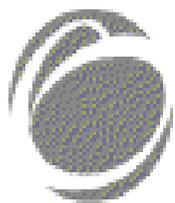




HPC-A E HPC-M: MODALITA' DI DECONGELAMENTO E CONTROLLI DI QUALITA'

Arianna Incontri

UOS Aferesi e Nuove Tecnologie Trasfusionali - SIMT
AO San Gerardo - Monza



Azienda
Ospedaliera
San Gerardo



INTRODUZIONE

Procedure per testare i prodotti cellulari

- Sicurezza
- Vitalità
- Integrità
- Specifiche necessarie per il rilascio



Importante che il laboratorio sia avvisato con anticipo

Verifiche preliminari e controlli di qualità

GARANTIRE IL TRAPIANTO IN SICUREZZA!

INTRODUZIONE

VERIFICHE PRELIMINARI

- Controllo delle condizioni di stoccaggio
- Verifica dello stato di rilascio
- Necessità di manipolazioni

CONTROLLI DI QUALITA'

- Integrità delle sacche
- Vitalità cellulare
- Saggi clonogenici

MODALITA' DI DECONGELAMENTO

- Scongelamento
- Manipolazioni
- Infusione

VERIFICHE PRELIMINARI

CONDIZIONI DI STOCCAGGIO



Le corrette condizioni di stoccaggio devono essere assicurate da un sistema di riempimento automatico e di allarmi remotizzati

Piani di emergenza e Disaster Plan

Controllo quotidiano

Verifica relativa al periodo di stoccaggio



Mantenimento della catena del freddo (<-150°C)

VERIFICHE PRELIMINARI

STATO DI RILASCIO

Controllare lo stato di rilascio

→ Controlli di qualità pre-congelamento

Comunicare eventuali rilasci eccezionali

Controlli di sterilità positivi

Identificazione e antibiogramma

Intervenire con profilassi antibiotica



VERIFICHE PRELIMINARI

Az. Ospedaliera San Gerardo di Monza Servizio Immunotrasfusionale UOS Aferesi e Nuove Tecnologie Trasfusionali		Modulo	Rev. 0	Pag. 1/1
		Comunicazione stato di rilascio unità criopreservate	PAC-SIT-AFE-MO-078	
PAZIENTE		NATO IL		
PRODOTTO		UNITA'		
		SPECIFICA	RISULTATO	
Vitalità pre-congelamento		>95%		
Sierologia (solo se allogeneico)		NEG		
CD34+/trapianto		>2x10 ⁶ /Kg		
Controlli sterilità pre-congelamento		NEG		
Presenza aggregati cellulari visibili		NO		
Rottura sacca		NO		
Criopreservazione conforme		SI		
Altro		NO		
Stato di rilascio dell'unità:			Data	
<input type="checkbox"/>	Rilasciabile			
<input type="checkbox"/>	Rilasciabile con rilascio eccezionale			
<input type="checkbox"/>	Non rilasciabile			
Il medico dell'unità di Aferesi		Il trapiantologo		
<p>_____</p> <p>Tenere una copia in cartella e rimandare l'originale al Settore Aferesi</p>				
Solo in caso di rilascio eccezionale:		Firma trapiantologo		
<input type="checkbox"/>	Si accetta l'unità			
<input type="checkbox"/>	Si respinge l'unità			
In caso l'unità venga respinta si chiede cortesemente di autorizzarne l'eliminazione.				
Data	Descrizione	Redatto	Verificato	Approvato
27/08/12		Incontri	Poggio Perseghin	Rovelli

Az. Ospedaliera San Gerardo di Monza Servizio di Immunematologia UOS Aferesi e Nuove Tecnologie Trasfusionali		Modulo	Rev. 1	Pag. 1/1
		Rilascio eccezionale di cellule staminali emopoietiche/prodotti cellulari	PAC-SIT-AFE-MO-030	
Si autorizza il rilascio eccezionale, a scopo di infusione, della seguente unità:				
Codice _____				
Tipo prodotto _____				
Data raccolta _____				
Donatore _____				
Ricevente _____				
Non conformità riscontrate nell'unità:				
<ul style="list-style-type: none"> o esami di legge positivi (vedi referto allegato) o esami colturali per ricerca batteri aerobi, anaerobi e miceti positivi (vedi referto allegato) o rottura sacca o altro _____ 				
Note _____				

Data _____				
Il direttore Medico Dr. Paolo Perseghin				
Data	Descrizione	Redatto	Verificato	Approvato
18/04/2010		INCONTRI	POGGIO	PERSEGHIN

VERIFICHE PRELIMINARI

VOLUME E QUANTITA' DI DMSO

Volume totale da infondere (evitare il sovraccarico)

Eventuale presenza di plasma incompatibile

Quantità di DMSO presente → 10% del volume finale



Dose massima
1ml/kg

Dividere l'infusione in più giorni

Rimuovere il DMSO/ridurre il volume

CONTROLLI DI QUALITA'

INTEGRITA' DELLE SACCHE

Le sacche sono prodotte in materiali resistenti

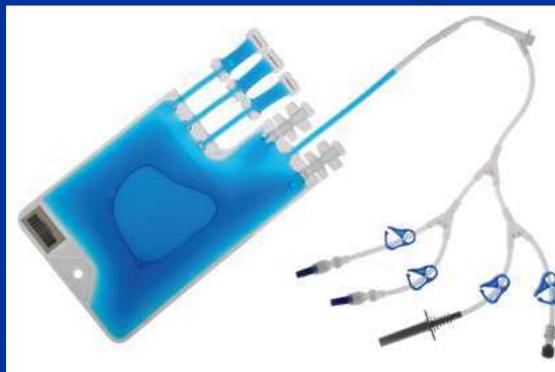
Conservate in folder protettivi

Estremamente fragili!!!



Urti durante la conservazione o spostamento contenitori

Saldatura non ottimale



CONTROLLI DI QUALITA'

SACCHE DANNEGGIATE

Ingresso di azoto liquido nella sacca!!!

- Possibili cross-contaminazioni
- Rottura sacca al momento dello scongelamento

Azoto liquido (-196°C) \rightarrow stato gassoso (T ambiente)

1L di azoto liquido \rightarrow 1m³ di azoto gassoso

Notevole aumento di volume!



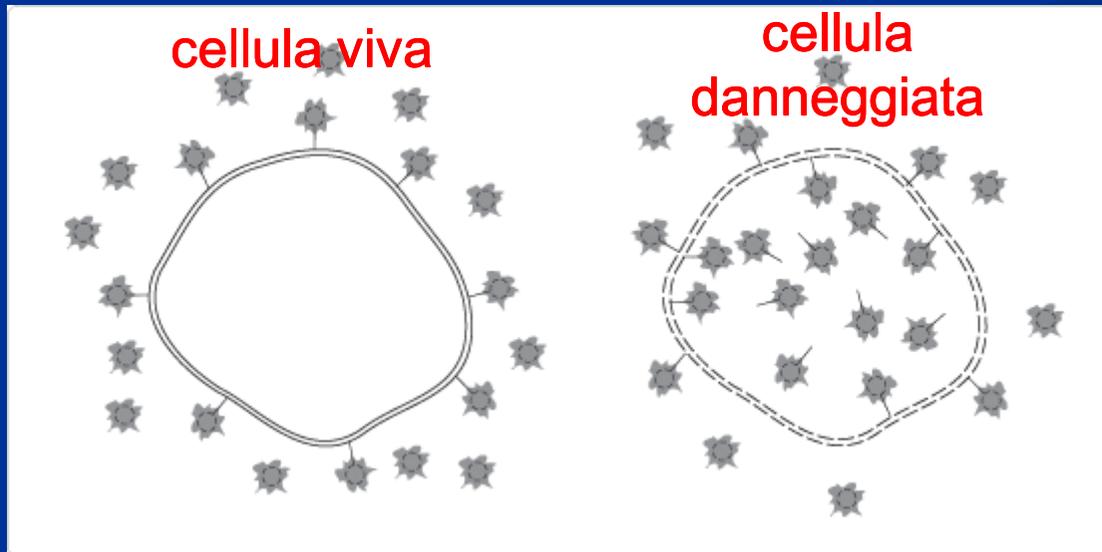
CONTROLLI DI QUALITA'

VITALITA' CELLULARE

Congelamento provoca una certa mortalità cellulare

Aliquote accessorie stoccate con le sacche

Test di vitalità cellulare



CONTROLLI DI QUALITA'

ESCLUSIONE DEL TRYPAN BLUE

Colorante che penetra all'interno delle cellule danneggiate

Colorazione blu

1. Miscelare un egual volume di cellule e di colorante
2. Osservare al microscopio



CONTROLLI DI QUALITA'

CITOFUORIMETRIA (1)

7-AAD che penetra nelle cellule danneggiate

Marcatura di superficie CD45/CD34

- FL-1: CD45 FITC
- FL-2: CD34 PE
- FL-3: 7-AAD



Sufficiente un qualunque
strumento a singolo laser

(3 fluorescenze)

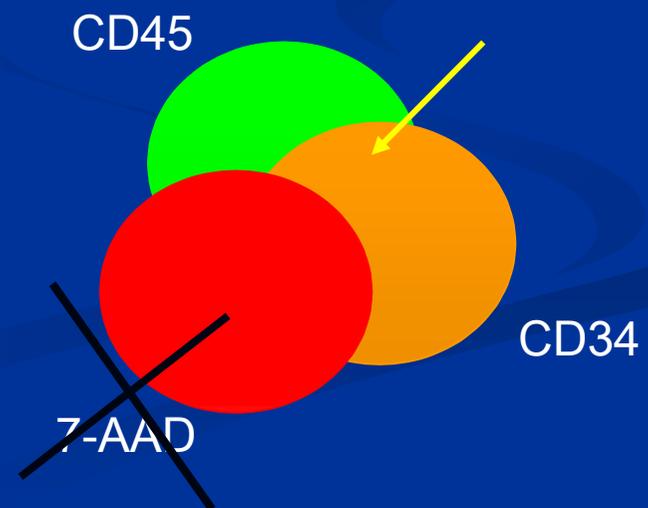
CONTROLLI DI QUALITA'

CITOFUORIMETRIA (2)

Beads (per la conta assoluta)

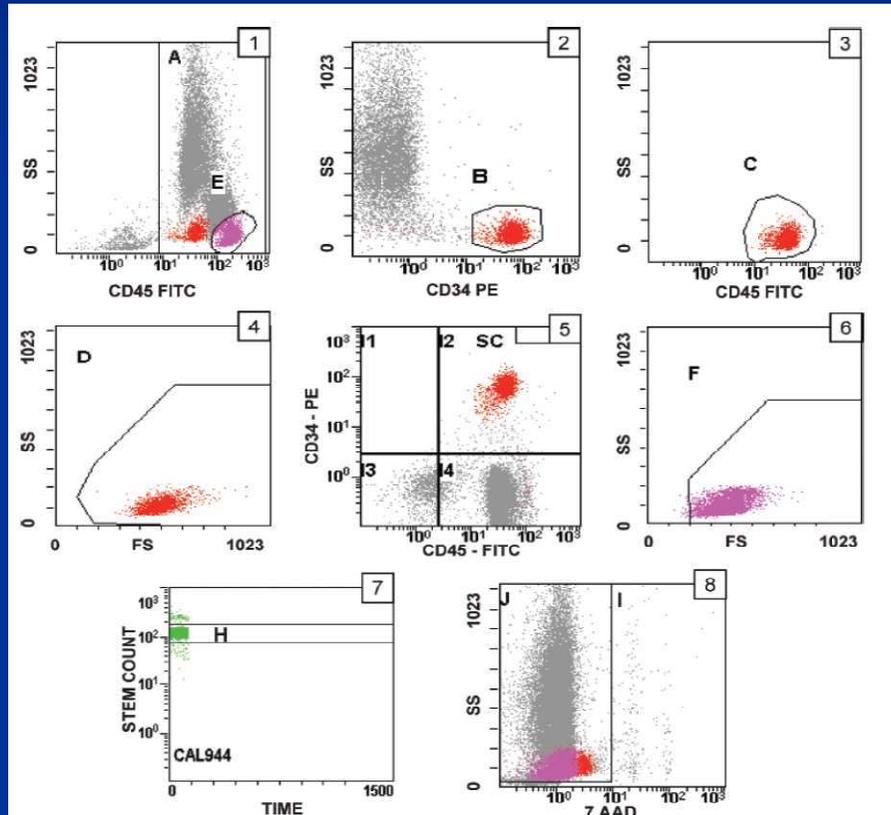
1. Aggiungere campione, anticorpo e 7-AAD e incubare
2. Lisi dei globuli rossi
3. Acquisizione al citofluorimetro

- FL-1: CD45 FITC → leucociti
- FL-2: CD34 PE → CSE
- FL-3: 7-AAD → cellule morte



CONTROLLI DI QUALITA'

CITOFLUORIMETRIA (3)



Ngoma A, Nollette K et al

(Arch Pathol Lab Med. 2011;135:909-914)

CONTROLLI DI QUALITA'

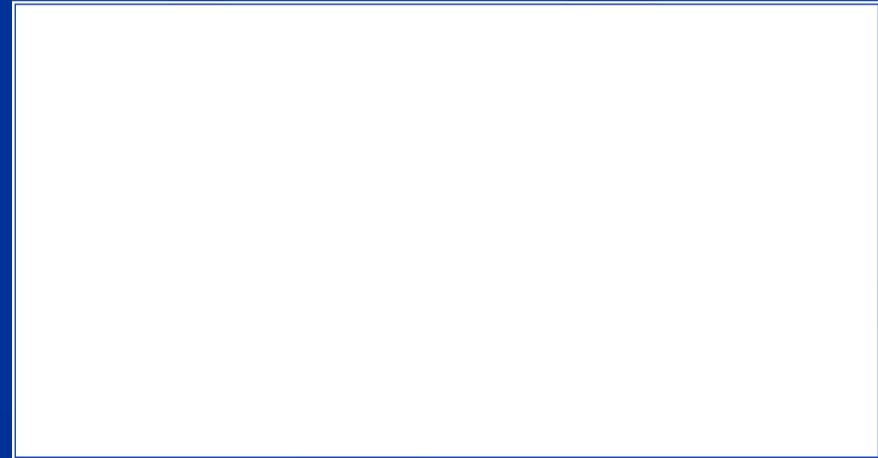
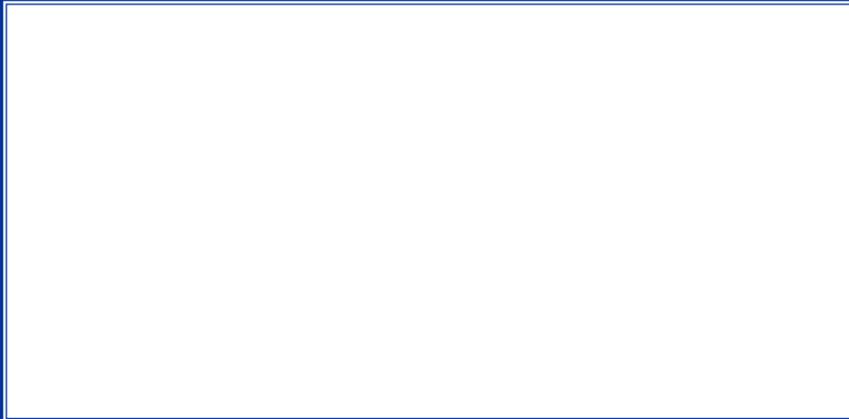
CITOFLUORIMETRIA (4)

Vitalità cellulare in associazione alla marcatura di superficie

→ % cellule vitali

% CD34+ vitali

→ significato molto diverso!!!



CONTROLLI DI QUALITA'

SAGGIO CLONOGENICO (CFU-GM)

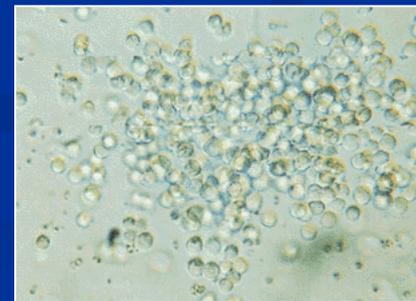
Colony forming units granulocytes-macrophages

Test funzionale

Kit commerciali per una maggior standardizzazione inter-laboratorio della metodica e dell'interpretazione dei risultati

Aliquota seminata su piastre di metilcellulosa

Incubazione a 37°C 5% CO₂ per 14 giorni



MODALITA' DI DECONGELAMENTO

TRASPORTO

Estrazione delle sacche dalla tank (2 persone per l'identificazione)

Trasporto al luogo dello scongelamento

Dry-shipper o dewar convalidati

Mantenimento della
catena del freddo!!!

<-150°C



MODALITA' DI DECONGELAMENTO

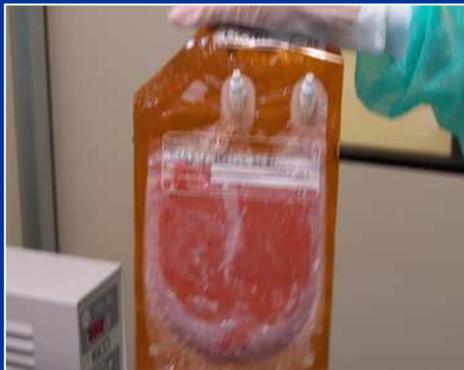
SCONGELAMENTO

Scongelamento rapido in bagnetto termostato a 37°C

Importante la rapidità dal momento dello scongelamento!!

Infusione immediata

Possibilità di diluizione con destrano + albumina (DMSO 10% → 5%)



MODALITA' DI DECONGELAMENTO

EVENTUALI MANIPOLAZIONI

Necessità di un laboratorio in classe D

	Maximum permitted number of particles per m ³ equal to or greater than the tabulated size			
	At rest		In operation	
Grade	0.5 µm	5.0µm	0.5 µm	5.0µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Not defined	Not defined

	Recommended limits for microbial contamination (a)			
Grade	air sample cfu/m ³	settle plates (diameter 90 mm) cfu/4 hours (b)	contact plates (diameter 55 mm) cfu/plate	glove print 5 fingers cfu/glove
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

MODALITA' DI DECONGELAMENTO

EVENTUALI MANIPOLAZIONI

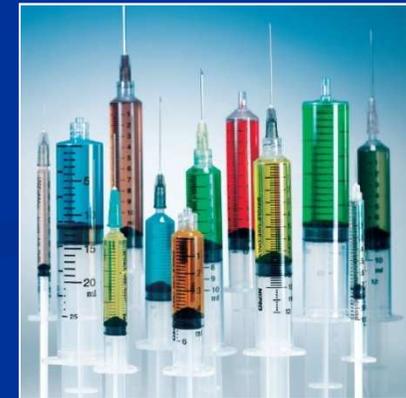


INFUSIONE

PREPARAZIONE DEL PAZIENTE

Paziente premedicato (idrocortisone, antistaminici, diuretici)

Monitorato (ECG, saturazione O₂)



Possibili effetti collaterali:

sovraccarico circolatorio, liberazione di istamina, difficoltà respiratorie, ipotensione, bradicardia, rilascio di citochine (...)

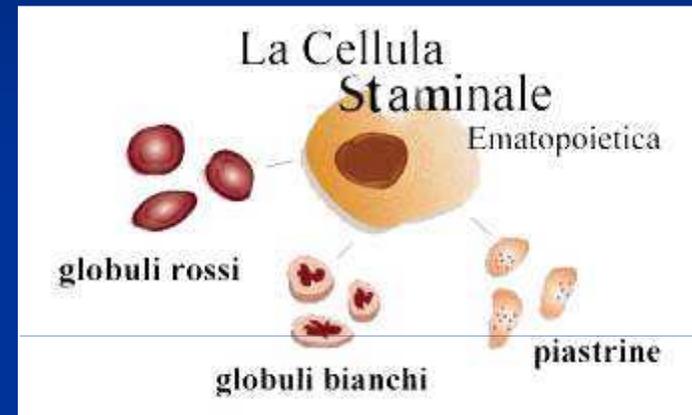


CONTROLLI DI QUALITA'

CONTROLLI POST-SCONGELAMENTO

- Controlli di sterilità
- Test di vitalità cellulare
- ATTECCHIMENTO!

- 0.5×10^9 neutrofili/L
- 20×10^9 piastrine/L



Lo scopo è ristabilire la funzionalità emopoietica

- Infezioni
- Emorragie
- Anemia

CONCLUSIONI

Procedure per testare i prodotti cellulari

- Sicurezza
- Vitalità
- Integrità
- Specifiche necessarie per il rilascio

GARANTIRE UN TRAPIANTO

SICURO ED EFFICACE

**PERSONALE TECNICO E
INFERMIERISTICO**

Milena Pozzi

Katia Li Vecchi

Elena Casarotto

Eulalia Bruna

Romira Veneziano

Laura Meroni

Lorenza Colombo

PERSONALE MEDICO

Valentina Baldini

Chiara Borella

Angelo Colaemma

Giorgio Confalonieri

Paolo Perseghin



Grazie dell'attenzione!

