- 8.1. Analisi dei marcatori di infezione nelle donazioni
  - 8.1.1. Autorizzazione e requisiti generali
  - 8.1.2. Pre-analisi dei campioni di sangue donato
  - 8.1.3. Archiviazione dei campioni «sieroteca»
  - 8.1.4. Screening dei marcatori di infezione
  - 8.1.5. Documentazione
  - 8.1.6. Controlli di qualità
  - 8.1.7. Obbligo di dichiarazione
  - 8.1.8. Liberazione del laboratorio
- 8.2. Analisi immunoematologiche delle donazioni
  - 8.2.1. Analisi sierologiche del gruppo sanguigno sui campioni dei donatori
  - 8.2.2. Svolgimento delle analisi immunoematologiche
  - 8.2.3. Liberazione del laboratorio

8.1. Analisi dei marcatori di infezione nelle donazioni

8.1.1. Autorizzazione e requisiti generali

I laboratori microbiologici che analizzano il sangue, gli emoderivati o i trapianti per escludere malattie trasmissibili in vista di una trasfusione, di un trapianto o della trasformazione necessitano di un'autorizzazione d'esercizio (LEp; G1). Devono rispettare le regole di buona prassi (allegato G1). L'analisi delle donazioni deve essere effettuata in tempi e luoghi distinti dall'esame dei campioni dei pazienti.

I laboratori devono disporre di locali separati dalle altre attività. Le condizioni in cui vengono svolte le analisi (compresa l'analisi PCR) non devono in alcun modo influenzare i risultati.

8.1.2. Pre-analisi dei campioni di sangue donato

8.1.2.1. Raccolta e identificazione

Le analisi delle donazioni devono essere eseguite su campioni di sangue raccolti a tale scopo in provette primarie.

L'etichetta deve essere applicata in modo tale che il codice a barre possa essere letto automaticamente. L'identificazione e la distribuzione dei campioni devono essere automatizzate e computerizzate.

Per i parametri di screening obbligatori possono essere utilizzate solo provette primarie senza previa decantazione.

8.1.2.2. Manipolazione, trasporto, centrifugazione e stoccaggio

Dopo il prelievo di sangue, i campioni devono essere analizzati il più presto possibile.

La manipolazione, il trasporto, la centrifugazione, lo stoccaggio e l'analisi devono essere condotti secondo le indicazioni del produttore del kit di test.

Le provette con il campione devono essere consegnate negli appositi contenitori entro 24 ore a temperatura ambiente. Se il produttore non specifica la temperatura, si devono scegliere dei sistemi di trasporto capaci di garantire che i campioni non siano esposti a temperature inferiori a +2°C e superiori a +30°C. I contenitori devono essere puliti e disinfettati regolarmente. La consegna delle provette con i campioni deve essere controllata per verificarne la completezza. Un eventuale stoccaggio intermedio delle provette prima del test deve avvenire a una temperatura compresa tra + 2°C e + 10°C, a meno che la verifica interna non indichi la possibilità o necessità di condizioni di conservazione diverse.

Al ricevimento delle provette con i campioni viene svolto un controllo visivo (aspetto, quantità, etichettatura) per garantire il rispetto dei criteri di qualità definiti internamente.

L'analisi deve essere eseguita entro e non oltre sette giorni lavorativi.

Le provette con i campioni vengono centrifugate chiuse. I parametri di centrifugazione devono essere definiti (velocità, durata, decelerazione, temperatura) e convalidati per le analisi da eseguire. I tappi non possono essere riutilizzati.

In caso di trasferimento su un altro supporto per campioni (piastre, provette), l'identificazione di questi supporti di reazione (piastre microtiter ecc.) deve essere effettuata mediante lettura automatica.

Una volta eseguite le analisi, le provette contenenti i campioni (provette originali) devono essere conservate per eventuali controlli a una temperatura compresa tra + 2°C e + 8°C fino al completamento e alla documentazione di tutti gli esami richiesti per la liberazione degli emoderivati, a meno che la verifica interna non indichi la possibilità o necessità di condizioni di conservazione diverse (tab. 1).

Di ogni donazione deve essere conservata un'aliquota di siero o di plasma nella sieroteca (vedi punto 8.1.3.).

Tabella 1:

	Trasporto campione	Stoccaggio campione prima dell'analisi	Parametri di centrifugazione	Stoccaggio campioni dopo analisi
Temperatura	2-30°C	2-10°C (o secondo verifica)	secondo verifica	2-8°C (o secondo verifica)
Durata	24 h	Indicazioni test / mass. 7 giorni	secondo verifica	fino a 5 giorni dopo liberazione del risultato

8.1.3. Archiviazione dei campioni «sieroteca»

8.1.3.1. Procedura

Prima di eseguire le analisi, i campioni devono essere pipettati dalle provette primarie. La tracciabilità dei campioni deve essere convalidata.

8.1.3.2. Volumi

Di ogni donazione si devono conservare almeno 2.0 ml di siero o plasma, in quantità sufficiente da poter eseguire i test attuali dei marcatori d'infezione e/o i test di amplificazione del genoma.

8.1.3.3. Supporti per campioni

Come supporto per campioni si prestano le piastre microtiter (MTP) in formato verticale o MTP in formato normale oppure le microprovette. Si devono evitare possibili contaminazioni durante la procedura (ad es. punte usa e getta, punte monouso). I supporti dei campioni devono essere chiusi.

8.1.3.4. Identificazione

Deve essere garantita un'identificazione univoca dei campioni e delle piastre (a tal fine si deve utilizzare un sistema di pipettaggio automatico e il relativo software).

8.1.3.5. Temperatura e durata dello stoccaggio

I campioni di sangue devono essere conservati in un congelatore o in una cella freezer a una temperatura di esercizio di -25°C per una durata minima di cinque anni.

8.1.3.6. Regole sull'impiego

Alla sieroteca si può far ricorso solo in caso di procedura di look back. A seguito di un evento post-trasfusionale o di un'informazione post-donazione è possibile richiedere alla direzione medica di T-CH-SA di poter utilizzare il campione conservato in sieroteca.

In linea di massima la sieroteca non può essere utilizzata per studi scientifici (le deroghe devono essere autorizzate da T-CH SA). Si segnala che può essere impiegato solo il materiale necessario, il resto del campione rimane conservato nella sieroteca.

8.1.4. Screening dei marcatori di infezione

8.1.4.1. Osservazioni generali sulle analisi dei marcatori di infezione

Le analisi delle donazioni tramite test dei marcatori di infezione sono analisi condotte in laboratorio per accertare se il sangue donato può essere liberato per l'impiego clinico.

Si distingue tra test sierologici e test NAT.

La seguente tabella fornisce una visione d'insieme:

Analisi obbligatorie condotte sistematicamente su ogni donazione e rilevanti per la liberazione		
Tipo di analisi	**Sierologia**	**NAT (PCR)**
HIV1/2	X	X
Epatite C (HCV)	X	X
Epatite B (HBV)	X	X
Epatite E (HEV)		X
Sifilide (*T. pallidum*)	X	

Analisi selettive (ad es. per chiarire l'idoneità alla donazione secondo i criteri di attitudine alla donazione di sangue), rilevanti per la liberazione se l'esame è richiesto		
Tipo di analisi	**Sierologia**	**NAT (PCR)**
Chagas (T.cruzi)	X	
Malaria (Plasmodium spp.)	X	
CMV	X	
WNV (stagionale)		X

Analisi non rilevanti per la liberazione, di solito condotte sistematicamente a ogni donazione (rilevanti per la liberazione di plasma destinato al frazionamento)

Tipo di analisi	Sierologia	NAT (PCR)
Parvovirus B19		X
Epatite A (HAV)		X

In una prima fase si svolgono dei test di screening (test di ricerca), seguiti se necessario da analisi complementari (test di conferma). Con questi esami complementari si ottiene il referto definitivo di laboratorio. I risultati e i referti delle analisi influenzano anche la valutazione delle donazioni future. Queste fasi fanno parte del vasto piano di analisi delle donazioni.

I test di conferma devono essere svolti in un laboratorio di riferimento designato da T-CH SA e qualificato in base a una serie di specifiche stabilite dallo stesso organismo. I dettagli sui vari agenti patogeni sono disciplinati nell'allegato all'articolo 8.

Il STR mette a disposizione del laboratorio di riferimento tutti i dati richiesti nel «Mandato di analisi su campioni di sangue donato». Se si tratta di un campione inviato nel contesto di una procedura di look back occorre specificare se il look back è legato al donatore o al paziente.

Il referto della donazione si basa sui risultati dei test di screening e di eventuali test complementari. A questo scopo si devono considerare anche i risultati delle analisi di donazioni e campioni precedenti, in particolare per individuare donatori ripetutamente reattivi.

Il transfer dei risultati deve seguire le procedure convalidate.

8.1.4.2. Metodi e reagenti

I metodi di esecuzione del test di screening dipendono dalle apparecchiature e dai reagenti impiegati.

Possono essere utilizzati solo i test (dispositivi medico-diagnostici in vitro) designati come idonei da Swissmedic (L1, OAMed). Di conseguenza, questi test devono essere stati sottoposti a una procedura di valutazione della conformità ai sensi dell'ordinanza relativa ai dispositivi medici e recare il relativo marchio di conformità (marcatura CE) (L1, ODmed).

8.1.4.3. Convalida/verifica

a) Kit di test commerciali con marcatura CE

I metodi impiegati devono essere verificati su un determinato reagente e determinate apparecchiature prima di essere utilizzati per le analisi delle donazioni.

Si devono rispettare i requisiti stabiliti nella guida riguardante i test e le procedure di test in materia di sangue ed emoderivati (L1).

b) Diagnosi in vitro prodotte all'interno dell'azienda

Le diagnosi in vitro prodotte o modificate all'interno dell'azienda devono soddisfare le condizioni per l'immissione in commercio dei dispostivi medici (ODmed). Si devono rispettare i requisiti stabiliti nella guida riguardante i test e le procedure di test in materia di sangue ed emoderivati (L1).

8.1.4.4. Controllo della qualità dei reagenti e dei kit di test

Al momento del ricevimento, ogni lotto di reagenti e kit di test viene sottoposto a un controllo della qualità le cui modalità sono definite in una SOP.

La conformità dei reagenti viene costantemente verificata secondo il punto 8.1.6.1 Controlli di qualità interni. I valori misurati durante questi controlli permettono di valutare la qualità dei reagenti sul lungo periodo.

8.1.4.5. Stoccaggio e gestione dei reagenti e dei kit di test

I reagenti e i kit di test devono essere conservati secondo le raccomandazioni del produttore.

Le scorte di kit di analisi e di reagenti devono essere gestite in modo da evitare, da un lato, l'uso di lotti non controllati, non conformi agli standard o obsoleti/scaduti e, dall'altro, da garantirne l'utilizzo in ordine cronologico rispetto alla data di scadenza. Inoltre, la gestione dei reagenti deve assicurare che i lotti richiamati dal produttore siano eliminati immediatamente. Deve essere garantita l'identificazione del numero di lotto dei reagenti utilizzati per ogni donazione analizzata.

8.1.4.6. Materiovigilanza

Se un lotto di reagenti non soddisfa i requisiti e compromette di conseguenza la qualità delle analisi e la sicurezza degli emoderivati, occorre informare immediatamente Swissmedic (con copia a T-CH SA) (OAMed, ODmed). Oltre a Swissmedic deve essere informato dell'evento anche il produttore.

8.1.4.7. Analisi obbligatorie rilevanti per la liberazione

8.1.4.7.1. HBV, HCV nonché HIV e sifilide

La valutazione dei marcatori di infezione avviene, a seconda del risultato, in una o due fasi, cioè rispettivamente dopo lo screening e dopo la conferma.

Ogni test di screening viene eseguito su una provetta primaria rappresentativa della donazione.

I dettagli sul NAT specifico e sullo screening sierologico sono definiti negli algoritmi HBV, HCV, HIV. Il test della sifilide è descritto nell'algoritmo T. pallidum/ Sifilide.

I requisiti tecnici di Swissmedic devono essere interamente rispettati (L1).

8.1.4.7.2. Screening sierologico iniziale

Lo screening iniziale condotto su ogni donazione deve utilizzare metodi e reagenti convalidati per la determinazione di un marcatore specifico. Il risultato valido è *inizialmente reattivo* o *non reattivo*.

Un campione è definito *inizialmente reattivo* se il valore riscontrato si situa nell'intervallo indicato come positivo dal produttore o si situa nella zona grigia. Un tale risultato bloccherà la liberazione dei relativi emoderivati labili.

a) Procedura in caso di campioni inizialmente reattivi

Se un campione risulta inizialmente reattivo l'analisi viene ripetuta. A questo scopo si conduce lo stesso test in doppio utilizzando gli stessi reagenti per verificare la ripetibilità della reazione. I due test devono essere eseguiti con lo stesso metodo di screening iniziale, compresa l'identificazione del campione positivo, e gli stessi dispositivi periferici.

Se i risultati dei due test sono *non reattivi* per due volte, il referto è da considerarsi *ripetizione negativa* per il campione e il marcatore analizzato.

b) Interpretazione di un risultato ripetutamente reattivo

Se almeno un risultato della ripetizione del test è *reattivo (R/R o NR/R)*, il referto del campione è *ripetizione non negativa* e i prodotti corrispondenti sono da *distruggere*. L'intera donazione deve essere distrutta; un impiego documentato a scopo di laboratorio (ricerca, diagnosi) è equiparato alla distruzione. Il referto implica che i prodotti e il donatore non possono essere *liberati*.

8.1.4.7.3. Conferma del risultato dello screening sierologico

Tutti i campioni risultati *R/R* o *NR/R* allo screening per un determinato marcatore (referto: *ripetizione non negativa*) devono essere sottoposti a un test di conferma (vedi requisiti tecnici «algoritmi di aiuto alla diagnostica»).

I test di conferma sono necessari per la valutazione definitiva della donazione e dei prodotti, per l'eventuale informazione del donatore e l'analisi di un secondo campione di sangue.

I test di conferma possono condurre a risultati diversi a seconda dei marcatori analizzati:

1. *negativo*, il che porta al referto *liberato* per il donatore. Tuttavia, se questa circostanza (screening *non negativo* / conferma negativa) si verifica più volte nello stesso donatore, il medico del STR decide sull'ulteriore ammissione o meno del donatore;
2. *non negativo*, il che comporta due possibilità

   - *eventualmente positivo,* ovvero conferma IND (ad es. quando i test di conferma evidenziano reazioni incomplete, da cui non si possono trarre conclusioni all'attuale stadio delle conoscenze. Il frazionatore deve essere informato conformemente ai diversi contratti individuali (in generale su eventuali donazioni degli ultimi 6 mesi). Il laboratorio di riferimento per i marcatori di infezione deve condurre un nuovo esame del donatore su un secondo campione di sangue;
   - *confermato positivo*, cioè conferma POS. Il frazionatore deve essere informato conformemente ai diversi contratti individuali (in generale su eventuali donazioni degli ultimi 6 mesi). Il laboratorio di riferimento per i marcatori di infezione deve condurre un nuovo esame del donatore su un secondo campione di sangue, compreso il NAT quantitativo e qualitativo.

8.1.4.7.4. Intervallo tra il primo e il secondo (o ulteriore) campione di sangue

Se il primo test di conferma produce un risultato eventualmente positivo, il secondo campione di sangue deve essere analizzato entro 12 settimane.

Se la prima conferma è positiva si deve effettuare al più presto (di norma entro 7-14 giorni dalla donazione iniziale) un controllo su un secondo campione di sangue nell'interesse del paziente che ha ricevuto i prodotti ottenuti con la donazione precedente, per poter attivare senza indugio la procedura di look back legata al donatore nel caso in cui i risultati siano confermati positivi.

8.1.4.7.5. Conferma del secondo campione di sangue

La valutazione definitiva dello screening, della conferma e dei referti del secondo campione di sangue determina le misure da adottare presso il donatore.

Se il risultato delle analisi condotte sul secondo campione di sangue (secondo tutte le procedure necessarie) è *negativo*, il referto è «*donatore negativo*» o «*informare il donatore/donatore liberato*». La discrepanza tra lo screening e la conferma deve essere chiarita.

Se il risultato delle analisi condotte sul secondo campione di sangue (secondo tutte le procedure necessarie) è *eventualmente positivo* o *conferma IND* (ad es. quando i test di conferma evidenziano reazioni incomplete, da cui non si possono trarre conclusioni all'attuale stadio delle conoscenze), il referto è «*donatore incerto*» e «*informare/escludere il donatore* ». Ulteriori campioni di controllo potranno essere prelevati, dopo un ulteriore periodo di circa 12 settimane. In caso di risultati dubbi non specifici per la sifilide, la reinserzione nel registro dei donatori deve avvenire solo dopo aver effettuato ulteriori campioni di controllo, almeno un anno dopo.

Se il risultato delle analisi condotte su questo campione (secondo tutte le procedure necessarie) è confermato positivo, il referto è «*donatore confermato positivo*» e «*informare il donatore/rilevare il rischio di infezione/escludere*». Il referto *confermato positivo* (in base all'analisi del secondo campione) richiede un'ampia e tempestiva informazione del donatore da parte dei medici del servizio trasfusionale, che devono offrirgli consulenza e assistenza. In caso di

donatore multiplo occorre effettuare un look back legato al donatore. L'eventuale rinuncia del donatore alla consulenza e assistenza deve essere documentata.

Se alla scadenza dei termini indicati al punto 8.1.4.7.4. non sono ancora disponibili i risultati, occorre escludere il donatore e attivare un look back legato al donatore.

8.1.4.7.6. Test NAT

I test NAT possono essere condotti su pool o singole donazioni. I pool positivi vengono separati fino a individuare la singola donazione positiva. Le donazioni singole con risultato NAT positivo a HIV/HCV/HBV vengono valutate tenendo conto del risultato sierologico corrispondente. In caso di screening sierologico negativo si svolgeranno due nuovi test con lo stesso metodo NAT o una discriminazione per escludere falsi risultati reattivi.

Per i test e la conferma si applicano gli algoritmi HBV, HCV, HIV, e l'algoritmo HEV. Per HAV e Parvo B19 NAT vedi allegato sui test non rilevanti per la liberazione.

Per i limiti di rivelabilità dei test NAT si rimanda alla guida di Swissmedic riguardante i test e le procedure di test in materia di sangue ed emoderivati (L1):

HIV: 500 IU/ml

HCV: 50 IU/ml

HBV: 25 IU/ml

8.1.4.7.7. Analisi selettive

La procedura e gli algoritmi per le analisi selettive sono descritte nell'allegato Art. 8.4 Analisi selettive.

8.1.5. Documentazione

La documentazione deve rispettare i requisiti di legge.

Le statistiche annuali devono essere trasmesse a T-CH SA una volta all'anno.

8.1.6. Controlli di qualità

8.1.6.1. Controlli di qualità interni

Ogni metodo deve essere convalidato e lo stato di verifica mantenuto. I controlli positivi dei kit devono essere valutati sistematicamente secondo l'ordinanza concernente i laboratori di microbiologia. Nelle raccomandazioni sulla valutazione statistica dei controlli sierologici positivi per la determinazione qualitativa dei marcatori di infezione («Empfehlungen zur statistischen Auswertung von positiven serologischen Kontrollen bei der qualitativen Bestimmung von Infektmarkern») si trovano esempi di valutazione statistica.

La correttezza e, per i metodi quantitativi, la precisione dei risultati ottenuti in laboratorio devono essere inoltre verificate o monitorate periodicamente attraverso campioni di controllo della qualità indipendente dal kit.

I campioni di controllo devono essere adeguati ai metodi impiegati.

Per i test sierologici (HBV, HCV, HIV e sifilide) i controlli della qualità indipendenti dal kit devono essere svolti quotidianamente su ogni piastra/matrice. Un risultato positivo per i campioni di controllo di qualità indipendenti dal kit è una condizione per la verifica dei risultati dell'analisi. La valutazione di tendenza mensile dei valori misurati è necessaria per individuare per tempo un eventuale deterioramento della performance dei test e prendere misure adeguate (vedi Raccomandazione sulle valutazioni statistiche di controlli sierologici positivi nella determinazione qualitativa dei marcatori di infezione). La valutazione di tendenza mensile e la relativa documentazione scritta è di

responsabilità della direzione del laboratorio. Questa valutazione non è rilevante per la liberazione della singola matrice/della singola piastra.

8.1.6.2. Controlli di qualità esterni

Il laboratorio deve qualificarsi per i test sulle donazioni di sangue partecipando regolarmente a controlli di qualità esterni riconosciuti. I controlli di qualità esterni sono pertanto obbligatori. I risultati devono essere consultabili da Swissmedic per un controllo secondo i requisiti legali.

Tramite il formulario Fallimenti dei test e controlli di qualità è necessario confermare una volta all'anno il superamento dei controlli di qualità esterni. In caso di discrepanze, i STR sono tenuti a informare immediatamente T-CH.

8.1.7. Obbligo di dichiarazione

Ai sensi dell'«Ordinanza del DFI sulla notifica delle osservazioni relative alle malattie trasmissibili dell'uomo» e dell'«Ordinanza sulle epidemie», le malattie infettive devono essere segnalate all'UFSP (referti di laboratorio) e/o al medico cantonale (referti clinici). Le dichiarazioni devono essere effettuate conformemente all'ordinanza; come ausilio si può consultare il sito web dell'UFSP e la guida alla dichiarazione.

Ulteriori dichiarazioni obbligatorie a Swissmedic, al Centro di coordinamento Look-back e a T-CH SA in materia di emovigilanza e malattie infettive sono elencate nell'articolo Vigilanza (18.1.2.2.2.1. Deviazioni nell'idoneità alla donazione).

8.1.8. Liberazione del laboratorio

La liberazione tecnica e medica deve essere disciplinata in una SOP.

8.2. Analisi immunoematologiche delle donazioni

8.2.1. Analisi sierologiche del gruppo sanguigno sui campioni dei donatori

8.2.1.1. Requisiti generali (ODmed)

Le analisi sierologiche dei campioni di sangue dei donatori devono determinare quanto segue:

- gruppo sanguigno ABO
- antigene RH1 (RhD)
- fenotipo RH/KEL1 (antigeni RH2 [C], RH3 [E], RH4 [c], RH5 [e] et KEL1 [K])
- ricerca di anticorpi e, in caso di risultato positivo, specificazione degli anticorpi.

Le analisi immunoematologiche devono essere condotte con sistemi di analisi automatici e qualificati, compreso il transfer automatico e convalidato dei dati.

In caso di donatori multipli, i risultati delle analisi immunoematologiche devono essere paragonati con quelli della donazione o delle donazioni precedenti.

In presenza di anticorpi eritrocitari, DAT positivo, varianti di antigeni (ad es. varianti RHD/RHCE/ABO) o casi particolari, come gruppi sanguigni rari, si dovrà informare il donatore.

Durante le analisi per la determinazione dei fenotipi eritrocitari si dovrà prestare particolarmente attenzione all'identificazione di antigeni debolmente espressi.

I requisiti e le prescrizioni riguardanti i controlli di qualità nelle analisi immunoematologiche delle donazioni sono indicati nell'articolo 17, punto 17.2.2.

I requisiti e le prescrizioni riguardanti le apparecchiature impiegate nelle analisi immunoematologiche delle donazioni sono indicati nell'articolo 12, punto 12.3.

I requisiti e le prescrizioni riguardanti le istruzioni di lavoro per le analisi immunoematologiche delle donazioni sono indicati nell'articolo 15, punto 15.2.2.

8.2.1.2. Documentazione

Per la documentazione si rimanda all'articolo 15, punto 15.2.2.

8.2.1.3. Responsabilità e competenze (G1)

La direzione del laboratorio è responsabile del rispetto delle disposizioni e dei requisiti legali.

8.2.1.4. Materiali di analisi

8.2.1.4.1. Campioni di sangue dei donatori

Prima del prelievo ogni provetta deve essere contrassegnata in modo univoco con il numero di prelievo e il codice a barre. In caso di etichettatura insufficiente delle provette o della donazione, l'intera donazione deve essere distrutta.

Le analisi devono essere eseguite entro 7 giorni dalla donazione sul campione estratto dalla provetta originale.

Le provette contenenti i campioni (provette originali) devono essere conservate a una temperatura compresa tra + 2° C e + 8° C per eventuali controlli finché tutti i test sierologici del gruppo sanguigno, necessari per la liberazione degli emoderivati, non saranno conclusi e documentati.

8.2.1.4.2. Soluzioni di lavaggio

Per il lavaggio di eritrociti si impiegano tamponi fosfati salini (PBS) con pH compreso tra 7,0 e 7,5 (EDQM).

8.2.1.4.3. Eritrociti-test

a) Controprova serica
Per la controprova serica della determinazione del gruppo ABO si impiegano eritrociti-test dei gruppi A1, B e O. L'uso di eritrociti-test A2 è facoltativo.

b) Ricerca di anticorpi
Gli eritrociti-test usati per la ricerca di anticorpi devono possedere i seguenti antigeni: RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, KEL1, KEL2, FY1, FY2, JK1, JK2, MNS1, MNS2, MNS3, MNS4, LE1, LE2, se possibile RH8 e KEL3 (RhD, C, c, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, M, N, S, s, Le^a, Le^b, se possibile Cw e Kp^a).

La ricerca degli anticorpi può essere svolta con uno o più pool. Un pool non può contenere più di due cellule-test diverse.

8.2.2. Svolgimento delle analisi immunoematologiche

8.2.2.1. **Gruppo sanguigno** ABO

a) Aspetti generali

- Per la determinazione delle caratteristiche del gruppo sanguigno ABO si raccomanda l'uso di sieri-test monoclonali. Nella matrice deve essere incluso un siero di controllo.
- I sieri-test monoclonali usati per la determinazione e il controllo del gruppo sanguigno devono provenire da cloni diversi.

- I sieri-test monoclonali anti-B non devono rilevare un «antigene B acquisito».

b)Prima e seconda donazione

La determinazione del gruppo sanguigno ABO della prima e seconda donazione comprende:

- La determinazione del gruppo sanguigno sugli eritrociti viene svolta con un siero-test ciascuno anti-A, anti-B e anti-AB.
- Sulla prima donazione, il gruppo sanguigno deve essere controllato anche con un secondo siero-test anti-A e anti-B, diverso da quello della prima determinazione.
- La controprova sierica viene svolta con eritrociti-test A1, A2 (facoltativo), B e O.

Risultati dei test e interpretazione:

- I gruppi sanguigni devono essere documentati nella forma semplice «O», «A», «B» o «AB».
- I risultati della seconda donazione devono coincidere con quelli della prima donazione.

Risultati divergenti:

- Se i risultati sono divergenti o dubbi, il gruppo sanguigno non può essere interpretato e i prodotti ottenuti da questa donazione non possono essere liberati finché le discrepanze non saranno chiarite con analisi ampliate.

c) Donazioni multiple (dalla terza donazione)

Il controllo del gruppo sanguigno a partire dalla terza donazione comprende la determinazione del gruppo ABO sugli eritrociti con sieri-test anti-A e anti-B.

Risultati dei test e interpretazione:

- I risultati della determinazione del gruppo sanguigno devono essere documentati nella forma semplice «O», «A», «B» o «AB».
- I risultati della determinazione del gruppo sanguigno devono coincidere con quelli delle donazioni precedenti.

Risultati divergenti:

- Se i risultati sono divergenti o dubbi, il gruppo sanguigno non può essere interpretato e i prodotti ottenuti da questa donazione non possono essere liberati finché le discrepanze non saranno chiarite con analisi ampliate.

8.2.2.2. Determinazione del RH1

a) Aspetti generali

- La determinazione del RH1 deve essere svolta con sieri-test monoclonali. Nella matrice deve essere incluso un siero di controllo.
- Tutti i donatori sierologicamente RH1 negativi devono essere sottoposti una volta a un esame biologico molecolare per accertare la presenza del gene *RHD*.

b) Prima e seconda donazione

La determinazione del RH1 sulla prima donazione comprende:

- La determinazione tramite un siero-test anti-RH1.
- Tutti i donatori RH1 negativi, che sono anche RH2(C) e RH3(E) negativi, devono essere sottoposti una volta a un esame biologico molecolare attraverso una procedura convalidata per accertare la presenza del gene *RHD* (almeno gli esoni 10, 5 e un altro esone o sequenze di introni parallele).
- Tutti i donatori RH1 negativi, che sono RH2(C) e/o RH3(E) positivi, devono essere sottoposti una volta a un esame biologico molecolare, preferibilmente individuale,

attraverso una procedura convalidata per accertare la presenza del gene RHD (almeno gli esoni 10, 5 e un altro esone o sequenze di introni parallele).

La determinazione del RH1 sulla seconda donazione comprende:

- La determinazione tramite un siero-test anti-RH1.
- I risultati della seconda donazione devono coincidere sierologicamente con quelli della prima donazione.

Risultati divergenti:

- Se i risultati sono divergenti o dubbi, la determinazione del RH1 non può essere interpretata e i prodotti ottenuti da questa donazione non possono essere liberati finché le discrepanze non saranno chiarite con analisi ampliate.

c) Donazioni multiple (dalla terza donazione)

La determinazione del RH1 sulla donazione multipla comprende:

- La determinazione tramite un siero-test anti-RH1.
- I donatori multipli che non sono stati mai sottoposti a esame molecolare biologico per accertare la presenza del gene *RHD* vengono sottoposti alla stessa procedura dei primi donatori.

d) Risultati dei test e interpretazione

I risultati delle donazioni multiple devono coincidere sierologicamente con quelli delle donazioni precedenti.

Risultati divergenti:

- Se i risultati sono divergenti o dubbi, la determinazione del RH1 non può essere interpretata e i prodotti ottenuti da questa donazione non possono essere liberati finché le discrepanze non saranno chiarite con analisi ampliate.

e) Procedura da seguire per donatori RH1 negativi con screening molecolare positivo

I donatori sierologicamente RH1 negativi che sono risultati positivi allo screening *RHD* devono essere sottoposti a ulteriori accertamenti con metodi molecolari adeguati per determinare il livello degli alleli *RHD* e devono essere descritti. Il nome degli alleli *RHD e* l'attribuzione dell'allele *RHD* identificato a una determinata «classe» (vedi avanti) sono definiti e referenziati nel «RHD mutation database»: http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/

1. **Classe DEL (class DEL):** l'allele *RHD* è del tipo «DEL»: sierologicamente può essere accertato per lo più solo tramite assorbimento-eluizione. Esempi: *RHD*01EL.08 (RHD*(IVS3+1g>a), *RHD*11 (RHD*weak partial 11, RHD*01EL.01 (RHD*(K409K)).
   Questi donatori che appaiono sierologicamente RH1 negativi devono essere riqualificati – per loro vale il principio: «positivo come donatore, negativo come ricevente».
2. **Classe zero (class null):** l'allele *RHD* è del tipo «zero»: il gene *RHD* è presente ma dal punto di vista fenotopico *non* è individuabile come proteina RH1 specifica o non è affatto espresso come proteina. Gli esempi più frequenti su scala mondiale:
   *RHD*01N.03 (RHD*-CE(2-9)-D), *RHD*01N.04 (RHD*-CE(3-9)-D), *RHD01N.05 (RHD*-CE(2-7)-D), *RHD*08N.01 (RHD*psi), RHD*03N.01*, *RHD*01N.08 (RHD*(W16X)).

Questi donatori sierologicamente RH1 negativi continuano a essere considerati RH1 negativi sia come donatori che come riceventi.

3. **Classe pendente (class pendent):** in questa classe rientrano tutti gli alleli *RHD che non possono essere attribuiti né alla* classe DEL né alla classe zero. Per l'attribuzione alla classe DEL o alla classe zero occorre effettuare un assorbimento-eluizione. **A seconda del risultato il donatore viene attribuito alla classe DEL (eluizione pos.) o alla classe zero (eluizione neg.).**

e) Donazione di sangue autologo

I donatori autologhi RH1 negativi non devono essere sottoposti a esame molecolare.

8.2.2.3. Determinazione dei fenotipi RH/KEL1

a) Aspetti generali

La determinazione dei fenotipi RH/KEL1 deve essere svolta con sieri-test monoclonali. Nella matrice deve essere incluso un siero di controllo.
La determinazione dei fenotipi RH/KEL1 deve essere svolta dalla prima donazione e stampata sull'etichetta.

b) Prima donazione

La determinazione del fenotipo Rhesus RH/KEL1 della prima donazione comprende:

- La determinazione viene volta con un siero-test ciascuno anti-RH2, -RH3, -RH4, -RH5 e -KEL1 (anti-C, -E, -c, -e e -K).

c) Seconda donazione e donazioni multiple

- I donatori multipli di cui non si sono mai determinati i fenotipi RH/KEL1 vengono sottoposti alla stessa procedura dei primi donatori. Ciò vale anche per i donatori multipli i cui referti storici dei fenotipi Rhesus RH/KEL1 non soddisfano più i criteri stabiliti al punto 8.1.1. (sistema di analisi automatico, transfer automatico dei dati).
- I risultati di ulteriori determinazioni dei fenotipi RH/KEL1 devono coincidere con quelli delle donazioni precedenti.

c) Risultati divergenti

- Se i risultati sono divergenti o dubbi, il fenotipo RH/KEL1 non può essere interpretato e i prodotti ottenuti da questa donazione non possono essere liberati finché le discrepanze non saranno chiarite con analisi ampliate.
- Le discrepanze segnalate a Swissmedic devono essere comunicate a T-CH SA.

8.2.2.4. Ricerca di anticorpi

a) Aspetti generali

- I test per la ricerca di anticorpi devono essere condotti su tutti i primi donatori, sui donatori con status di anticorpi non noto e dopo ogni gravidanza e dopo ogni trasfusione di sangue.

b) Metodi

- I metodi impiegati devono essere in grado di rilevare la presenza di anticorpi attivi a una temperatura di 37°C nell'IAT. I metodi di test devono presentare almeno la stessa sensibilità e specificità dei test su provetta nell'IAT.
- I risultati positivi dei test di ricerca degli anticorpi devono essere approfonditi (specificazione degli anticorpi) e interpretati riguardo alla loro rilevanza ai fini trasfusionali.
- L'ulteriore procedura si basa sulle specifiche dei prodotti.
- Gli anticorpi rilevanti dal punto di vista clinico devono essere annotati nella scheda del donatore
- Al donatore deve essere rilasciato un promemoria o una tessera di donatore con indicazione degli anticorpi.

8.2.3. Liberazione del laboratorio

I requisiti tecnici e medici per la liberazione devono essere disciplinati in una SOP.