

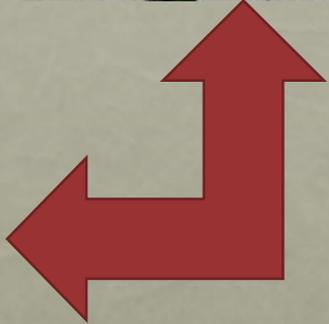
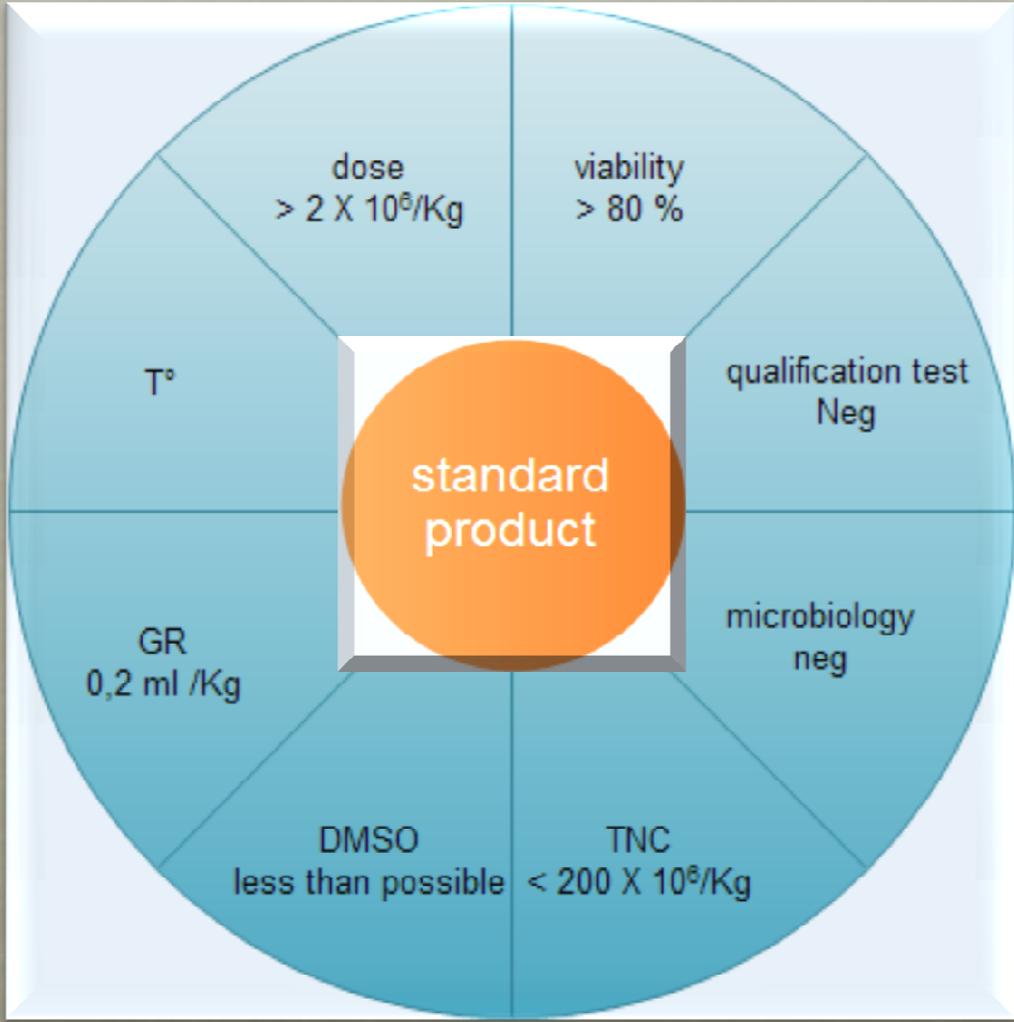
HPC-A E HPC-M STANDARD DI PRODOTTO E CONTROLLI DI QUALITÀ

Michele Vacca

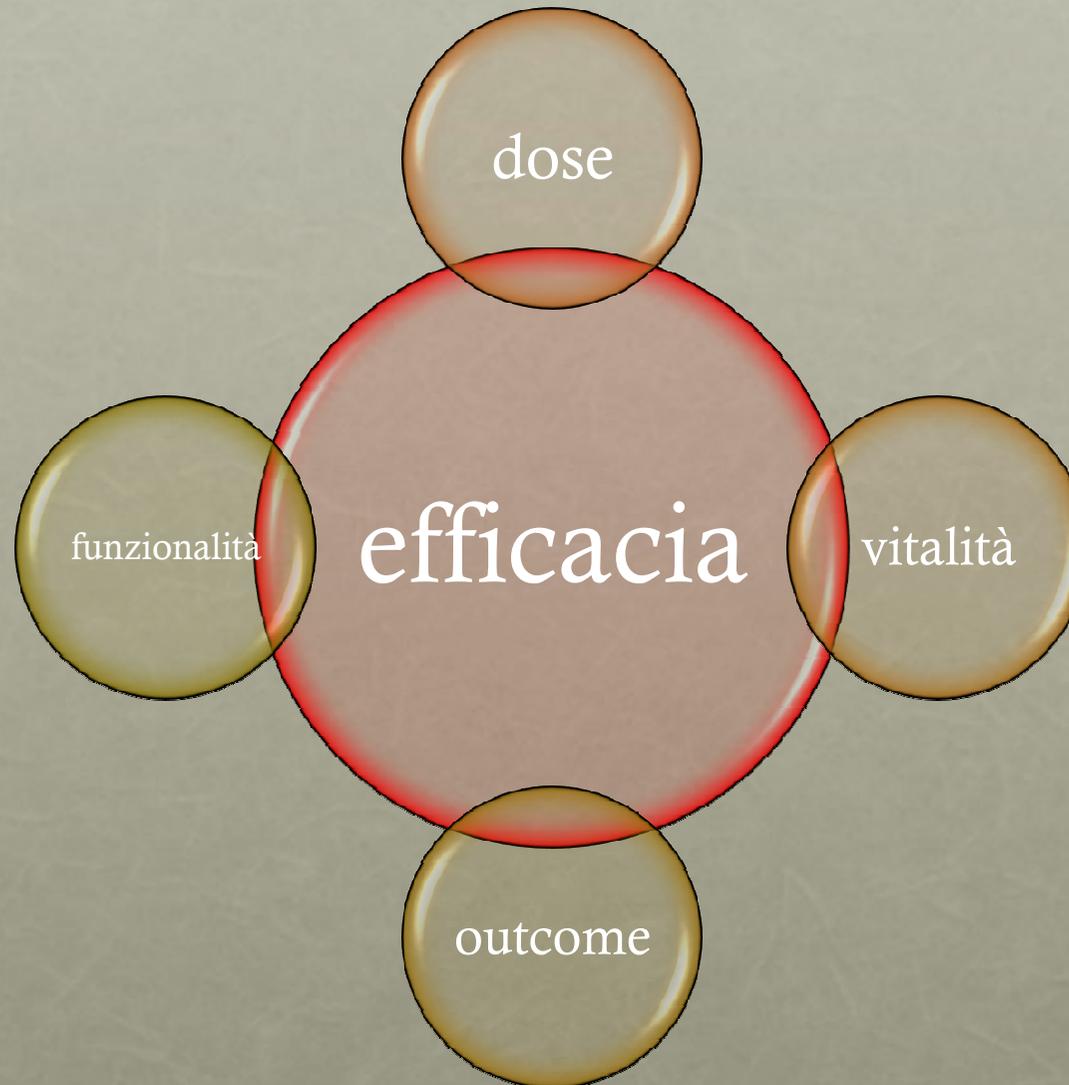
UOS Raccolta Cellule Staminali ed effettori terapia cellulare
SIMT A.O. San Camillo Forlanini Roma



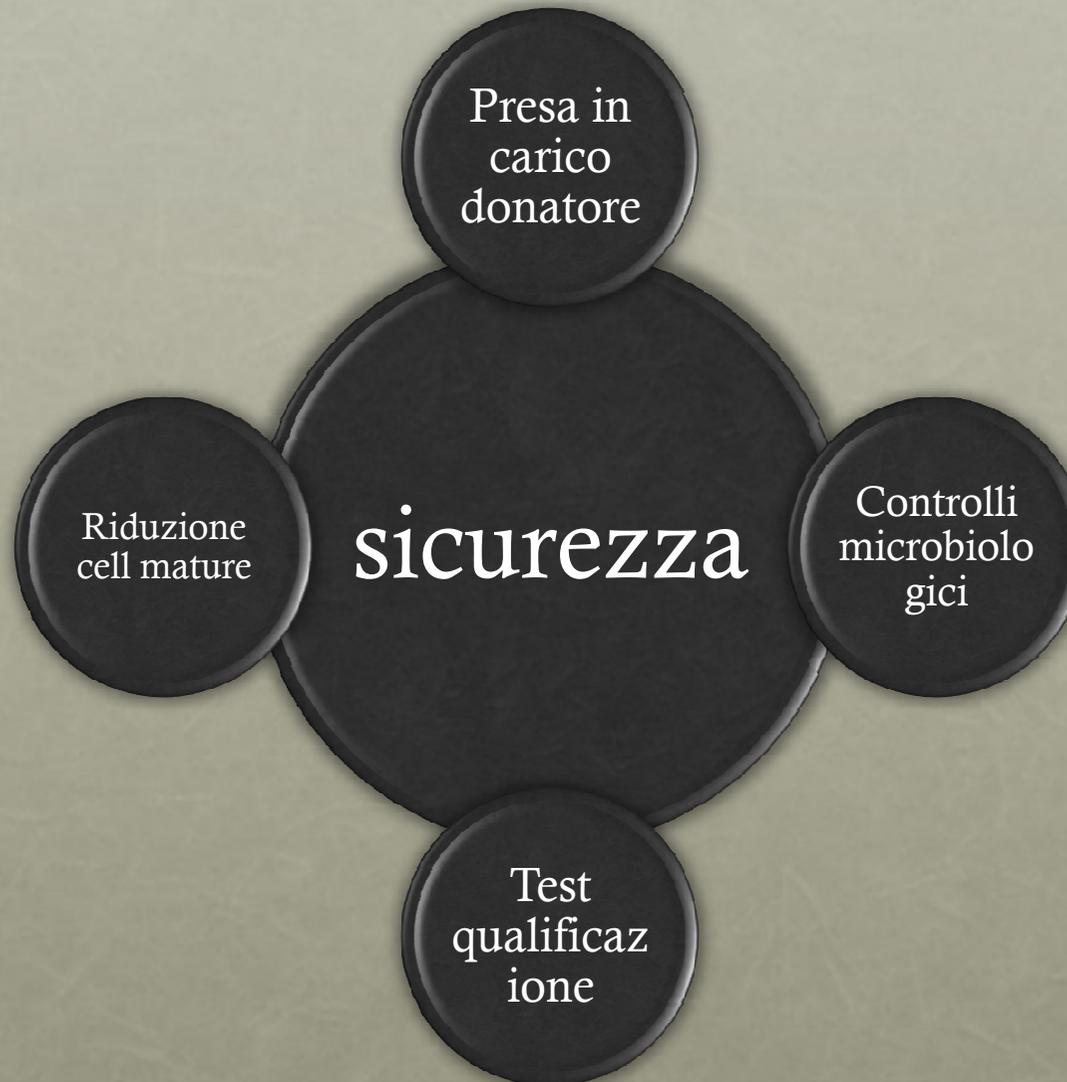
il target: Il prodotto conforme



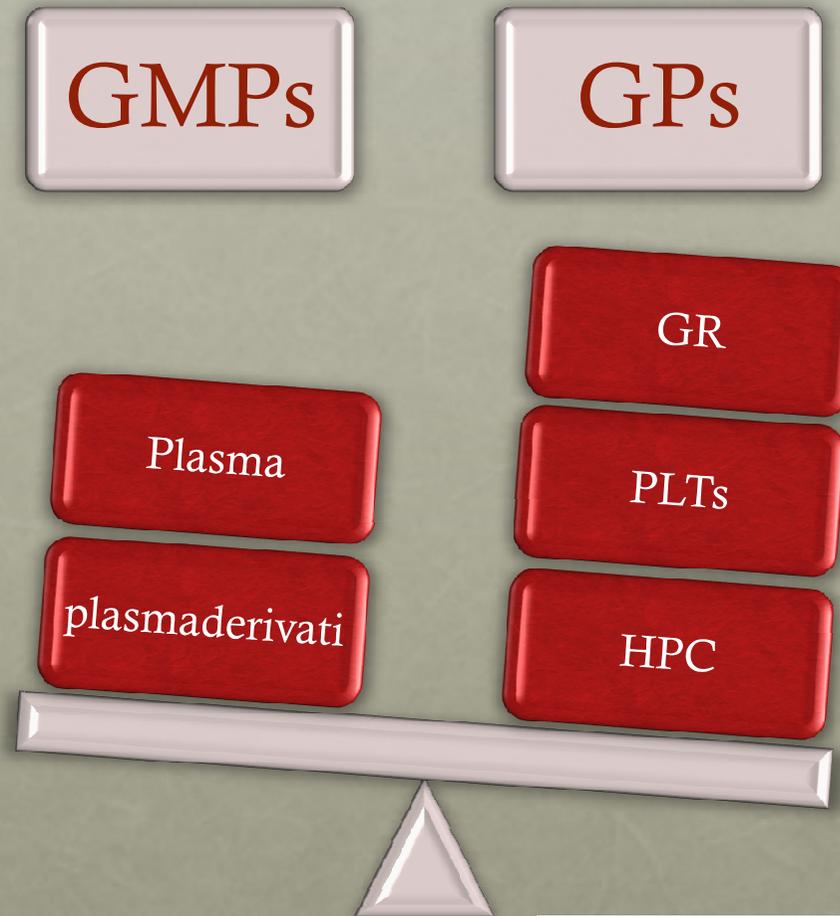
C.Q. : parametri critici



C.Q. : parametri critici



Lentamente ma inesorabilmente



CENTRO
NAZIONALE
SANGUE



Centro Nazionale Trapianti

VERSO IL PRODOTTO GMP

GPs

GMPs

TC prodotti
cellulari

Plasmaderivati

PLT

Plasma - emc uso
non trasf

GR

HPC



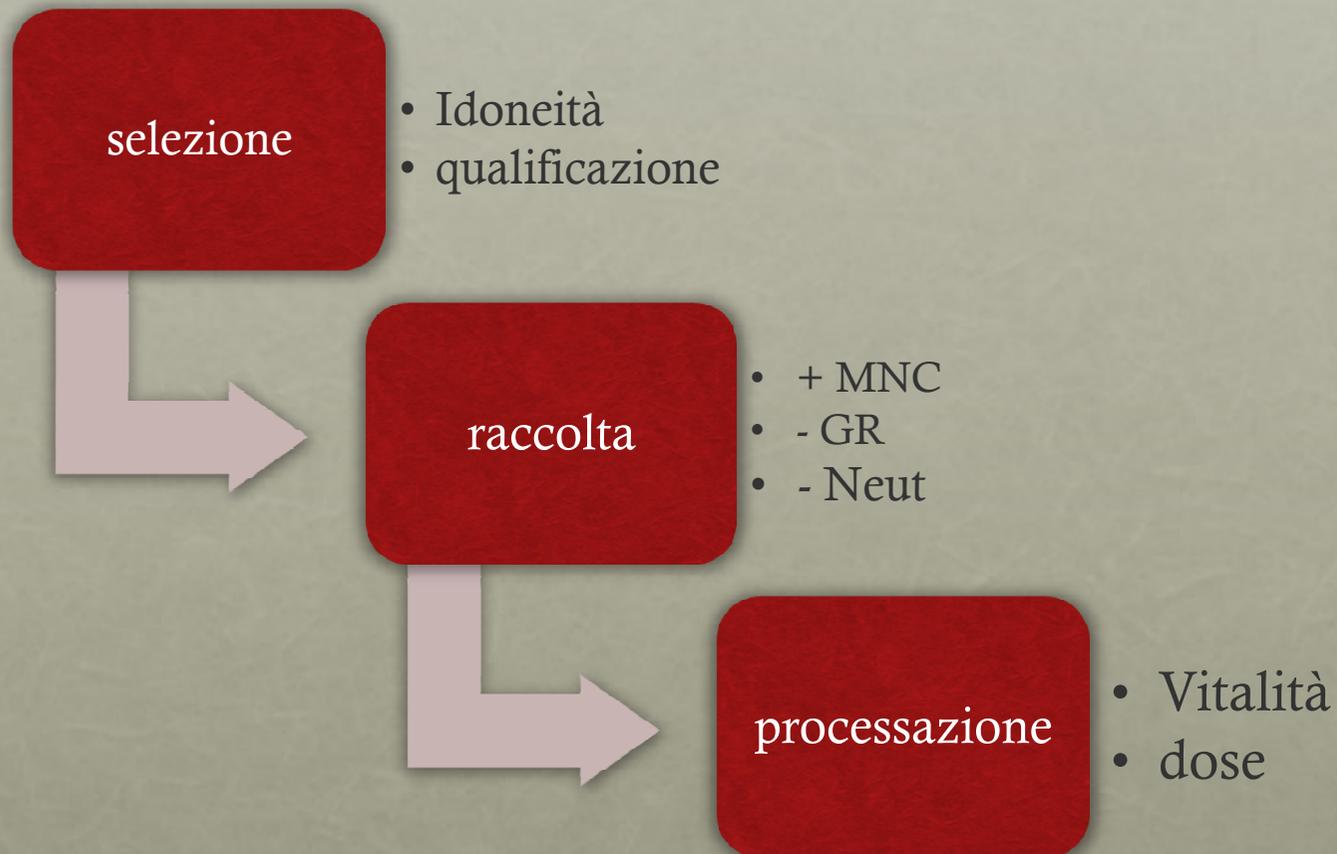
Centro Nazionale Trapianti



CENTRO
NAZIONALE
SANGUE



Il percorso verso il prodotto conforme





HPC M (marrow)

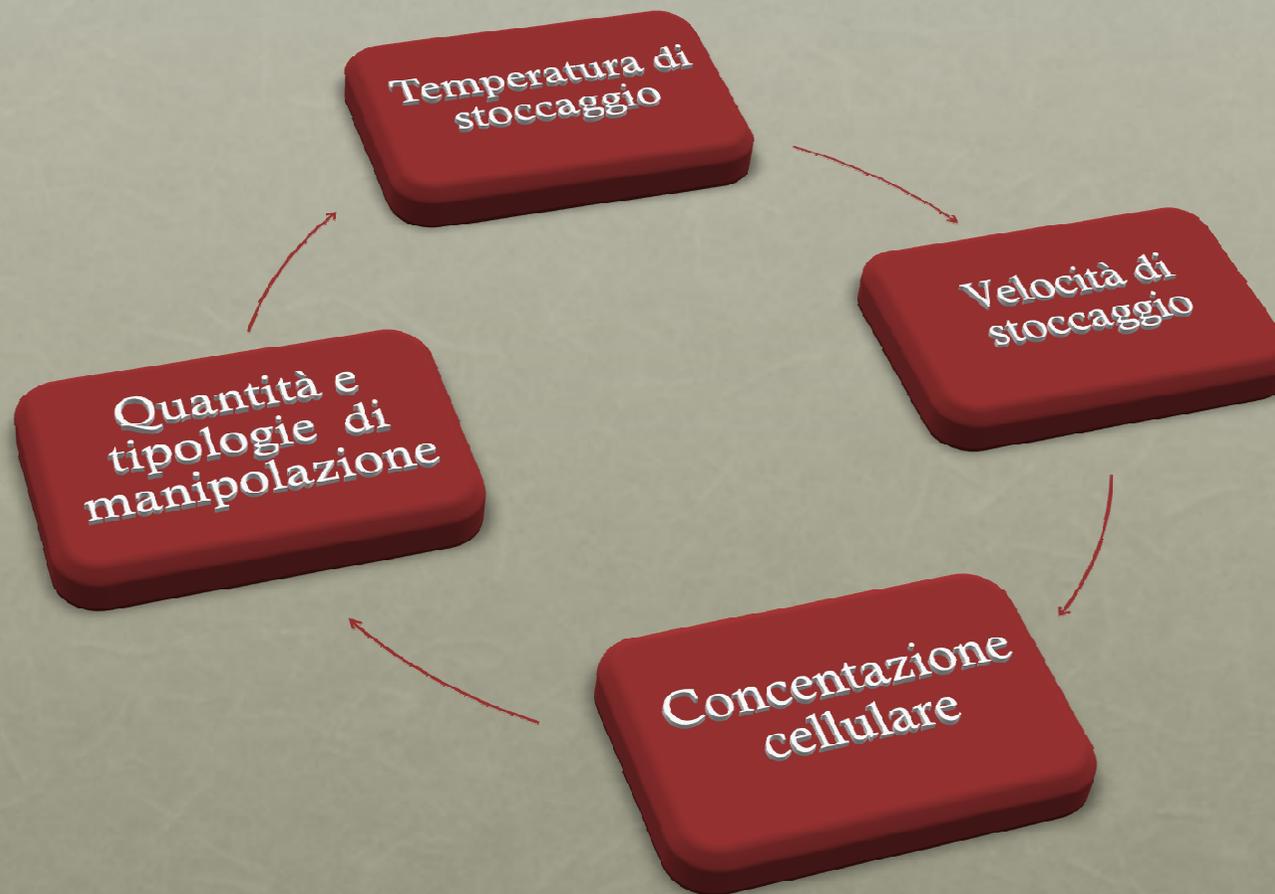


HPC – A (apheresis)



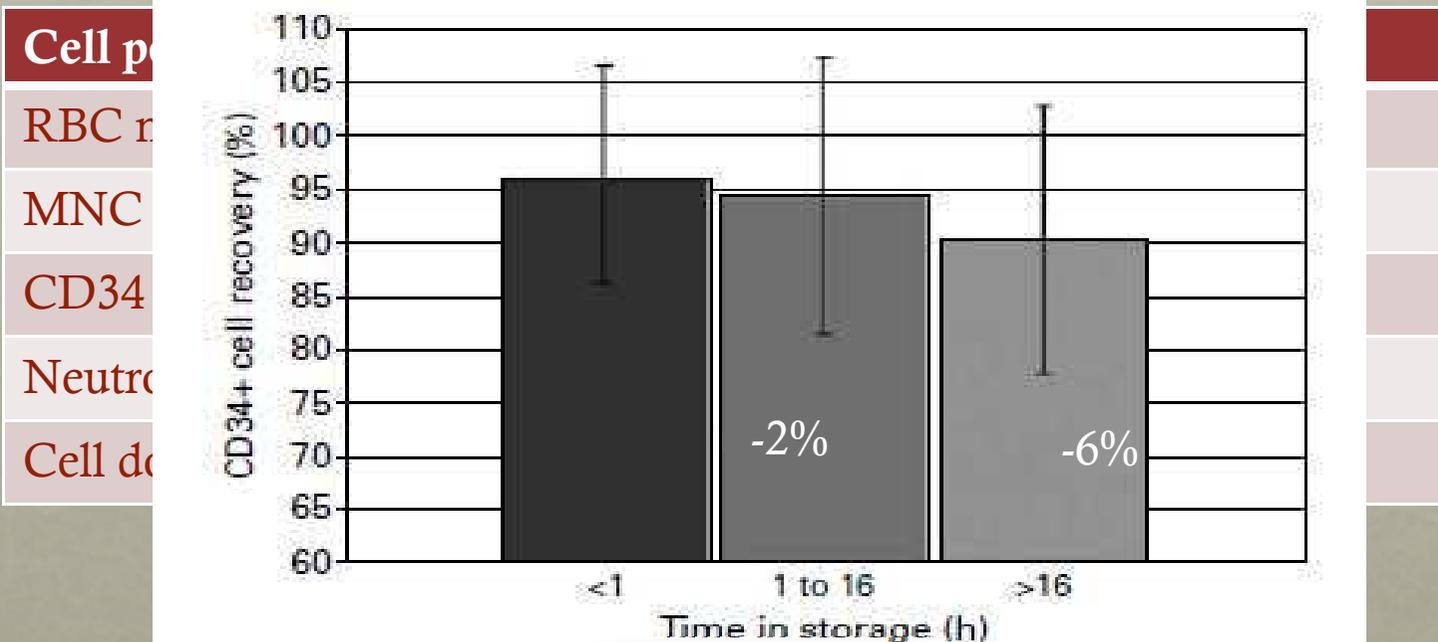
HPC BC (cord blood)

fattori che influenzano la qualità del prodotto



Factors affecting volume reduction and red cell depletion

Guttridge et al. BMT 2004

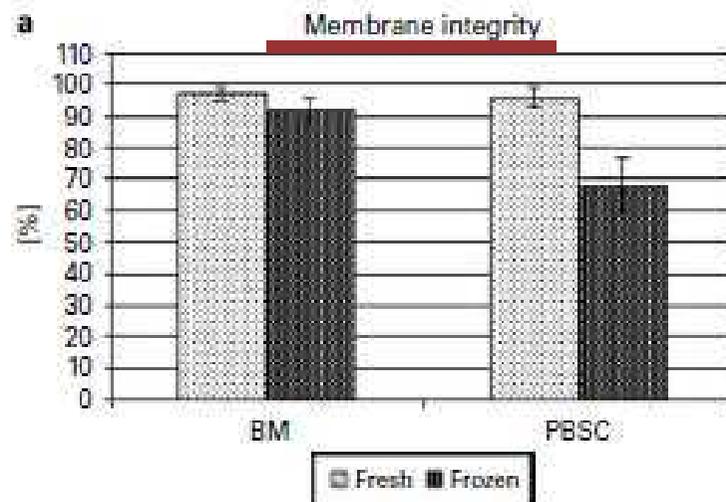


| | Tempo di trasporto <3,4 h vs >3,4 | Durata dello stoccaggio 2-6 C° <1 vs > 1 h | Tempo dalla raccolta alla manipolazione < 5,7 h vs > 5,7 h | Concentraz. MNC < 36,6 x 10 ⁸ /l vs > |
|-----------------|--------------------------------------|--|---|---|
| Recupero CD34 % | 95,7 / 88,8 | 88,8 / 88,8 | 94,6 / 82,9 | 83,7 / 95,1 |
| P-value | 0,0059 | 0,9970 | 0,0217 | 0,0120 |

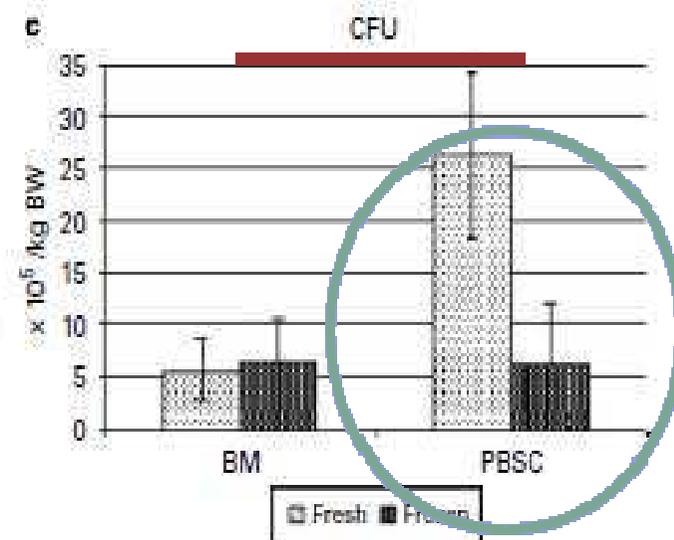
Transportation and cryopreservation may impair CSE function and engraftment of allogenic PBSCs, but not BM

Lioznov et al. BMT 2008

Integrità della membrana



Capacità staminale



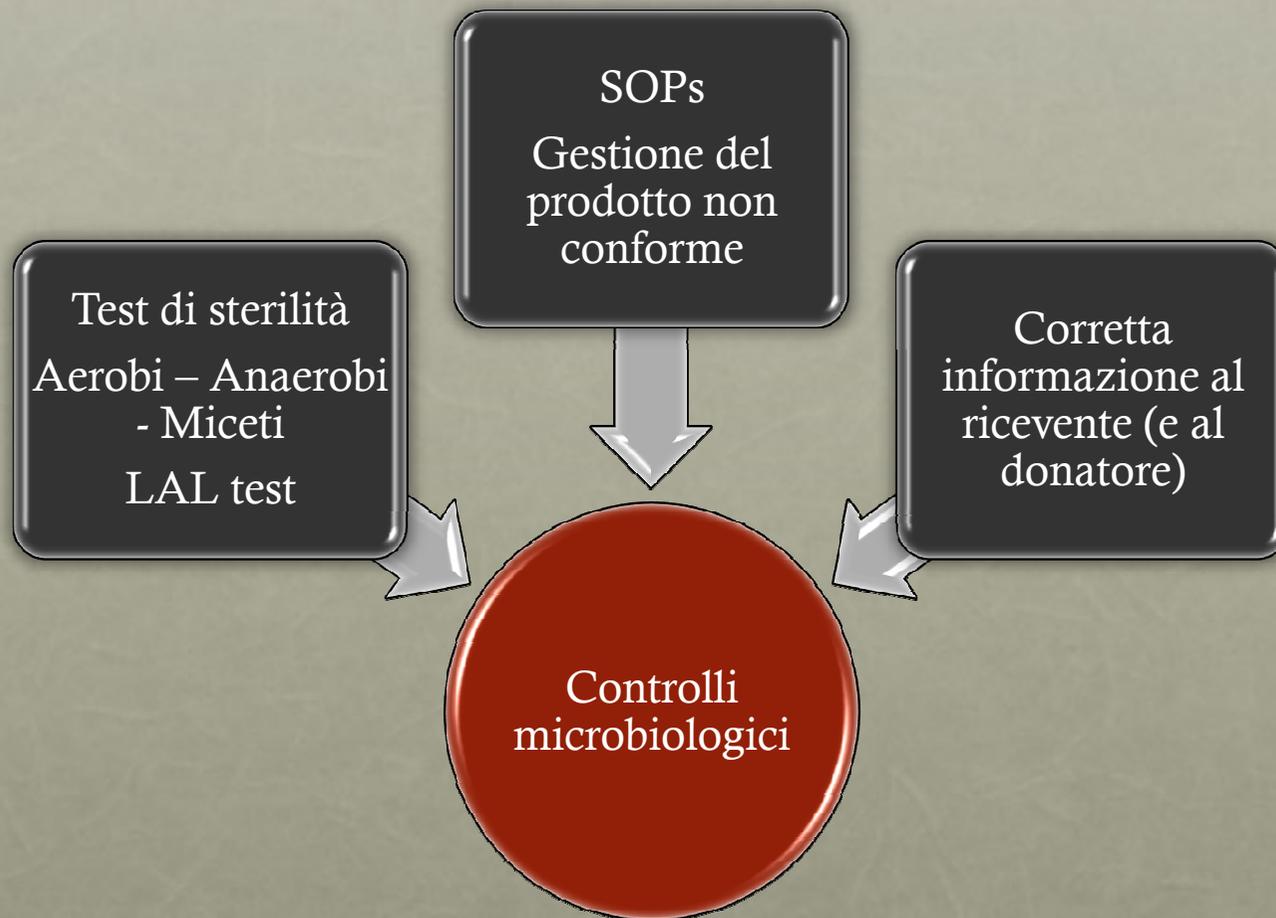
QUINDI ..COME DICEVA CATALANO...



Meglio un prodotto fresco e se di aferesi, portato velocemente in manipolazione vitale, con pochi granulociti , e sterile

.....Che un prodotto vecchio, manipolato il giorno dopo stoccato a temperatura ambiente per oltre 16 ore, ipercellulare, con bassa dose, e probabilmente inquinato

CQ POST RACCOLTA: STERILITÀ



**Kamble et al :Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell grafts—incidence of 735 grafts
TRANSFUSION 2005.**

| | |
|--------|-------|
| HPC-A | 2.1 % |
| HPC-M | 3.5 % |
| HPC-BC | 13% |
| totale | 3% |

**Contamination of HPC grafts (BM and PBPCs):
clinical relevance***

| Author | Contaminated harvests | Potentially pathogenic | Iatrogenic sepsis |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| 32 | 85 (3.2) | 5 (0.18) | 2 (0.07) |
| 90 | 13 (4.4) | 1 (0.34) | 0 |
| 62 | 54 (3.2) | 5 (0.3) | 0 |
| 63 | 3 (0.2) | 0 | 0 |
| 28 | 23 (17.9) | 2 (1.5) | 0 |
| 60 | 11(0.6) | 2 (0.1) | 0 |
| Espinosa et al. ⁹ | 3 (0.2) | 0 | NA† |
| Padley et al. ⁹ | 22 (2.4) | 1 (0.1) | 0 |
| Schwella et al. ¹⁰ | 63 (26.3) | 13 (5.4) | 0 |
| Rowley et al. ¹¹ | 22 (22) | 0 | 0 |
| Lazarus et al. ¹² | 13 (6.7) | 1 (0.5) | 1 (0.5) |
| Cohen et al. ¹³ | 16 (7.0) | 2 (0.8) | 0 |
| Total | 332 (3.0) | 30 (0.27) | 3 (0.027) |

* Data are reported as number (%).

† All contaminants discarded.

Contaminazioni pericolose

1. Kassis et al : *Contamination of Peripheral Hematopoietic Stem Cell Products With a Mycobacterium mucogenicum Related Pathogen*

Infection Control and Hospital Epidemiology, volume 28
(2007), pages 755-75

Somministrare o smaltire?

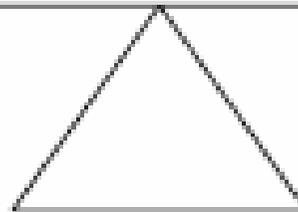
Considerations Regarding Administration of Culture-Positive HPC Products

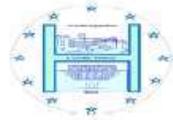
- Slow growing organism
- Skin or environmental contaminant
- Donor is not available for recollection
- New product requires remobilization or central line placement
- Product contains majority of total cell dose

- Rapidly growing organism
- Enteric or pathogenic organism
- Product can easily be replaced
- Product contains small percentage of total cell dose
- Patient can tolerate delay and recollection

Administer the Product

Discard the Product





**Controlli Microbiologici di
Qualità delle Cellule Staminali
Periferiche e Midollari**

**Tabella di Validazione - Saggio
di Prodotti HPC sterili ed
inquinati**

MOD 01 PSQST64

Terreno Colturale :

| Descrizione | Uso | Codice | Lotto | Scadenza | Saggio |
|--------------------|------------|---------------|--------------|-----------------|---------------|
| Bact/Alert FN | Anaerobi | 259793 | 1024683 | 30/11/10 | 08/03/10 |

Tabella di Validazione :

| Flacone | Prodotto | Risultato Ottenuto | Risultato Atteso | Conformità |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 0 FN CS | HPC Sterile | Sterile | Sterile | Conforme |
| 1 FN CS | HPC Sterile + Clostr. Spor. CS | Positivo | Positivo | Conforme |
| 2 FN CS | HPC Sterile + Clostr. Spor. CS | Positivo | Positivo | Conforme |
| 3 FN CS | HPC Sterile + Clostr. Spor. CS | Positivo | Positivo | Conforme |
| 4 FN CS | HPC Sterile + Clostr. Spor. CS | Positivo | Positivo | Conforme |
| 5 FN CS | HPC Sterile + Clostr. Spor. CS | Positivo | Positivo | Conforme |

Validazione :

1. Il Terreno Colturale FN è fertile secondo F.U. Italiana
2. I risultati ottenuti sono conformi a quelli attesi
3. Il Terreno Colturale Bact/Alert FN è utilizzabile per la tipologia di Prodotto HPC
4. Nelle condizioni di Saggio non si evidenziano risultati falsamente negativi e positivi
5. Nelle condizioni di Saggio non si evidenziano fattori interferenti
6. Nelle condizioni di Saggio i risultati sono ripetibili
7. Alla luce dei risultati ottenuti, la metodica descritta in PSQ ST 43 ed il relativo terreno colturale Bact/Alert FN (batteri anaerobi) sono validati/qualificati.

Roma 08/03/2010

Il Responsabile C.Q. Microbiologici
Dott. Claudio Lavorino

CQ POST RACCOLTA: CELLULARITÀ

CONFERENCE REPORT

Best practice for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in adults and children: results of a Società Italiana Di Emaferesi e Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO) consensus process

Luca Pierelli, Paolo Perseghin, Monia Marchetti, Patrizia Accorsi, Renato Fanin, Chiara Messina, Attilio Olivieri, Marco Rizzo, Laura Salvaneschi, and Alberto Bosi for Società Italiana Di Emaferesi and Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO)

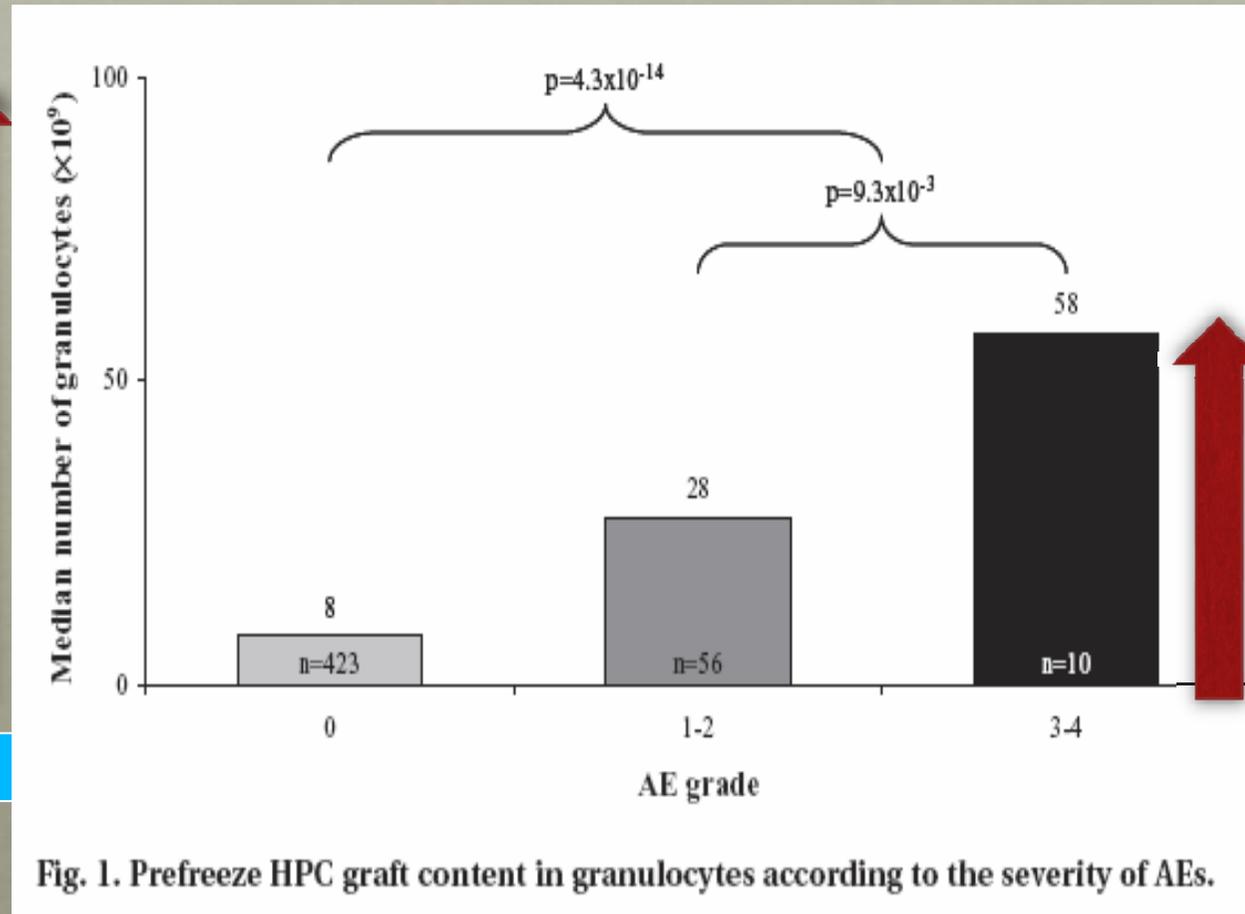
Se AB0
incompatibile
Emazie :0.2 -0.3
ml / Kg ricevente

TNC nel
prodotto:
< 200.000/ μ L

Granulociti ed eventi avversi post infusione HPC

B. Calmels et al *TRANSFUSION* 2007;47:1268-1275.

460
Graft lavati



CQ IN MANIPOLAZIONE E STOCCAGGIO

Valutazione del prodotto

CQ pre e post
manipolazione/criopreservazione

CQ scongelamento e rilascio

VALUTAZIONE DEL PRODOTTO

- Determinazione CD34+ citoflorimetria
- Determinazione CD3+ citoflorimetria
- Conta WBC emometria
- Vitalità cellulare 7 -AAD
- Test clonogenici CFU



CQ MANIPOLAZIONE (MINIMA)

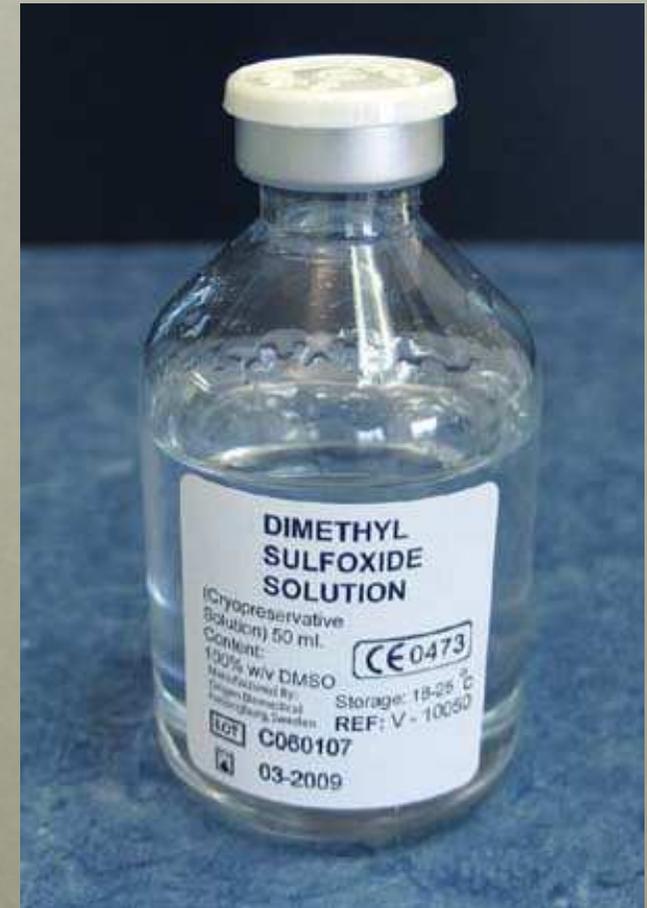
HPC M E HPC A

- Plasma riduzione target:
 - Alto recupero cellulare > 80%
 - Bassa perdita di CD34+ < 10%
 - Riduzione di tossici come il DMSO



ATTENZIONE AL DMSO

- Nausea
- cefalea
- Sensibilizzazione alla luce
- Reazioni allergiche



Windrum P, al. *Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres.*
 Bone Marrow Transplant. 2005

97
 3400

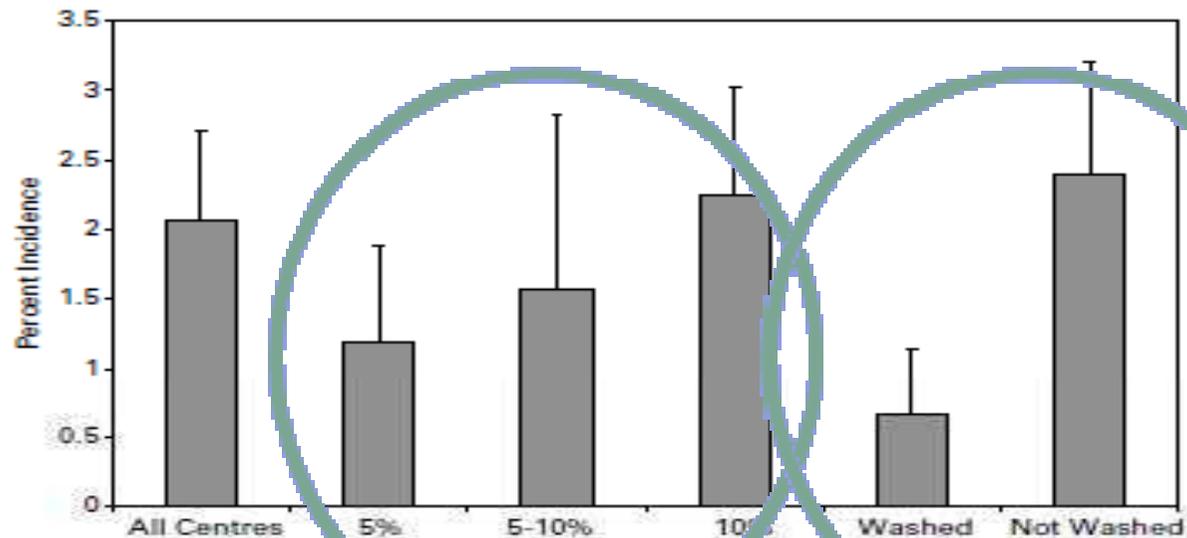
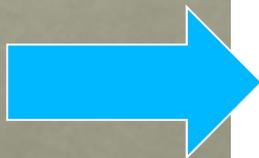


Figure 1 Mean centre incidence of DMSO toxicity by DMSO reduction strategy. Error bars show standard error.

Table 1 Toxicity according to organ system reported by transplant centres

| Toxicity | Probable (no. of centres) | Possible (no. of centres) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| Cardiovascular | 26 | 14 |
| Respiratory | 14 | 15 |
| CNS | 4 | 8 |
| Renal | 4 | 8 |
| Others | 9 | 4 |
| Total | 57 | 49 |



STOCCAGGIO E RILASCIO

- Stoccaggio in Vapore LN2
 - Stoccaggio in LN2 Vapore (evitare mix up)
 - Controllo degli allarmi locali e remoti (collegamento telefonico o telematico in stazioni presidiate 24 h/24 h)



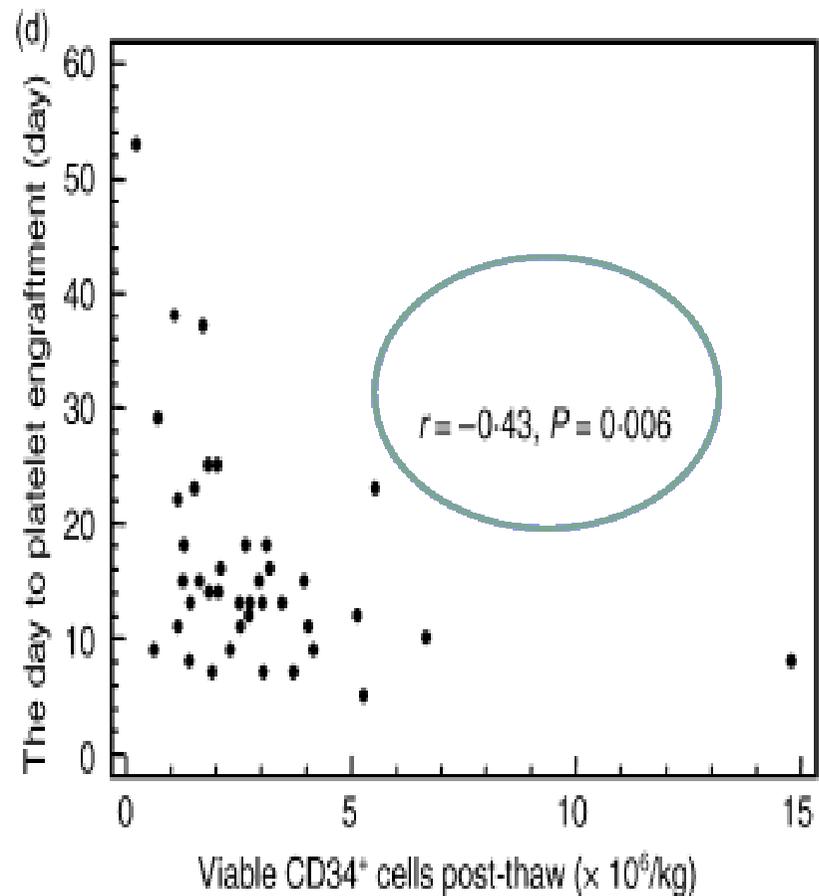
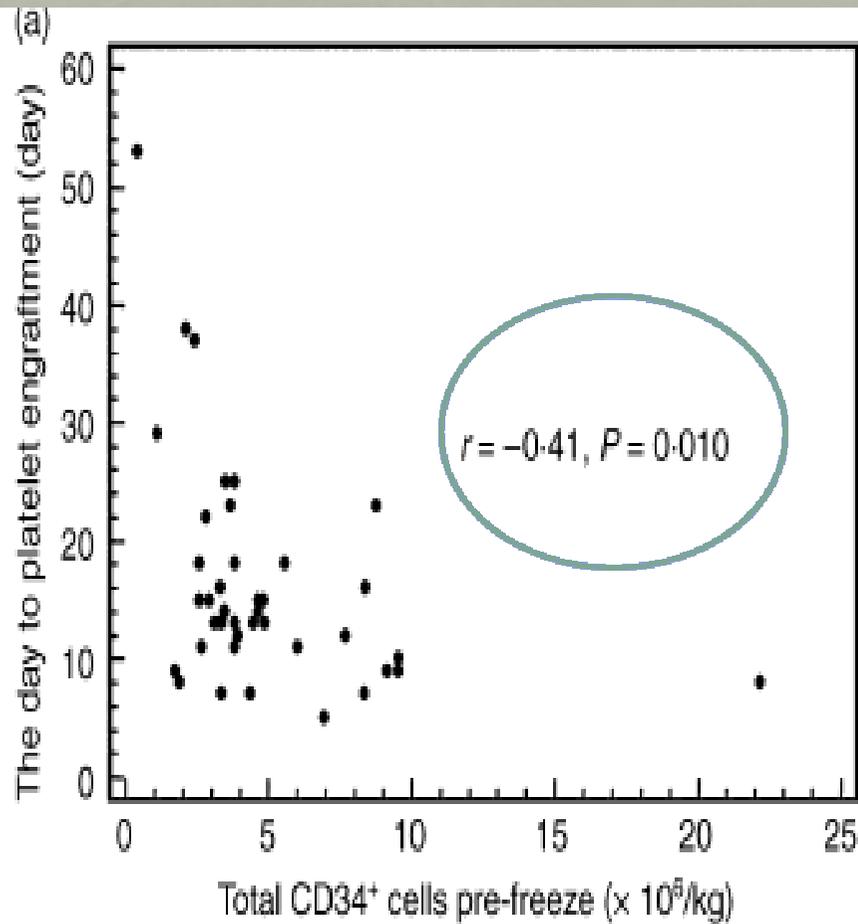
CONTROLLO VISIVO PRE RILASCIO

Prodotti lesionati



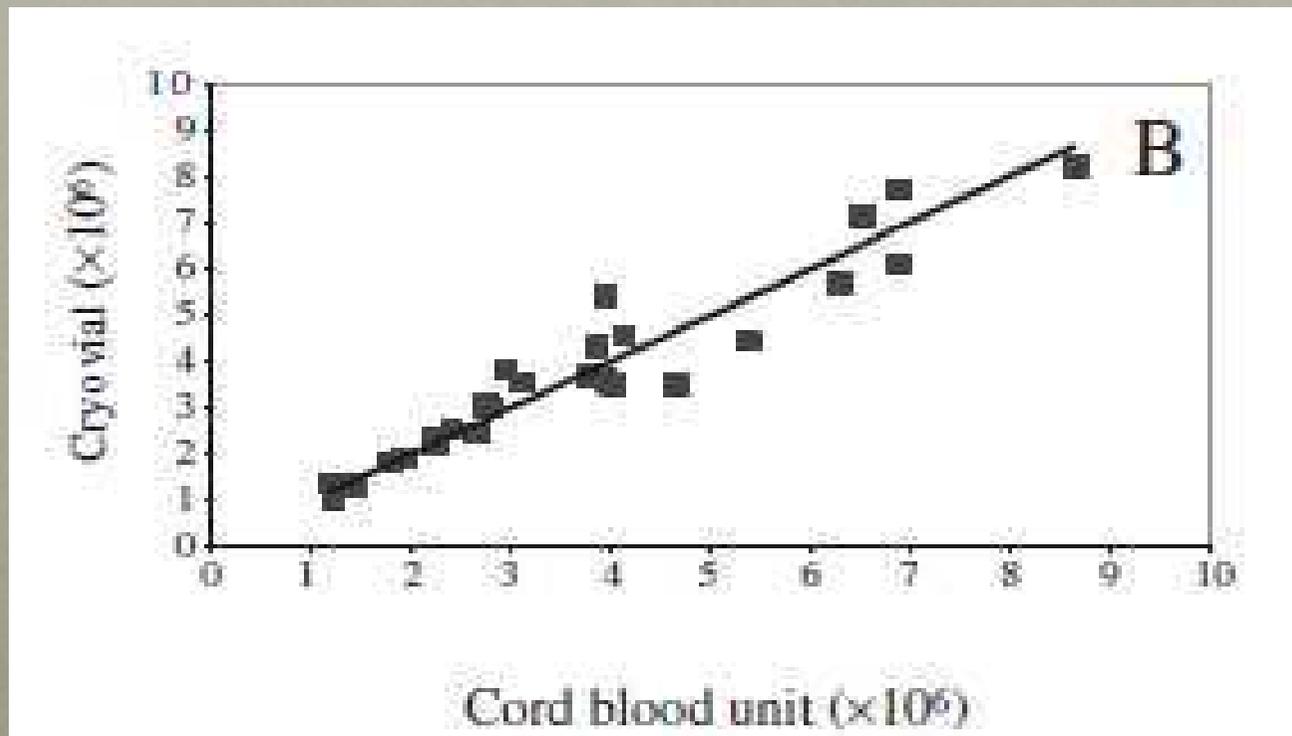
quantification of viable CD34+ cell number after thawing is a more accurate predictor of engraftment than post-thaw total CD34+ cell counts, or pre-freeze determinations

S.Lee Vox Sanguinis 2008

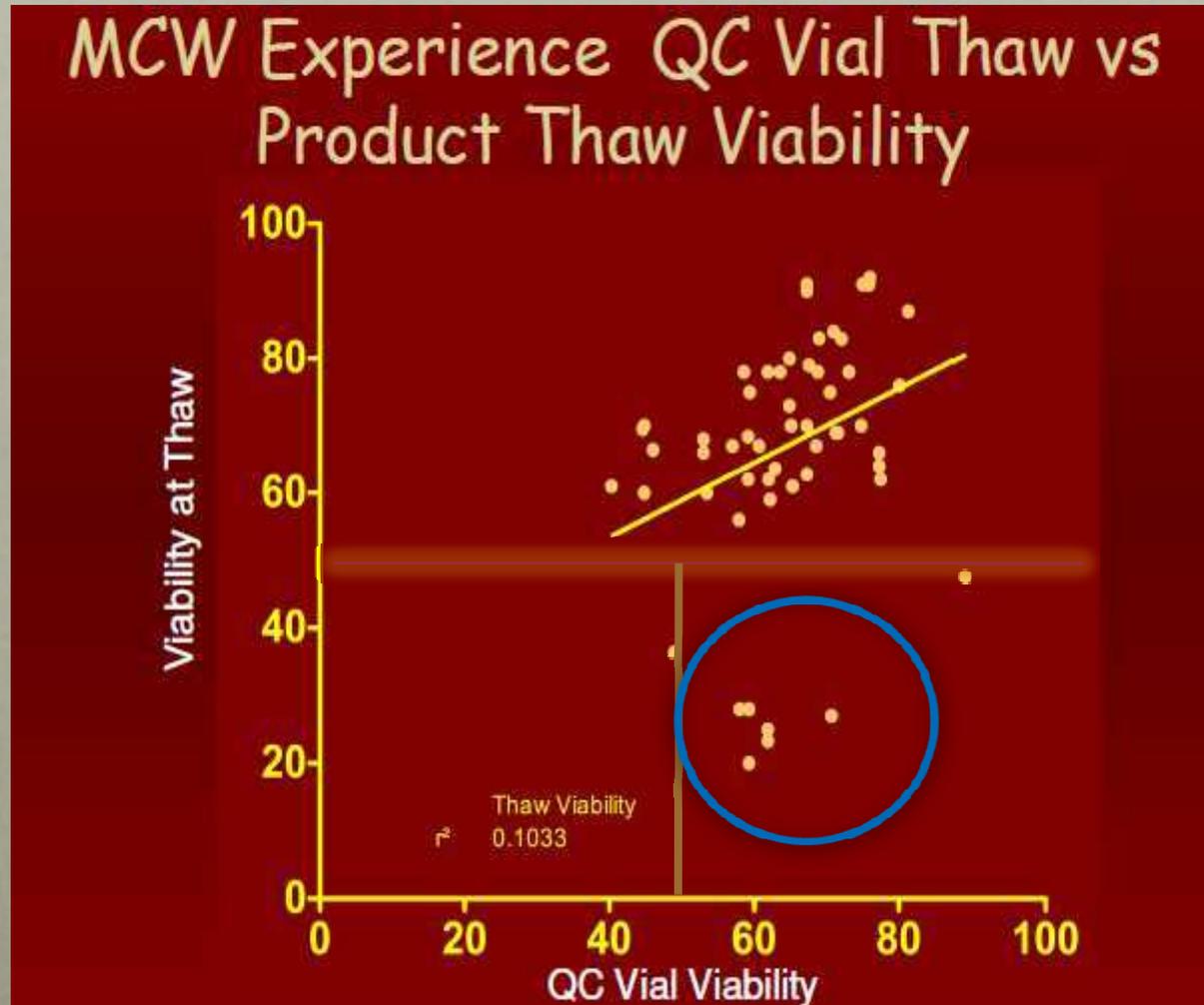


Predictive utility of cryovial

Fig. 5. Linear relation between viable CD34+ cells as measured on a frozen test sample and total viable CD34+ cell content of the cord blood unit. $y = 1.0006x$; $r^2 = 0.9096$



Predictive utility of QC vial



C.Keever-Taylor 2008 MCW wisconsin



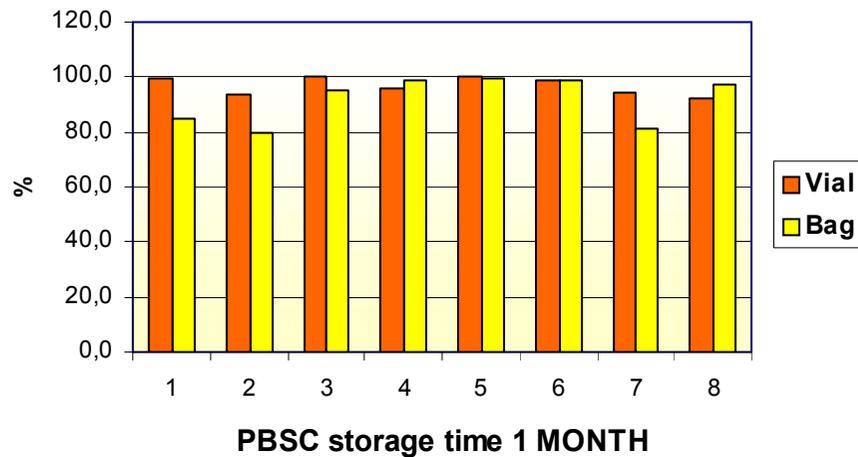
validazione della procedura di
criopreservazione e
scongelamento e della
corrispondenza della vitalità tra
provetta satellite e prodotto

MOD 01 PSQST64

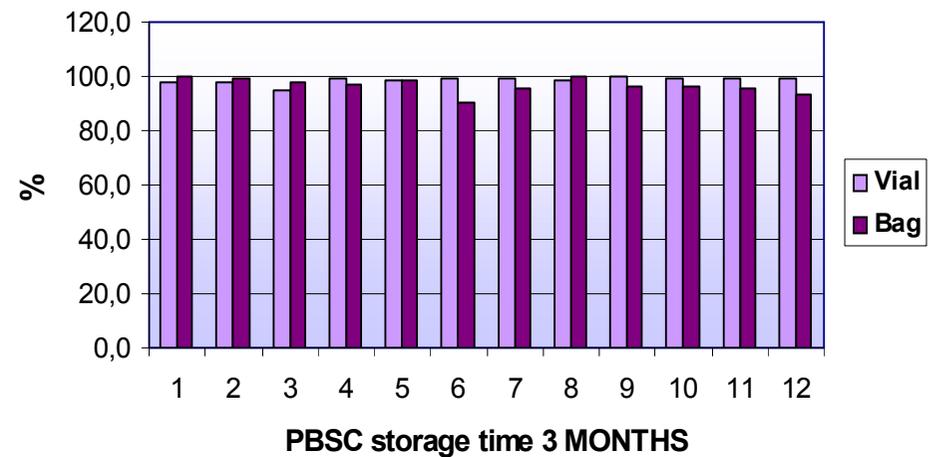
| | |
|-----------------------------|---|
| PROCEDURA: | validazione della procedura di criopreservazione e scongelamento e corrispondenza della vitalità tra provetta satellite e prodotto |
| METODICA DI VALIDAZIONE | <p>La procedura di criopreservazione e scongelamento sono validate attraverso la determinazione della validazione della vitalità cellulare (CD34+) eseguita con metodica citofluorimetrica metodo ISHAGE 7AAD. Al fine di verificare anche la corrispondenza tra la vitalità delle provette satelliti (vials) e il prodotto sono state effettuate 24 determinazioni consecutive parallele tra vials e prodotto corrispondente. Lo scongelamento delle vials è stato effettuato al momento del ricovero del paziente per la terapia di induzione al trapianto (circa 15 gg prima dello scongelamento del prodotto). Il campione del prodotto scongelato è stato prelevato dalla sacca al termine dell'infusione. È stata effettuata una analisi statistica con riferimento al rapporto tra il risultato della vitalità del prodotto nelle vials e quello della corrispondente unità scongelata.(ratio)</p> |
| RISULTATO DI ACCETTABILITÀ | <p>La determinazioni del valore della ratio deve essere compresa tra 0,80 e 1,10 nel 75 % delle determinazioni e non superiore a 1,30 nel 100%. La vitalità del prodotto deve essere > 70% su tutti i prodotti scongelati</p> |
| RISULTATO Della VALIDAZIONE | <p>Dall'analisi statistica sono ottenuti i seguenti risultati : numero di determinazioni compresi nei parametri di accettabilità > 75%. Nessuna ratio oltre 1,30. Vitalità di tutti i prodotti: > 70% Pertanto la procedura si RITIENE VALIDATA</p> |
| RESPONSABILE DI VALIDAZIONE | Dott.ssa Rita Scocchera |
| PERIODO DI VALIDAZIONE | 2010 - 2011 |

COMPARISON BETWEEN CELL VIABILITY TESTING PERFORMED AFTER THAWING IN SATELLITE SAMPLES AND CORRESPONDING FROZEN BAGS
PANDOLFI A., FIORAVANTI D., SCOCCHERA R., IUDICONE P., VACCA M., IPSEVICH F., POSSENTI M., MASSARELLI F., BERARDINI S., PIERELLI L. ISBT 2011

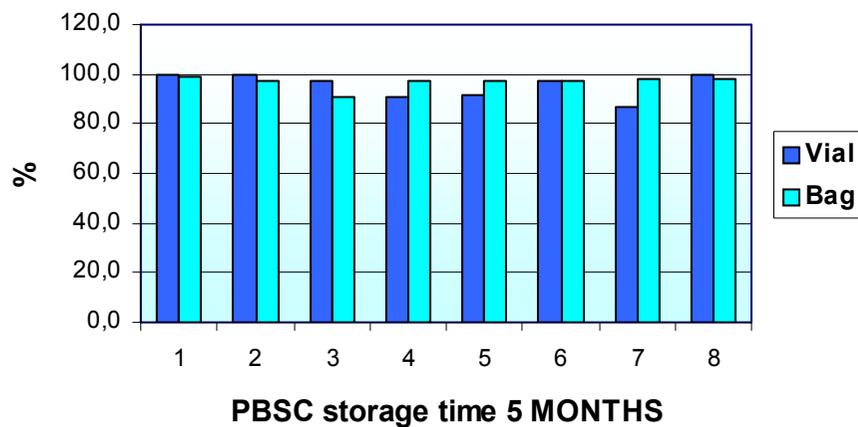
CD34+ cells Viability



CD34+ cells Viability

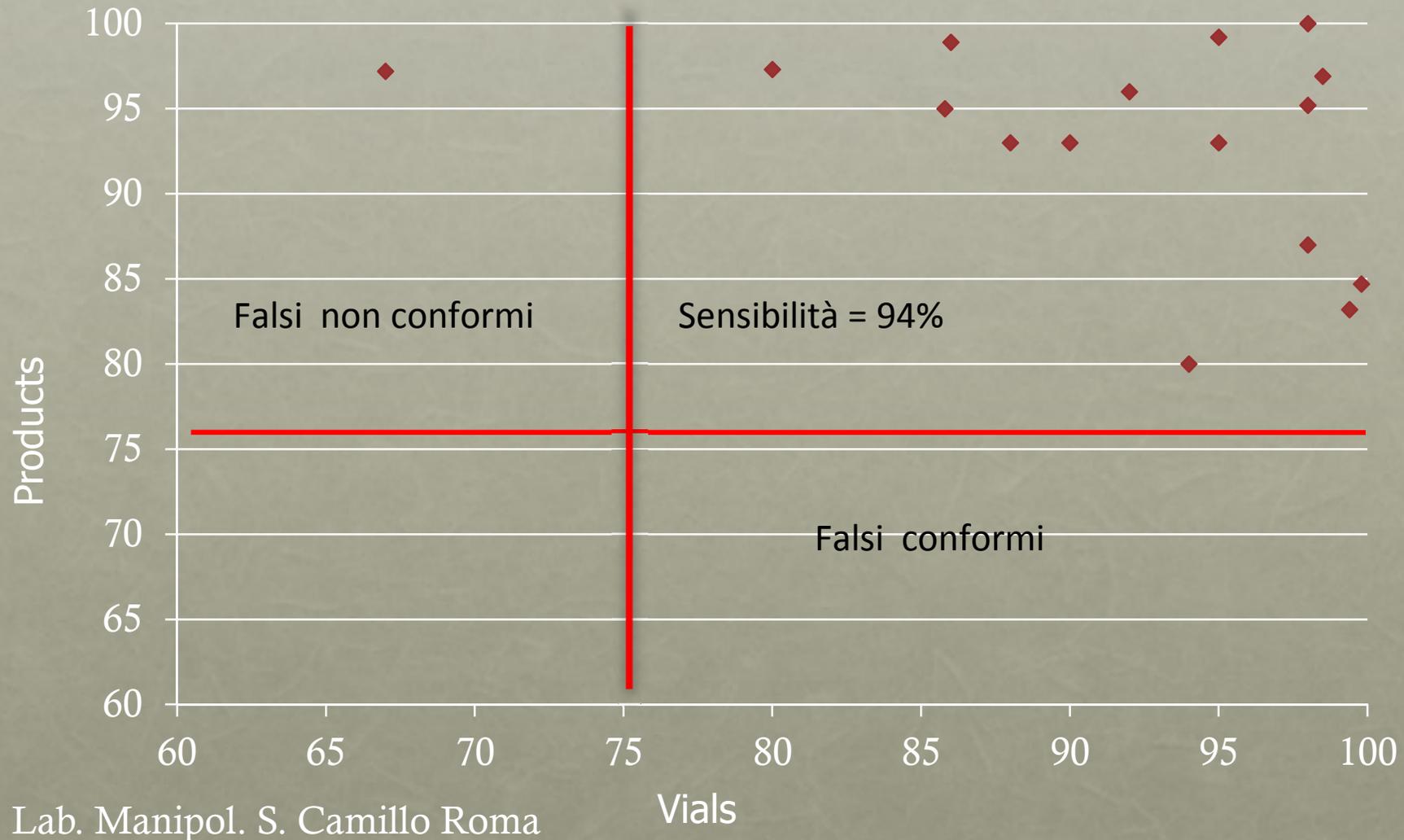


CD34+ cells Viability

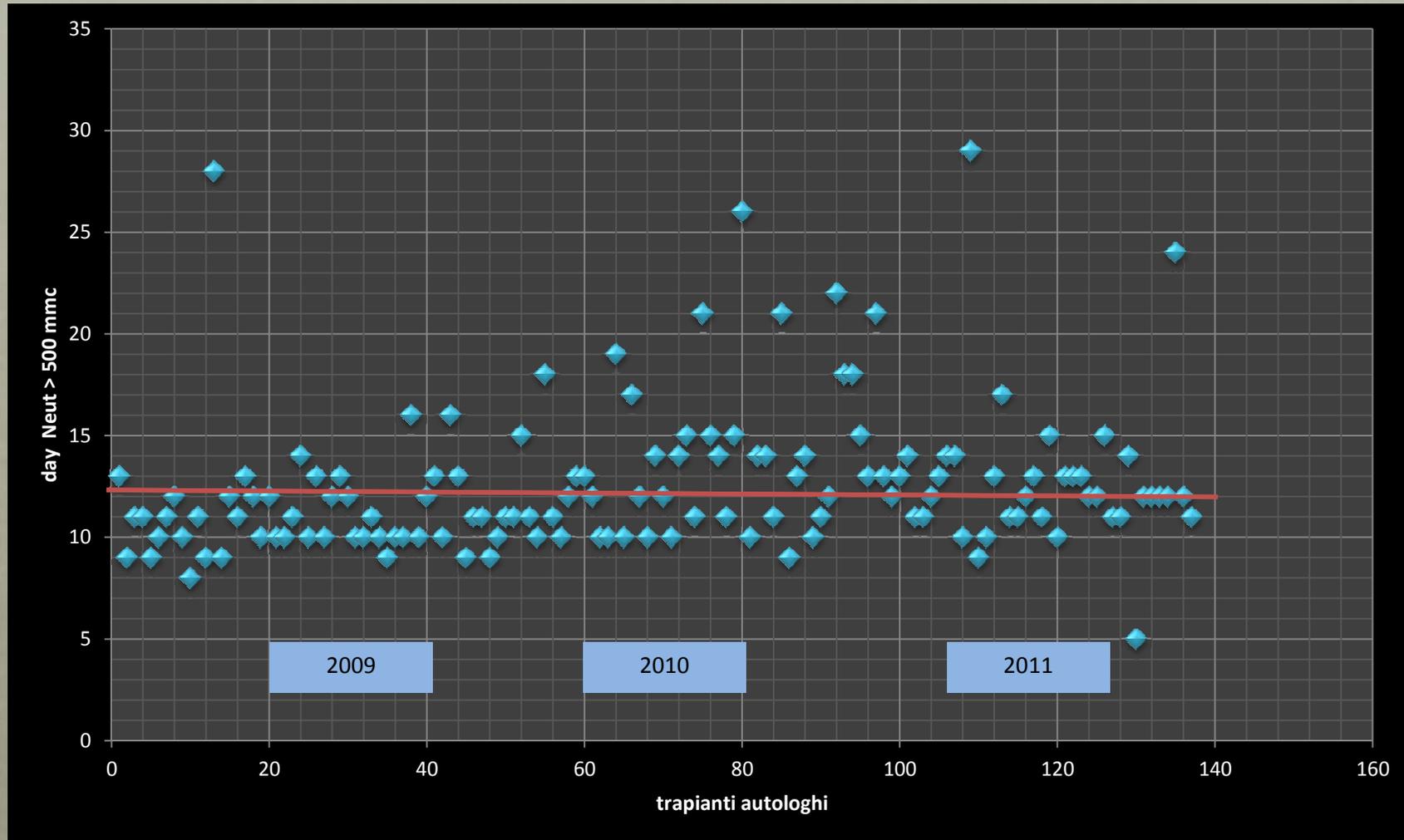


| | Vial | Bag |
|--------|------|------|
| mean | 96,0 | 94,9 |
| St Dev | 6,28 | 5,21 |
| CV% | 6,54 | 5.49 |

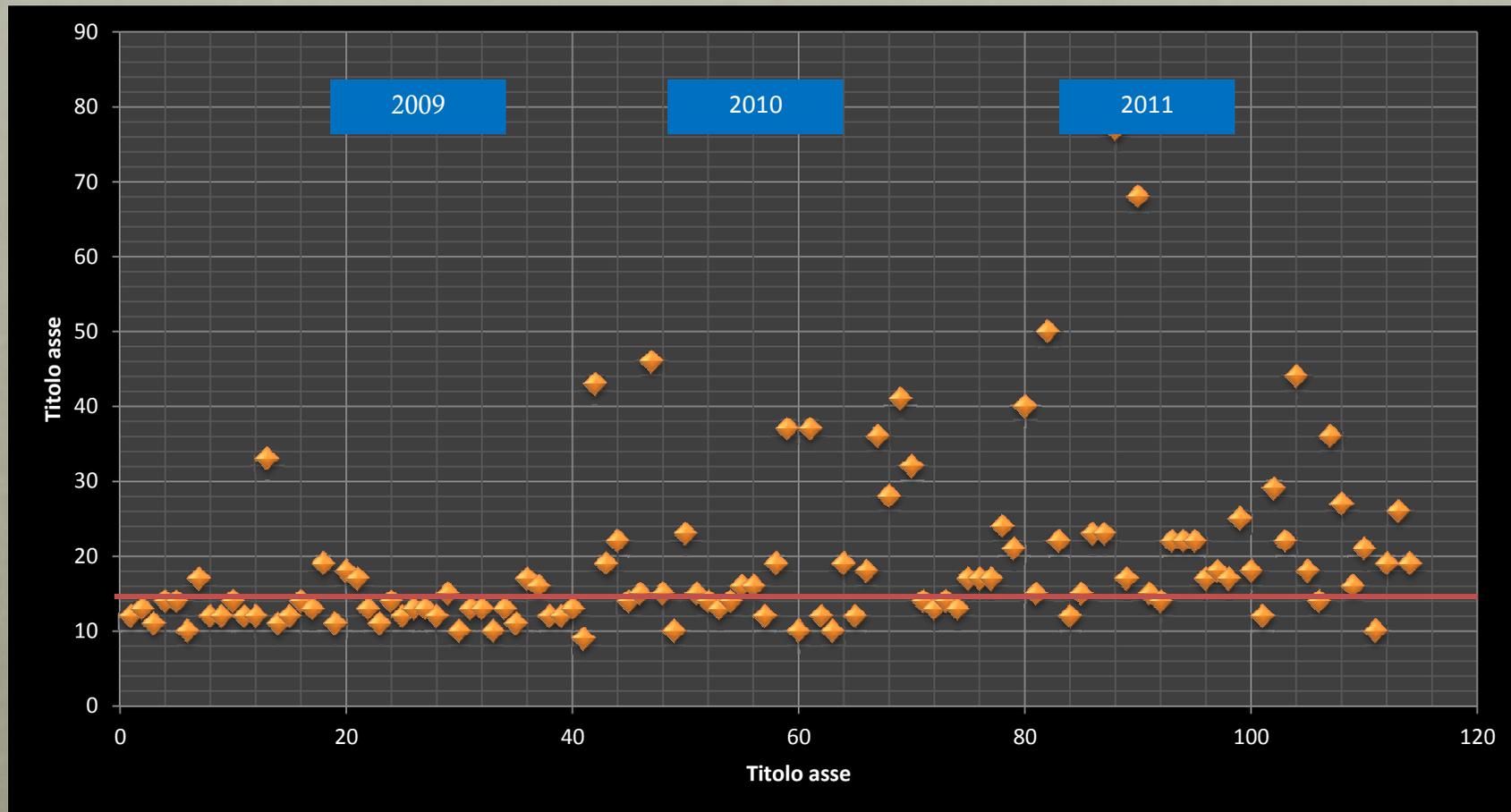
Predictive utility of cryovial



OUTCOME ATTECCHIMENTO GRANULOCITARIO (AUTOLOGO) :



ATTECCIMENTO PLT (AUTOLOGO)



IN CONCLUSIONE.....



Meglio prodotti
rilascio > dell 80
uguale o superior
dall'Unità Clinica
sterilità post ma
outcome clinico
veloci e stabili

.....piuttosto che prodotti

