cellule vengono lavate 2-3 volte con medium completo specifico (mantenuto a temperatura di 2°C circa).

2.3.2. Congelamento e stoccaggio

Dopo i lavaggi una piccola quota di cellule viene prelevata per un test di vitalità che si ritiene accettabile al di sopra del 70%. Le modalità di valutazione devono essere specificate nelle procedure operative di ciascuna Unità di Processazione.

Dopo l'ultimo lavaggio le cellule vengono risospese ad una opportuna concentrazione in una soluzione idonea e su questa sospensione si eseguono i prelievi per i controlli microbiologici (aerobi, anaerobi, miceti). Si aggiunge quindi, lentamente, un ugual volume di soluzione criopreservante sterile costituita dallo stesso tampone, da plasma umano (decomplementarizzato e filtrato) al 40% e da dimetilsolfossido (DMSO) sterile al 20%.

Sempre con metodica sterile a circuito chiuso si trasferiscono le cellule nelle sacche per criopreservazione (100 ml ognuna) che, dopo la procedura di congelamento programmato (in congelatore programmabile a gas di azoto), vengono immerse e stoccate in azoto liquido.

2.3.3. Scongelamento

Lo scongelamento avviene rapidamente attraverso la immersione delle sacche criopreservate in un bagno a 37°C (in sacchetto di protezione). Immediatamente dopo lo scongelamento le cellule vengono lentamente diluite con soluzione salina tamponata prima iper e poi isotonica fredda. Si eseguono quindi 2 lavaggi, si risospendono quindi le cellule ad una opportuna concentrazione e si eseguono i prelievi per la vitalità ed i controlli sotto descritti.

2.3.4. Coltura degli epatociti isolati

Una quota di cellule prelevata prima delle procedure di criopreservazione e una ottenuta dopo lo scongelamento vengono poste in coltura su collagene per verificare, a 12 e 24 ore, caratteristiche morfologiche e metaboliche specifiche degli epatociti differenziati e vitali.

2.3.5. Controllo di qualità

Devono essere eseguiti gli esami e le procedure per valutare la quantità e la qualità del preparato isolato. I dati ottenuti vanno opportunamente registrati.

2.3.6. Valutazione della preparazione degli epatociti isolati

A distanza di circa 1 ora dall'isolamento (eventualmente dopo un recupero a 37°) viene valutata la vitalità degli epatociti in sospensione attraverso 2 test colorimetrici/fotometrici. Contestualmente si verifica la integrità di alcune strutture cellulari fondamentali e la purezza della sospensione cellulare che deve essere >90%.

Si quantifica la analisi morfologica con un punteggio e un cut off per la classificazione ed accettabilità della preparazione (in accordo con la letteratura ed il comitato scientifico).

I dati ottenuti vanno opportunamente registrati sulla documentazione relativa all'isolamento.

3. Controllo della sterilità

Il tempo che intercorre tra la fine dell'isolamento e il trapianto della preparazione, non è tale da permettere il rilascio di un referto di sterilità microbiologica da parte del laboratorio preposto alle analisi , referto che pertanto sarà disponibile solo a trapianto avvenuto.

Deve essere comunque attivata una procedura affinché in caso venga rilevata una positività (anche prima del rilascio del referto), questa venga tempestivamente comunicata al responsabile della Unità di Processazione che a sua volta avvertirà la Struttura di Trapianto per le opportune azioni correttive.

3.1. Controlli microbiologici

Tutte le procedure di lavorazione dell'organo e di preparazione delle soluzioni e reagenti devono avvenire in ambienti controllati al fine di garantire la conservazione della sterilità. A tale scopo, devono essere messi in coltura campioni rappresentativi delle preparazioni finali che verranno somministrate ai pazienti.

L'Unità di Processazione deve definire l'elenco dei controlli microbiologici da effettuarsi su campioni della preparazione finale, che dovranno comprendere almeno aerobi, anaerobi e miceti.

3.1.1. Altri parametri

Viene autorizzato lo stoccaggio di campioni biologici di ogni preparazione, al fine di una analisi retrospettiva di eventuali parametri di qualità che dovessero diventare disponibili in un secondo momento.

I campioni sono conservati a -80°C in diverse aliquote per campione.

4. Rilascio delle cellule

Ogni preparato di cellule deve essere corredato di apposito certificato di rilascio nel quale deve essere espressamente indicato che il preparato soddisfa ai criteri di rilascio predefiniti dalla Unità di Processazione.

4.1. Parametri di Rilascio di isole pancreatiche

Devono essere considerati i seguenti parametri:

- il numero di isole equivalenti isolate normalizzato per Kg di peso corporeo del ricevente;
- purezza
- volume del tessuto;
- nessuna evidenza di contaminazione microbiologica;
- vitalità \geq 70%.

4.2. Parametri di Rilascio di epatociti

Devono essere considerati i seguenti parametri:

- il numero totale di epatociti vitali
- concentrazione
- purezza
- vitalità \geq 70%.
- nessuna evidenza di contaminazione microbiologica;

5. Smaltimento delle preparazioni non idonee

Le preparazioni finali riconosciute come non idonee per trapianto devono essere scartate. Gli organi non ritenuti idonei al processo di isolamento (selezione di secondo livello effettuata dalla Unità di processazione) devono allo stesso modo essere scartati. Le motivazioni che hanno condotto a tale decisione e le procedure devono essere documentate a garanzia della rintracciabilità dei dati.

I tessuti umani e altri rifiuti pericolosi devono essere raccolti e smaltiti in modo tale da minimizzare i rischi per il personale dell'Unità o l'ambiente, conformemente alla regolamentazione europea, nazionale e locale.

SEZIONE F

DISTRIBUZIONE DEI PREPARATI DI CELLULE ALLE STRUTTURE DI TRAPIANTO

1. Indicazioni

L'indicazione al trapianto di isole è limitata a pazienti diabetici in terapia immunosoppressiva per altri trapianti e a pazienti con un diabete molto scompensato, intrattabile anche con le più moderne strategie di trattamento insulinico (analoghi di insulina, microinfusori), con una bassa qualità di vita e destinati a sviluppare precocemente le complicanze diabetiche.

L'utilizzo di epatociti umani primari, provenienti da fegati non ritenuti idonei al trapianto è previsto per il trattamento di epatiti fulminanti con fegato bioartificiale extracorporeo. Le molto più vaste indicazioni potenziali sono la insufficienza epatica acuta primitiva, o secondaria in corso di epatopatia cronica o altra patologia debilitante e le malattie metaboliche del fegato trattabili con trapianto di epatociti.

2. Procedure

Le Strutture utilizzatrici possono fare richiesta per un paziente specifico al Centro Regionale di Coordinamento della propria Regione o ad una struttura con la quale la Regione abbia stipulato apposita convenzione. L'Unità di Processazione provvederà a fornire il preparato attenendosi ai criteri di distribuzione e alle priorità descritte nelle proprie procedure operative.

Se nel territorio regionale del Centro di Trapianto non è presente una Unità di Processazione identificata dall'autorità regionale e questa non ha stipulato una convenzione con una Unità di altra Regione, il centro di Trapianto è tenuto a trasmettere la richiesta al Centro Regionale di Riferimento (CRR), questi autorizzerà la richiesta ad una Unità di Processazione.

I criteri di distribuzione e le priorità di assegnazione devono essere descritte in una procedura formulata dal CRR e ad essa deve attenersi l'Unità.

3. Preparazione delle cellule e dispositivi per l'invio alla Struttura di utilizzo

Prima che qualsiasi preparazione di cellule possa essere avviata alla distribuzione, il responsabile della Unità di Processazione deve validare l'intera documentazione relativa alla idoneità della preparazione (rispondenza ai criteri di selezione del donatore, test sierologici e microbiologici, documentazione di prelievo e di Processazione, controlli di qualità delle cellule). Nel caso in cui non sia possibile effettuare il trattamento entro due ore dall'invio della preparazione, queste devono essere conservate prima del loro utilizzo presso la Struttura di utilizzo. In questo caso, oltre al preparato cellulare, l'Unità di Processazione deve fornire le indicazioni per la conservazione e le soluzioni per l'utilizzo posticipato. L'Unità di Processazione deve controllare, supervisionare e autorizzare qualsiasi procedura eseguita sulla preparazione cellulare nelle fasi immediatamente precedenti l'utilizzo; l'unità di trapianto è tenuta a seguire

scrupolosamente le indicazioni che accompagnano il preparato. Deve essere eseguita ispezione finale del contenitore e dei dati riportati sullo stesso, per controllare la sua integrità, la corretta disposizione delle cellule al suo interno, i dati sull'etichetta e l'identificazione del contenuto. L'etichetta posta sulla confezione contenente il preparato di epatociti dall'Unità di Processazione non può essere rimossa, alterata o oscurata.

4. Trasporto

Il trasporto dei contenitori viene effettuato a temperatura ambiente nel più breve tempo possibile.

5. Etichettatura

Le singole confezioni riportano:

- denominazione della Unità di Processazione;
- indicazione del tipo di cellule e codice identificativo della preparazione;
- numero di cellule, purezza, , concentrazione (per gli epatociti)
- data di isolamento
- data di scadenza
- ricevente prescelto

Sull'imballaggio esterno viene applicata la etichettatura esterna con le seguenti indicazioni:

- denominazione ed indirizzo della Unità di Processazione, compresi indirizzo e recapito telefonico;
- identificazione del Centro di Utilizzo a cui è destinata la preparazione,
- indicazione che l'imballaggio contiene cellule umane con la dicitura 'Manipolare con cautela'
- condizioni di trasporto raccomandate (temperatura, tipo di soluzione)

Tutte le preparazioni devono essere corredate da documentazione di accompagnamento che dovrà essere inserita nella documentazione clinica del ricevente il trapianto.

6. Documentazione di accompagnamento

Istruzioni specifiche devono essere accluse al preparato di cellule per il quale è richiesto un trattamento specifico per il lavaggio e la risospensione in soluzione per il trapianto.

La documentazione di accompagnamento deve contenere tutte le informazioni descritte sopra, oltre ai seguenti dati:

- informazioni e risultati dei test di screening effettuati sul donatore;
- metodi di processazione;
- composizione del terreno di trasporto
- risultati dei test microbiologici utilizzati per il controllo di sterilità
- quantità totale e numero di contenitori inviati.
- risultato del controllo di vitalità cellulare
- data di distribuzione
- ricevente prescelto

Nella documentazione di accompagnamento deve essere specificato che:

- ogni preparato di cellule deve essere utilizzato per il solo ricevente indicato;
- la struttura sanitaria destinataria del preparato è responsabile del corretto mantenimento del preparato di inviato, sino al momento dell'utilizzo;

- il Centro di Utilizzo deve informare la Unità di Processazione riguardo all'utilizzazione delle cellule (data/sede di utilizzo, medico responsabile del trattamento, identificazione e dati clinici del ricevente), per garantirne la rintracciabilità;
- il Centro di Utilizzo è responsabile del mantenimento della documentazione necessaria a garantire la rintracciabilità del preparato inviato;
- eventuali eventi/reazioni avversi correlati all'utilizzo delle cellule intervenuti nel ricevente devono essere immediatamente comunicate alla Unità di Processazione.

7. Conferma del ricevimento

Conferma del ricevimento del preparato deve essere trasmessa alla Unità di Processazione attraverso l'invio della documentazione riportante la data di ricevimento, le informazioni sulla destinazione (nome del ricevente, data dell'intervento, medico che effettua il trattamento) e la firma del medico responsabile del trattamento per presa visione dell'idoneità, al momento della consegna, del tessuto trasportato.

Tale documentazione garantisce la rintracciabilità delle cellule.

La Unità di Utilizzo è tenuta ad impiegare il prodotto cellulare ricevuto dalla Unità di Processazione sul paziente per il quale è stata eseguita la richiesta, entro e non oltre le 12 ore dell'invio mantenendo il prodotto alla temperatura di trasporto e nelle condizioni indicate dalla Unità di Processazione .

SEZIONE G

REGISTRAZIONI SUCCESSIVE AL TRAPIANTO

1. Premessa

L'attività della Unità di Processazione rappresenta il collegamento tra il donatore e il suo ricevente. Deve pertanto garantire la rintracciabilità di tutti i dati a partire da quelli relativi al donatore, alle procedure di processazione e al controllo di qualità delle preparazioni fino ai dati clinici del ricevente. Parte integrante di questa attività di controllo è rappresentata dalle registrazioni successive al trapianto/trattamento, quali andamento clinico e monitoraggio di eventuali eventi/reazioni avverse.

2. Documentazione per il follow-up

Ciascuna Unità di Processazione elaborerà dei moduli per la raccolta del follow-up del ricevente. Tutti i moduli includeranno:

- sesso, data di nascita e nome del paziente
- diagnosi della malattia curata con il trapianto/trattamento
- struttura che effettua l'intervento
- procedure chirurgiche applicate
- data dell'intervento
- nome e cognome del medico/chirurgo che ha eseguito il trapianto/trattamento
- dati clinici del ricevente secondo le indicazioni dei singoli Comitati scientifici della Struttura

I centri presso i quali si sono eseguiti i trapianti/trattamenti devono inviare alla Unità di Processazione, notizie sul follow up del ricevente. In particolare deve essere sempre indicato il codice del prodotto cellulare ed il tipo di reazione al quale è andato incontro il ricevente.

Il responsabile scientifico della Unità di processazione provvederà alla gestione dei follow-up e alla validazione dei dati ricevuti al fine di poter eventualmente considerare azioni correttive sulle procedure nel più breve tempo possibile.

3. Riservatezza nell'utilizzo delle informazioni inviate

Tutte le informazioni relative alle reazioni al trapianto, al follow-up del ricevente e quant'altro possa interessare la banca a scopi epidemiologici e di sicurezza, dovranno essere utilizzate dalla banca stessa in modo che non compaia nessuna indicazione che possa permettere l'identificazione del ricevente ai sensi dell'art. 18 comma 2 della Legge 91/99.

SEZIONE H

GESTIONE DI REAZIONI ED EVENTI AVVERSI GRAVI

1. Generalità

Le reazioni gravi interessano i riceventi di tessuti o cellule umani.

Gli eventi avversi gravi possono realizzarsi in qualunque fase del processo: dal momento della identificazione del donatore al trapianto. Il riscontro può avvenire da parte di una qualunque delle strutture coinvolte nel processo.

2. Responsabilità delle Unità di Processazione

2.1. Procedure

Le Unità di Processazione devono fornire le istruzioni per la notifica degli eventi e reazioni avverse ai Centri di Trapianto e a tutte le strutture che intervengono nelle singole fasi del processo.

Ogni struttura deve avere procedure scritte per ottemperare questo requisito.

L'Unità di Processazione deve avere procedure per la comunicazione al Centro Regionale di Riferimento (CRR) di ogni reazione/evento avverso grave, comprese tutte le informazioni disponibili pertinenti e le conclusioni dell'indagine volta ad accertarne le cause e l'esito.

Ogni Unità di Processazione deve avere una procedura scritta, rapida e verificabile, che consenta il ritiro dalla distribuzione di qualsiasi prodotto che possa essere connesso con evento/reazioni avversi gravi.

2.2. Notifica

Le Unità di Processazione devono notificare immediatamente qualsiasi evento/reazione avversi al CRR. Devono essere notificati i provvedimenti adottati per quanto riguarda altri tessuti o cellule interessati, distribuiti per trapianto/innesto.

La notifica deve avvenire immediatamente anche se l'implicazione dei preparati cellulari nella reazione è solo sospetta, così come nel caso in cui vi sia solo l'ipotesi di un rischio legato all'evento rilevato.

Qualora una Unità di Processazione venisse a conoscenza di un evento avverso grave, anche se ciò non ha influenza per i preparati cellulari di pertinenza della Unità di Processazione stessa, è tenuta a darne notifica al CRR per garantire la sicurezza di eventuali altri riceventi di tessuti o organi.

2.3. Azioni

Le Unità di Processazione devono intraprendere una indagine per evidenziarne la causa e le implicazioni di eventi/reazioni avverse gravi di cui hanno avuto informazione.

Le conclusioni dell'indagine dovranno essere trasmesse al CRR non appena disponibili.

Le Unità di Processazione, in apposito registro, devono preparare e tenere una relazione scritta sulle ricerche in merito alle reazioni avverse, incluso le conclusioni, il follow -up e le azioni correttive.

3. Responsabilità dei Centri Regionali di Riferimento

Il CRR deve inoltrare la notifica al Centro Nazionale Trapianti ed al proprio Centro Interregionale di Riferimento non appena ne viene a conoscenza. Deve quindi informare tutte le strutture eventualmente coinvolte, seguendo una procedura scritta a questo riguardo, e intraprendere le azioni preventive e correttive necessarie.

La notifica al CNT deve avvenire telefonicamente ed in seguito in forma scritta. In forma scritta dovranno essere inviate anche le conclusioni dell'indagine svolta, non appena disponibili.

4. Modulistica

Le Unità di Processazione devono inviare tutte le informazioni pertinenti disponibili ed i provvedimenti adottati ai CRR tramite le schede in All I o II, e successivamente la conclusione delle indagini mediante l'All III o IV.

Allegato I

NOTIFICA DI REAZIONI AVVERSE GRAVI**Notifica rapida di
presunte reazioni avverse gravi**

Unità di Processazione	
Identificazione della notifica	
Data di notifica (anno/mese/giorno)	
Soggetto coinvolto (ricevente o donatore)	
Data e luogo di utilizzo sull'uomo (anno/mese/giorno)	
Numero unico d'identificazione della donazione	
Data della presunta reazione avversa grave (anno/mese/giorno)	
Tipo cellule coinvolti nella presunta reazione avversa grave	
Tipo di presunta/e reazione/i avversa/e grave/i	

Allegato II

NOTIFICA DI EVENTI AVVERSI GRAVI

**Notifica rapida di
presunti eventi avversi gravi**

Unità di processazione				
Identificazione della notifica				
Data di notifica (anno/mese/giorno)				
Data dell'evento avverso grave (anno/mese/giorno)				
Evento avverso grave che potrebbe avere effetti sulla qualità e la sicurezza di tessuti e cellule a causa di uno scostamento relativo a:	Specificare			
	Difetto di tessuti e cellule	Guasto delle attrezzature	Errore umano	Altro (specificare)
Prelievo				
Controllo				
Trasporto				
Lavorazione				
Stoccaggio				
Distribuzione				
Materiali				
Altro (<i>specificare</i>)				

Allegato III

**Conclusioni dell'indagine
sulle reazioni avverse gravi**

Unità di processazione	
Identificazione della notifica	
Data di conferma (anno/mese/giorno)	
Data della reazione avversa grave (anno/mese/giorno)	
Numero unico d'identificazione della donazione	
Conferma della reazione avversa grave (sì/no) In caso affermativo, specificare	
Esito clinico (se conosciuto)	
<ul style="list-style-type: none"> – Ristabilimento completo – Postumi lievi – Postumi gravi – Decesso 	
Esito dell'indagine e conclusioni finali	
Raccomandazioni di interventi preventivi e correttivi	

Allegato IV

**Conclusioni dell'indagine
sugli eventi avversi gravi**

Unità di Processazione	
Identificazione della notifica	
Data di conferma (anno/mese/giorno)	
Data dell'evento avverso grave (anno/mese/giorno)	
Analisi delle cause di fondo (in dettaglio)	
Provvedimenti correttivi adottati (in dettaglio)	

Bibliografia

- **DE 2004/23/CE del 31 marzo 2004** “Definizione di norme di qualità e sicurezza per la donazione, l’approvvigionamento, il controllo , la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani” GU L 102 07/04/2004 p.48
- **DE 2006/17/CE dell’8 febbraio 2006** “che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l’approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani”
- **DE 2006/86 del 24 ottobre 2006** “che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani”
- **GMP: Eudralex Vol. 4 –**
- **Legge 91, 1 aprile 1999.** “Disposizione in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti” GU 15/04/1999 p.3
- **DM2 dicembre 2004** “Modalità per il rilascio delle autorizzazioni all’esportazione o all’importazione di organi e tessuti” GU 03/02/2005 p. 14
- **ASR 23 settembre 2004** “Linee guida sulle modalità di disciplina delle attività di reperimento, trattamento, conservazione e distribuzione di cellule e tessuti umani a scopo di trapianto”
- **ASR 14 febbraio 2002** “Requisiti delle strutture idonee ad effettuare trapianti di organi e tessuti e standard minimi di attività”
- **Circolare ministeriale n°3 dell’8 maggio 2003** “Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e campioni diagnostici” tali raccomandazioni sono acquisite dalle varie organizzazioni: UPU (Unione postale Universale) ICAO (Organizzazione Internazionale Aviazione Civile), IATA (Associazione Internazionale del Trasporto Aereo)
- **Linee guida NIH**, applicate alle unità di processazione autorizzate dagli NIH stessi a studi clinici di fase 1
- **Guida del Consiglio d’Europa:** Guide to safety and quality assurance for organs, tissues and cells-3rd edition (2006)