

## **Procedura nazionale confezionamento, conservazione, trasporto di reni e campioni biologici a scopo di trapianto**

### **1. Premessa**

Il corretto confezionamento e l'ideale conservazione degli organi durante il trasporto rappresentano un fattore determinante, non solo nel minimizzare la possibilità di eventi avversi, in particolare quelli legati a lesioni da congelamento, ma anche per garantire una migliore ripresa funzionale del graft, attraverso la prevenzione del danno da ischemia-riperfusion.

Ad oggi, la modalità di conservazione dei reni usualmente adottata dalla maggior parte delle equipe di prelievo consiste nella classica ipotermia semplice, realizzata con preservazione statica a 4°C (Cold Storage). Una modalità di conservazione alternativa più recentemente adottata è la Hypothermic Machine Perfusion (HMP), la perfusione con la macchina ipotermica, che attualmente è utilizzata in casi sporadici, ed è sicuramente più indicata per organi marginali e/o trasporti di lunga durata, e che, dai dati confortanti della letteratura, troverà verosimilmente maggiore spazio in futuro [5.6].

Il rene può essere conservato in ipotermia statica o ipotermia semplice fino ad un massimo di 24-36 ore, ma la ripresa funzionale dell'organo trapiantato è influenzata significativamente dai tempi di ischemia fredda. Infatti, il danno cellulare provocato dall'ipotermia peggiora con l'aumentare dei tempi di ischemia fredda per cui tale periodo dovrebbe essere ridotto al minimo. [2]

Inoltre una idonea conservazione durante il trasporto rappresenta un obiettivo fondamentale affinché non si interrompa la "catena del freddo", garantendo una temperatura idonea ed adeguata.

L'ipotermia rappresenta un fattore essenziale per la protezione dei reni, ed inizia durante il prelievo al momento della perfusione, con l'iniezione di un'idonea soluzione fredda (Belzer o Celsior, le più utilizzate) nel circuito vascolare arterioso degli organi da prelevare.

Il danno da ischemia è conseguente all'anossia/ipossia tissutale determinata da inadeguata perfusione degli organi da parte di sangue ossigenato. Distinguiamo l'ischemia calda, nella quale

non è presente abbassamento della temperatura, dall'ischemia fredda, in cui si abbassa la temperatura per rallentare il metabolismo cellulare e proteggere l'integrità del parenchima e quindi la funzionalità d'organo.

L'ischemia calda viene distinta in ischemia calda primaria ed in ischemia calda secondaria.

L'ischemia calda primaria è il periodo che intercorre dall'interruzione del flusso ematico all'inizio della perfusione che determina la progressiva riduzione della temperatura. L'ischemia calda secondaria, successiva all'ischemia fredda, è il tempo che intercorre da quando l'organo viene prelevato dal contenitore in ipotermia sino a quando viene rivascolarizzato nella fase di trapianto.

**L'ischemia calda** comporta una alterazione del metabolismo tessutale per deficit di ossigeno ed accumulo di cataboliti tossici con impatto negativo sulla funzionalità del graft.

**L'ischemia fredda** si ottiene, al contrario, con la perfusione dell'organo con soluzione fredda durante il prelievo e dopo il clampaggio, con l'aggiunta di ghiaccio tritato sterile che posizionato nell'addome del donatore, svolge un'azione topica sinergica di raffreddamento ("topic cooling") (2). In una fase successiva l'ipotermia viene garantita con il posizionamento del rene in ghiaccio non sterile aggiunto nel contenitore di trasporto.

In effetti l'ischemia fredda, pur proteggendo le cellule e rallentando il metabolismo intracellulare, determina anch'essa un deterioramento dello stato della vitalità tessutale.

Risulta pertanto evidente come l'ischemia fredda, di conseguenza, debba essere limitata nel tempo e che l'intero processo di conservazione e trasporto in ipotermia semplice (cold storage) debba essere ben codificato per mantenere inalterate caratteristiche istologiche e di funzionalità.

## **Metodologia**

In seguito all'analisi dei dati pervenuti da una ricognizione nazionale delle procedure di confezionamento, conservazione e trasporto dei reni, effettuata nel novembre scorso con il contributo dei Centri Regionali per i Trapianti (CRT), il Centro Nazionale Trapianti ha evidenziato evidenti disomogeneità metodologiche e procedurali per ciò che concerne le varie fasi del suddetto processo.

Per questa ragione, il CNT ha ravvisato la necessità di costituire un gruppo di lavoro su tale problematica, con il compito di stilare una proposta di procedura essenziale, di facile applicazione, rispondente a requisiti minimi di sicurezza, nelle more dell'attuazione della legislazione vigente Rep atti 55/ Conferenza stato regioni del 25 marzo 2015 [1], basata sulle linee guida EDQM 2018 [2].

Il gruppo ha prodotto una sintesi delle esperienze delle varie realtà regionali, con l'obiettivo di armonizzare i processi in esame e raggiungere l'obiettivo di una maggiore uniformità su tutto il territorio nazionale.

## **Modalità operative**

### **Fasi del confezionamento**

Al termine del prelievo, il rene, adagiato in una bacinella reniforme con ghiaccio tritato sterile o in alternativa in assenza di ghiaccio sterile su garze laparotomiche impregnate di soluzione fisiologica fredda, viene attentamente ispezionato e preparato dai chirurghi esecutori del prelievo, con rimozione del grasso perirenale necessaria al fine di identificare la presenza di lesioni sospette del parenchima; terminata questa importante e delicata fase, si procederà al confezionamento. Le operazioni di confezionamento sono responsabilità dei chirurghi che hanno operato il prelievo e sono parte integrante delle operazioni di prelievo. Si distinguono due fasi:

#### **I FASE**

Non è consigliato utilizzare garze e/o teli per proteggere l'organo.

1.1.1.1. Riporre il rene in un primo sacchetto di cellophane sterile con aggiunta di almeno 600 ml (quantità per un rene di dimensioni normali) di soluzione di perfusione fredda utilizzata durante il prelievo (Belzer/Celsior). Eliminata l'aria, chiudere il sacchetto con cura con apposito laccetto. La quantità di soluzione è ritenuta mandatoria ed indispensabile al fine prevenire il contatto diretto del rene con il ghiaccio che successivamente verrà collocato all'interno del contenitore di trasporto.

- a) La quantità di soluzione di perfusione dovrà necessariamente essere aumentata di almeno 400 ml (1000 ml complessivi) nel caso in cui non sia stato possibile asportare il grasso perirenale per motivi tecnici o per motivata richiesta del centro trapianti titolare del rene.
- b) La quantità di liquido di perfusione dovrà essere almeno di 1200 ml in caso di reni en-bloc.

1.1.1.2. Introdurre il primo sacchetto in un secondo sacchetto di cellophane sterile con aggiunta unicamente di un sottile film di liquido di perfusione o soluzione cristalloide (circa 50-70 ml). Eliminata l'aria, chiudere il sacchetto con apposito laccetto.

1.1.1.3. Introdurre infine il secondo sacchetto in un terzo sacchetto sterile vuoto senza aggiunta di liquido e/o ghiaccio, eliminata l'aria chiudere il sacchetto con cura con apposito laccetto.

Questi 3 passaggi sono necessari a garantire una tripla barriera di sterilità (2).

L'eliminazione dell'aria all'interno dei sacchetti è di fondamentale importanza in particolar modo se il rene dovrà essere trasportato con mezzo aereo poiché in quota la presenza di aria all'interno del sacchetto con l'aumento della pressione potrebbe provocare lesioni traumatiche dell'organo (2).

Tale modalità di confezionamento, nelle more dell'applicazione delle indicazioni contenute nel documento Conferenza Stato-Regioni 55/ 2015, ha garantito a tutt'oggi adeguati standard di sicurezza per ciò che riguarda la protezione meccanica dell'organo non essendo stati registrati eventi avversi di questo tipo, sebbene sia auspicabile quanto prima adeguarsi alla normativa prevedendo l'introduzione in questa fase di un contenitore rigido validato per l'uso in almeno una barriera di sterilità.

1.1.1.4. Apporre sul terzo sacchetto etichettatura che indichi il tipo di organo e lateralità.

Il materiale dei sacchetti dovrebbe essere inerte, impermeabile, sterile e validato per l'uso specifico (1,2).

## **1.1.2. II FASE**

L'organo così confezionato va riposto all'interno di un contenitore delle dimensioni suggerite comprese tra 22 e 24 litri di capacità idonea sia per il trasporto di un rene sia per il trasporto di 2 reni singoli o en-bloc.

### **1.1.2.1. Caratteristiche inderogabili del contenitore di trasporto [1]**

- a) Struttura rigida (a garanzia della protezione meccanica)
- b) Buon grado di isolamento termico e stabilità termica di lunga durata (24-36 ore)
- c) Chiusura di sicurezza per scongiurare l'apertura involontaria ed ermetica per evitare fuoriuscita di liquido all'esterno.
- d) Maniglie di trasporto.

*È consigliabile in caso di utilizzo di frigobox, dotato di maniglie di trasporto e sigillato con nastro adesivo o cerotto (evitare contenitori di Polistirolo) rispondenti ai suddetti requisiti, prevedere la loro progressiva sostituzione nelle more dell'applicazione della normativa con contenitori certificati che rispondano a caratteristiche riferibili alla categoria dei dispositivi medici di classe A09[1,2,3].*

**In attesa della sostituzione frigoriferi con a09, sono consentiti frigobox descritti in precedenza.**

**1.1.2.2. Caratteristiche del ghiaccio da utilizzare per la conservazione del rene nel contenitore di trasporto**

Il ghiaccio utilizzato deve rispondere alle seguenti caratteristiche:

- a) unicamente in scaglie di piccole dimensioni o granulare, non sterile, generato da una macchina ad una temperatura tra 0 e -4 gradi C° [2] (ghiaccio fondente). Non utilizzare ghiaccio conservato in freezer a temperature inferiori ai - 4°C;
- b) la quantità ideale dovrebbe essere orientativamente pari al doppio del peso dell'organo confezionato nei sacchetti o comunque una quantità equivalente a 1/2 del contenitore;
- c) l'organo non deve stare mai a contatto diretto con il ghiaccio, si suggerisce di creare una piccola area concava nel ghiaccio dove posizionare il rene/i.

NON è raccomandato l'impiego di altro tipo di ghiaccio sia per quanto attiene alle dimensioni e caratteristiche (siberini, confezioni di soluzione fisiologica ghiacciate) sia per quanto attiene alla temperatura.

Nel caso in cui nella sede donativa non sia possibile garantire, per motivi logistico-organizzativi, la disponibilità dei suddetti materiali ed il rispetto delle suddette indicazioni, si raccomanda di aggiungere nel primo sacchetto una maggiore quantità di soluzione di perfusione circa 1000-1100 ml ritenuti sufficienti a creare una camera di protezione termica di maggior spessore utile in ogni caso a bilanciare gli effetti di un confezionamento non ottimale.

**La temperatura ideale da garantire durante il trasporto è compresa tra 1 e 6 C° [2].**

È auspicabile e di fondamentale importanza a tal proposito la progressiva introduzione di sistemi di monitoraggio continuo della temperatura interna del contenitore durante il trasporto.

Tali sistemi, già in fase di sperimentazione in alcune regioni italiane, hanno buona affidabilità, risultano essere di semplice applicazione e basso impatto economico. Si tratta di dispositivi USB sterili, monouso che devono essere collocati nel terzo sacchetto contenente l'organo, che registrano costantemente i dati relativi alla temperatura registrata durante tutto il tragitto. All'arrivo tali dati dovranno essere scaricati con ausilio di un computer.

Nel caso in cui sia necessario inviare grafts vascolari per esigenze di tecnica chirurgica, i reperti stessi dovranno essere posizionati in triplo sacchetto con aggiunta di liquido di perfusione nel primo ed inseriti con le stesse modalità nello stesso contenitore dell'organo.

### **1.1.2.3. Chiusura del contenitore che viene sigillato con nastro adesivo o cerotto Apposizione di etichettature ben visibili sul contenitore**

Sull'etichetta devono essere riportate le seguenti informazioni:

- a) Tipo di organo e lateralità
- b) Fragilità del contenuto (**Contiene Organo**),
- c) Senso di orientamento del contenitore durante il trasporto (**Adesivi Con Freccie**)

Modalità di trasporto (Temperatura ambiente/ Non stivare /Non congelare)

- d) Recapiti dei referenti del coordinamento locale di prelievo e di destinazione
- e) Indirizzo di destinazione del Centro Trapianti e referente.

***Si precisa che qualunque etichettatura posta sul contenitore esterno deve garantire l'anonimato del donatore.***

**NB Allegare Necrokidney compilato in tutte le parti e firmato dai chirurghi e dal coordinatore locale in busta chiusa ben assicurata alla superficie esterna del contenitore stesso.**

### **1.1.3. Confezionamento Materiale biologico (materiale immunologico- biopsie renali)**

Un corretto metodo di confezionamento va riservato necessariamente anche al materiale biologico inviato con i reni quali provette di sangue, linfonodi, milza, biopsie, indispensabile per procedere al trapianto.

La normativa vigente [4] per il trasporto di materiale biologico infettante prevede un triplo imballaggio formato da:

- a) Contenitore interno o primario
- b) Contenitore secondario o intermedio
- c) Contenitore terziario o esterno

### **1.1.3.1. Confezionamento Materiale immunologico**

Riporre linfonodi e milza in un contenitore (primario) rigido sterile (tipo contenitore per urinocoltura/ pezzi istologici) con aggiunta di soluzione fisiologica. Apporre etichettatura con dati identificativi. Tale contenitore va riposto in un contenitore secondario (tipo trans-bag o altro contenitore a chiusura di dimensioni maggiori).

Le provette contenenti sangue (contenitore primario) devono essere necessariamente etichettate con dati identificativi del donatore.

Le provette successivamente vanno riposte con sufficiente materiale assorbente per evitare dispersione in caso di rottura accidentale (cotone/garze o materiale simile) all'interno di un contenitore secondario (trans-bag, sacchetti ad uso specifico).

Nell'ultima fase i contenitori contenenti provette, milza e linfonodi andranno riposti in un contenitore terziario rigido sul quale andranno riportate le modalità di trasporto e gli indirizzi di destinazione e recapiti mittente (secondo indicazioni riportate paragrafo 2.1.2.3).

### **1.1.3.2. Biopsie renali**

I campioni istologici vanno riposti in un contenitore rigido dedicato con aggiunta di eventuali liquidi di conservazione secondo le modalità indicate dal servizio di Anatomia Patologica responsabile della refertazione dei reperti istologici.

Apporre etichette sul contenitore che indichino dati del donatore, organo, lateralità e numero di biopsie.

Introdurre il contenitore all'interno di un altro contenitore di caratteristiche simili (secondario) ed infine in un terzo contenitore di trasporto dell'organo (terziario) dove verranno riportate modalità di trasporto, indirizzo di destinazione e recapito mittente (secondo modalità indicata al paragrafo 2.1.2.3).

Tutti i centri regionali daranno massima diffusione di tale documento a tutte le sedi donative dove dovrebbe essere già a disposizione e/o dovrebbe essere possibile integrare il suddetto materiale da fornire alle equipe di prelievo.

In caso di mancanza temporanea e/o assenza dei suddetti presidi sarebbe auspicabile un contatto tra i coordinamenti locali e regionali al fine di dare supporto al team chirurgico.

## **Materiale necessario presso la sala operatoria sede di donazione**

- a) Sacchetti di cellophane sterili, impermeabili, di materiale inerte, ad uso validato di dimensioni adeguate;
- b) Soluzione di perfusione (Belzer, Celsior);
- c) Ghiaccio tritato sterile;
- d) Ghiaccio non sterile in scaglie o granulare a temperatura compresa tra 0 e -4 gradi (ghiaccio fondente);
- e) Contenitore a struttura rigida capacità 22-24 Lt (Frigobox con requisiti corrispondenti a contenitori CDN categoria A09 [3]) con buona termoregolazione e stabilità termica di lunga durata, dotato di maniglie per trasporto, dotato di doppia chiusura;
- f) Contenitori rigidi di varie dimensioni per materiale immunologico, materiale istologico (biopsie);
- g) Sacchetti con chiusura ad uso validato tipo trans-bag;
- h) Etichettature adesive di varie dimensioni;
- i) Nastro adesivo o cerotto
- j) Sistema di monitoraggio temperatura (in via di definizione)
- k) Modulistica (Necrokidney, esame istologico etc)

In caso di indisponibilità di alcuni dei presidi indicati nella dotazione della sala operatoria sede del prelievo, questi potranno essere forniti da parte dell'equipe chirurgica del centro trapianti previa tempestiva comunicazione. Detta comunicazione dovrà essere inoltrata dal coordinamento locale al proprio CRT, che provvederà ad informare il centro trapianti coinvolto nel prelievo.



## Referenze

1. *Rep atti 55/ Conferenza Stato Regioni del 25 marzo 2015 “Revisione e aggiornamento dell'Accordo CSR del 21 dicembre 2006 sul coordinamento dei trasporti connessi con le attività trapiantologiche”;*
2. *Guide to the quality and safety of organ to Transplantation. EDQM 7° Edizione 2018*
3. *Direttiva 93/42/CEE CND D.M. 13.03.2018.*
4. *Circolare 08 maggio 2003 Ministero della Salute*
5. *Moers C, Pirenne J, Paul A et al. Machine perfusion or cold storage in deceased donor kidney transplantation. N England J Med 2012; (366): 770-1.*
6. *Watson C, Wells A et al. Cold Machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized control trial. Am. J. Transplant 2010; (10): 1991-9.*