

Prova pratica: come affrontare l'emergenza in criopreservazione

17° corso SIDEM
Palermo, 20 ottobre 2012

Claudia Del Fante

Servizio di Immunoematologia e Trasfusione

Sezione di Aferesi

IRCCS Policlinico S.Matteo

Pavia



Criopreservazione



Manipolazione cellulare minima

Criopreservazione

obiettivi :

- Recupero, dopo stoccaggio a temperature inferiori a 0°C, di **cellule di qualità elevata** (vitalità e funzione biologica conservate, sterilità)
- Possibilità di **conservare nel lungo periodo** (teoricamente a tempo indefinito) cellule o tessuti (prevenzione del danno da ricristallizzazione)
- Utilizzo di **sostanze criopreservanti** a bassa o nulla tossicità per il ricevente
- Riduzione degli **spazi “freddi”**
- Riduzione dei **costi**
- Riduzione dei **tempi di manipolazione** pre-stoccaggio

Materiale biologico criopreservabile

- **Cellule staminali** (sangue cordonale, periferico, midollare)
- Emocomponenti (plasma, piastrine, globuli rossi, linfociti)
- tessuti (cornea, pelle, osso cartilagine)
- epatociti, isole pancreatiche, ovociti, sperma
- embrioni
- valvole cardiache
- cellule tumorali

Criopreservazione: principi

- Mantenimento dell'integrità cellulare impedendo la formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio
- Impiego della miscela criopreservante ideale per ciascun tipo di prodotto
- Utilizzo della curva di congelamento (cooling rate) ottimale per ogni prodotto da criopreservare

Principali sostanze criopreservanti

- **Dimetilsulfossido (DMSO)**
- **Glicerolo**
- **Idrossietilstarch (HES)**
- **Proteine plasmatiche**
- **Zuccheri (0,35M-sucroso, glucosio, mannitolo, sorbitolo)**

DMSO

- Protegge la cellula da eccessiva disidratazione durante la fase di cristallizzazione extracellulare
- Concentrazione ottimale per il congelamento di cellule staminali: dal 10% al 5%.
- Nessuna differenza in termini di recupero e clonogenicità delle cellule CD34+ per concentrazioni DMSO > 10%

Bakken AM. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:47-54.
Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol* 2007;82:463-72.
Donaldson C, Armitage WJ, Denning-Kendall PA, Nicol AJ, Bradley BA, Hows JM. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:725-31.
Fleming KK, Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci* 2006;34:309-15.

Congelamento

Processo fisico dipendente dalle proprietà della sostanza da congelare e dalla differenza di temperatura fra la sostanza e l'ambiente circostante, dal volume della sostanza e dalla sua conduttività termica

Metodi di congelamento

- **Diretto**, ponendo il prodotto a -80°C con successivo trasferimento a -140°C per la conservazione
- **A discesa programmata** (velocità di congelamento $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ differenti, in dipendenza del materiale biologico da congelare e dalla sostanza criopreservante utilizzata)

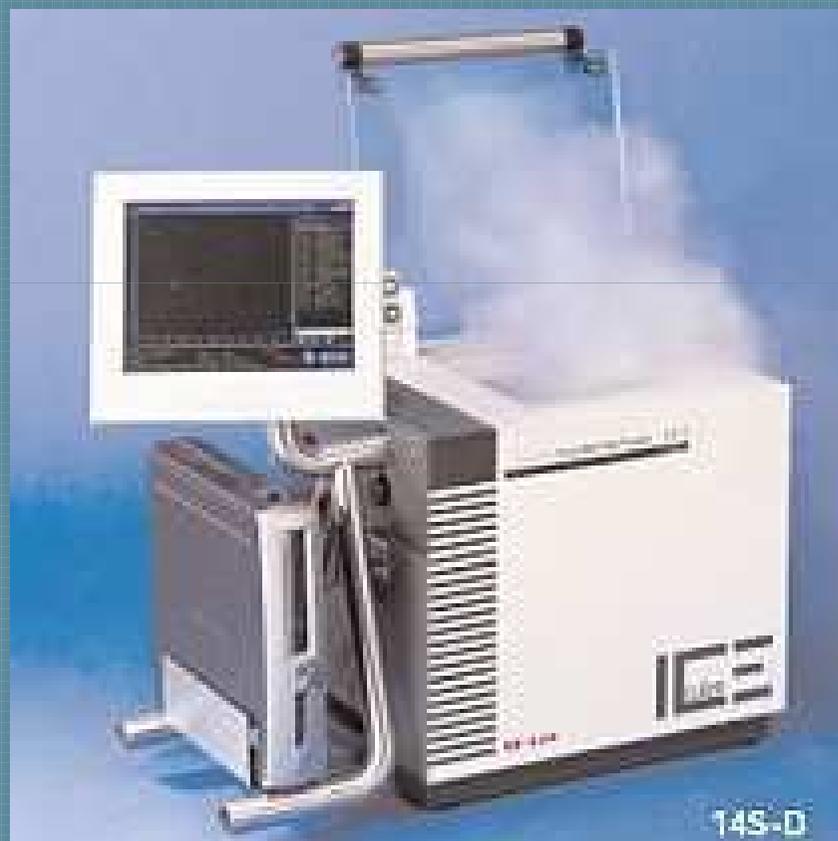


conservazione in contenitori criogenici (azoto liquido o vapori di azoto) a temperature -140°C o inferiori

Congelamento a discesa programmata: razionale

- La lenta discesa della temperatura ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) limita la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari e la conseguente rottura meccanica della cellula allo scongelamento
- Rintracciabilità e riproducibilità di tutte le fasi del processo di congelamento

congelatore a discesa
programmata



SIDEM 20/10/2012

Sample / Patient: LKF
 Sample ID:

Operator:
 Freezing program: Programma5.frz
 Program date: 14.10.2009 18:05:12

Device type: 140
 Version no.: V.1.10
 Serial number: 149F102A044810

Memo1: 11024863

Memo2:

Listing of Freezing program

Step	EndTemp [°C]	AbsTime [min.]	Rel.Temp [°C]	Rel.Time [min.]	Slope [°C/min]
0	4.00	0.00			
1	-2.00	6.00	-8.00	6.00	-1.00
2	-7.00	9.85	-5.00	3.85	-1.30
3	-33.00	10.85	-26.00	1.00	-26.00
4	-33.00	12.85	0.00	2.00	0.00
5	-25.00	13.85	8.00	1.00	8.00
6	-22.00	16.85	3.00	3.00	1.00
7	-28.00	22.85	-6.00	6.00	-1.00
8	-60.00	48.85	-52.00	26.00	-2.00
9	-150.00	62.85	-70.00	14.00	-5.00

Event list of program execution time

EventTime [min.]	Duration [min.]	Description
0.00		Fan on
62.85		Program Thru
62.87		Blower on
67.37		Slope proceed
67.38		Fan off
67.38		Blower off
67.38		Program stopped

Autosweeping: disabled

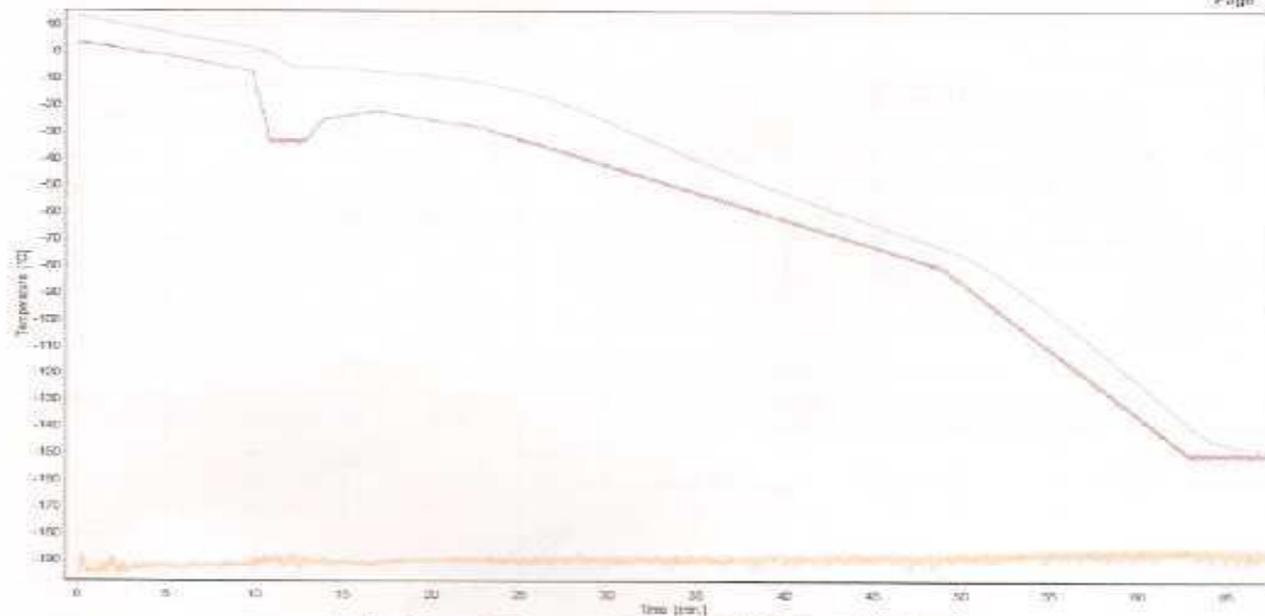
Autobigger: disabled

Fail/Restart Critical temperature range: -15.00 to 5.00 °C
 Critical time range: 15.00 to 60.00 sec
 maximum noncritical power fall time: 5 sec
 Restart Temperature: preset temperature of -20.00 °C

Program: Programma5.frz

Operator:

LKF_2011-09-16_12:37:48.PRC



Congelamento delle cellule staminali (prodotto unico ed irripetibile)

- Concentrazione cellulare: $\leq 300.000/\mu\text{L}$
(ottimizzazione del recupero cellulare post-scongelamento)
- Volume finale del prodotto (dipendente dall'affollamento cellulare di partenza e dal programma trapiantologico)
- Ottimale il congelamento a discesa programmata

La criopreservazione ideale: obiettivi

- Mantenere la qualità delle cellule staminali (numero, vitalità e potere clonogenico) da trapiantare
- Abolire la tossicità da DMSO
- Ridurre i costi ed i tempi di congelamento evitando l'utilizzo del congelatore a discesa programmata

Criopreservazione di cellule ad uso trapiantologico

- cellule staminali periferiche (leucaferesi), midollari e cordonali
- cellule staminali immunoselezionate
- linfociti
- monociti-cellule dendritiche

Cellule staminali: valutazione della corretta conservazione

Pre- trapianto:

- “Vial test”: valutazione di numero e vitalità (7-AAD, Tripan blu, Propidio ioduro) delle cellule CD34+
- Test clonogenici in vitro (colture cellulari a breve termine)
- Sterilità

Trapianto:

- Il vero controllo di qualità rimane l'attecchimento!

Riduzione di volume vantaggi:

- Minor quantità di DMSO (minor tossicità cellula staminale, costi ridotti)
- Impiego di plasma autologo
- Abolizione del lavaggio post scongelamento
- Riduzione degli effetti collaterali post-infusione (DMSO, volume)
- Riduzione degli spazi freddi
- Mantenimento di elevata qualità del prodotto
- Riduzione dei costi

Manipolazione cellule staminali midollari

- Deeritrocitazione mediante gradiente di densità (ficoll) o centrifugazione (IBM 2991)
- Cell washer (sistema chiuso di lavaggio-concentrazione)
- Cobe Spectra (sistema chiuso di lavaggio-concentrazione mediante separatore cellulare)

Vantaggi

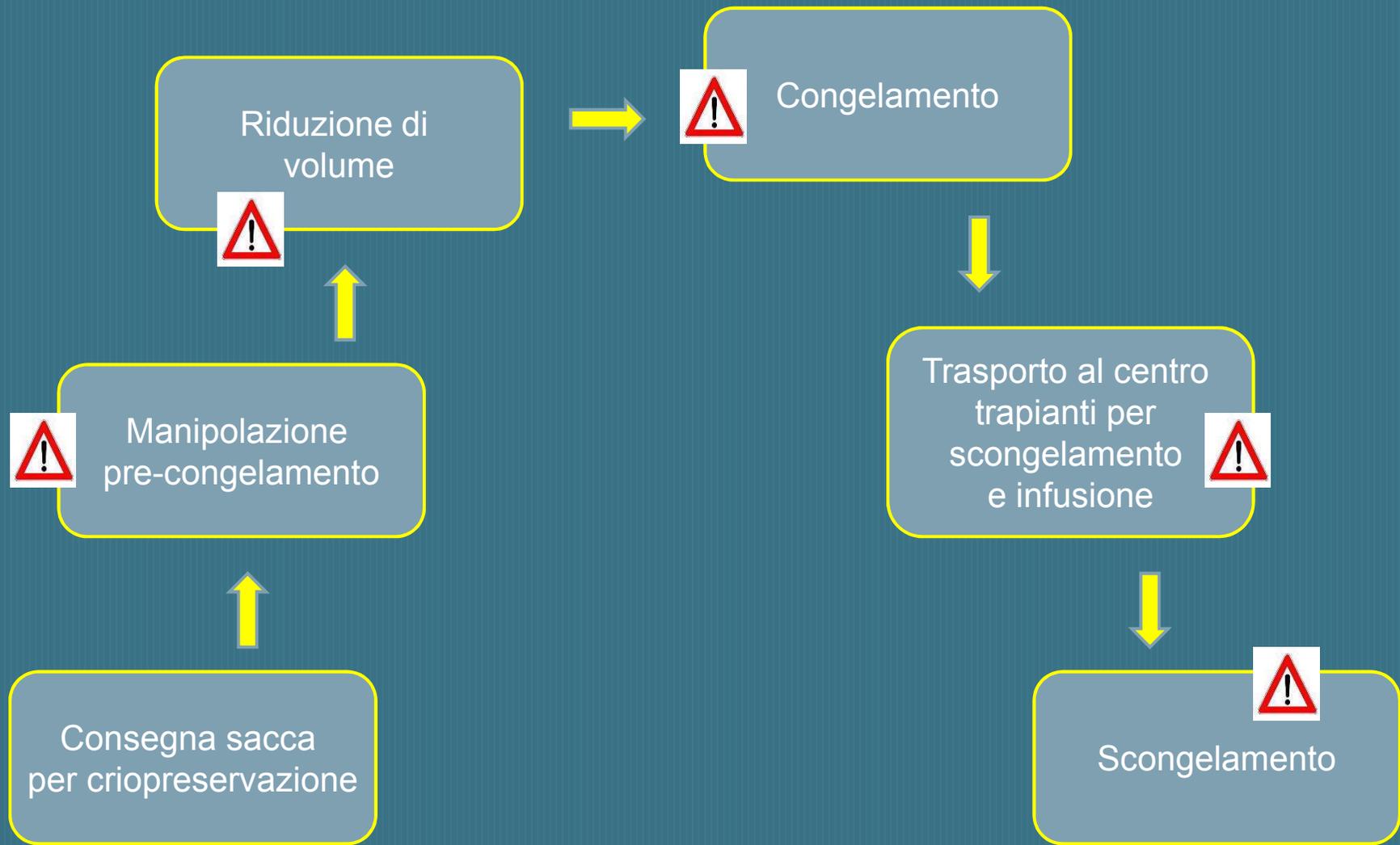
- Riduzione dei rischi da emolisi
- Minor volume infuso
- Minor rischio di contaminazione con i nuovi sistemi di manipolazione pre-congelamento rispetto al ficoll

Criopreservazione linfociti

- Stoccati in piccole aliquote in base alle esigenze cliniche (DLI, educazione anti-EBV, anti CMV, anti Polioma virus, transfer genico? Terapia antitumorale?)

Vantaggi

- Possibilità di utilizzare solo le quantità cellulari necessarie per gli scopi clinici
- Possibilità di criopreservare in piccoli volumi sottopopolazioni linfocitarie selezionate per immunoterapia
- Possibilità di istituire una banca

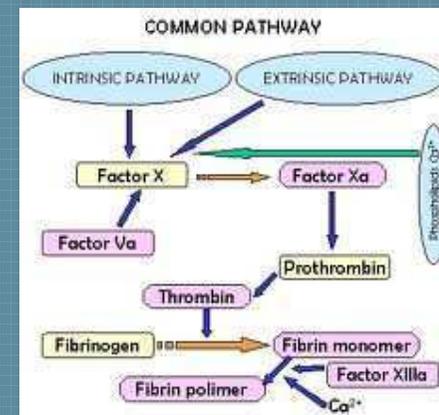


Emergenze in criopreservazione

- Coagulazione del prodotto
- Mancata disponibilità di contaglobuli e/o citofluorimetro
- Rottura della sacca di criopreservazione
- Interruzione del congelamento a discesa programmata
- Rottura dei contenitori per lo stoccaggio a lungo termine
- Incidenti a carico dell'operatore

Coagulazione del prodotto

- **Repentino** innesco del processo di coagulazione, più frequentemente durante le prime fasi di manipolazione
- **Cause:** scarsa anticoagulazione del prodotto, caratteristiche peculiari della patologia da cui è affetto il paziente (PBSC)



Come evitare di perdere il prodotto

Agire immediatamente !!

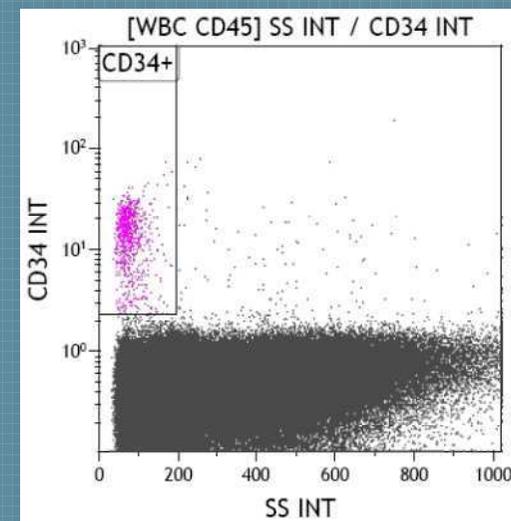
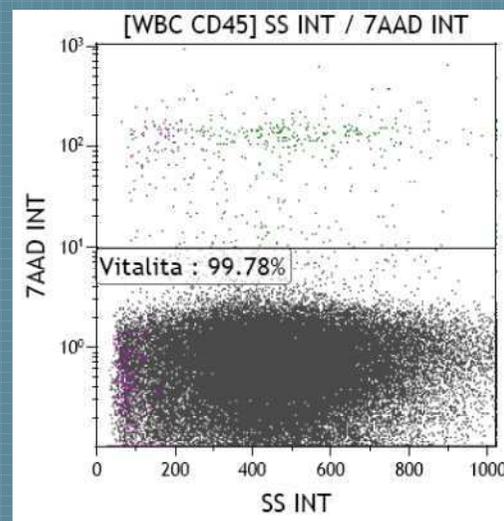
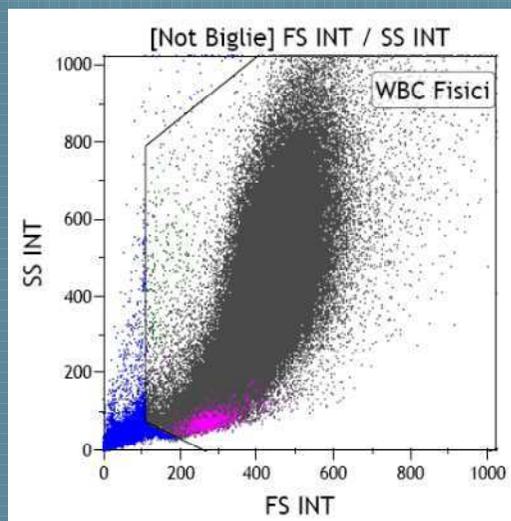
1. Filtrare il prodotto
2. Diluire con ACD-A (10% del volume finale)

Rischio di contaminazione!



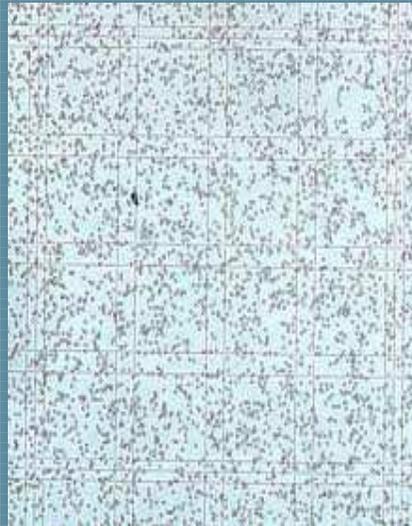
Controlli di qualità post filtrazione pre-congelamento

- Campione per conta cellulare
- Analisi citofluorimetrica per vitalità, CD34

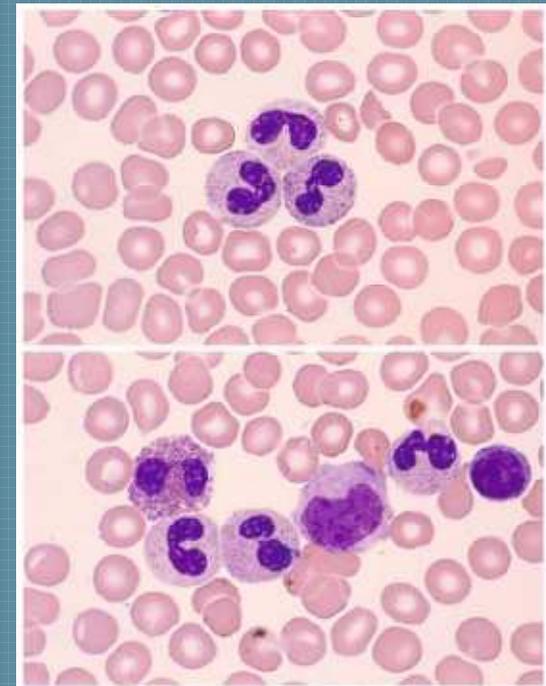


Mancata disponibilità di contaglobuli e/o citofluorimetro

conta cellulare in
camera di Burker



conta mononucleate:
striscio e colorazione
May Grumwald Giemsa



Rottura sacca di criopreservazione

- Relativamente frequente (1,5-10%)
- Critici criopreservazione e scongelamento
- Cause più frequenti:
 - Errata saldatura
 - Danno da azoto liquido
- Conseguenze : perdita del prodotto
- Utile doppio involucro!!!

Khuu HM, Cowley H, David-Ocampo V, Carter CS: Catastrophic failures of freezing bags for cellular therapy products: description, cause, and consequences. *Cytotherapy* 2002; 4:539-549.

Mele L, Dallavalle FM, Verri MG, Balza G, Allione B, Salvi F, Levis A, Caraccio V, Borzini P: Safety control of peripheral blood progenitor cell processing-eight year-survey of microbiological contamination and bag ruptures in a single institution. *Transfus Apher Sci* 2005; 33:269-274.

A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experience

L. Abbruzzese,¹ M. Michieli,² M. Rupolo,² R. Tassan Toffola,³ A. Da Ponte,³ F. M. Rossi,⁴ D. Lorenzon,⁴ C. Simonelli,⁵ V. Gattei,⁴ L. De Marco³ & M. Mazzucato¹

¹Department of Laboratory Medicine and Cell Therapy, Hematopoietic Stem Cells Collection and Processing Unit, C.R.O. National Cancer Institute–IRCCS Aviano, Italy

²Department of Medical Oncology, Clinical Transplant and Cell Therapy Unit, C.R.O. National Cancer Institute–IRCCS Aviano, Italy

³Department of Laboratory Medicine and Cell Therapy, Blood Bank and Clinical Pathology, C.R.O. National Cancer Institute–IRCCS Aviano, Italy

⁴Department of Laboratory Medicine and Cell Therapy, Clinical and Experimental Onco–Hematology Unit, C.R.O. National Cancer Institute–IRCCS Aviano, Italy

⁵Department of Medical Oncology, Clinical Oncology, C.R.O. National Cancer Institute–IRCCS Aviano, Italy



Fig. 2 Photograph of a typical bag rupture before thawing. This problem has influenced our decision to abandon the classical bag cryopreservation method (single-bag) in infected patients with cancer.

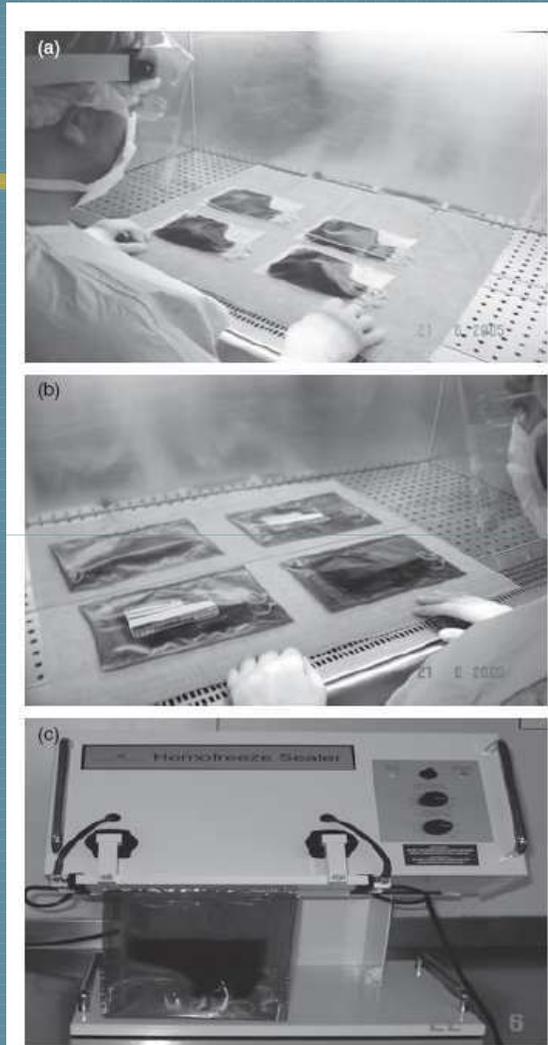


Fig. 1 (a,b,c). Stem cell processing with a double-bag container. The double-bag is applied under sterile condition and then sealed. The potential rupture of the internal bag does not preclude the product from being lost and sterility is safe.

Interruzione del congelamento a discesa programmata

interruzione elettrica



rete stabilizzata e
sotto inverter

guasto congelatore



congelatore sostitutivo

■ **Conseguenze:**

- Riduzione parziale o completa della cellularità e vitalità
Depositare le sacche in contenitore di polistirolo o simile in congelatore a -80°C e successivamente a temp <-140°C

Controlli di qualità su vial

Rottura contenitori criogenici per lo stoccaggio a lungo termine

- Trasferimento in altro contenitore

Eventi catastrofici



Disaster plan



Incidenti a carico dell'operatore

- Se contatto accidentale con materiale da criopreservare: rischio di contrarre malattie infettive
- Se danni da contatto con azoto liquido (ustione) o in fase gassosa (intossicazione fino alla perdita di conoscenza)



seguire iter previsto dai modelli comportamentali standardizzati Servizio di Protezione e Prevenzione.

Grazie per l'attenzione



SIDEM 20/10/2012