

**XV CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA
DI EMAFERESI E MANIPOLAZIONE CELLULARE**

**XVI CORSO DI AGGIORNAMENTO IN EMAFERESI PER
PERSONALE INFERMIERISTICO E TECNICO**

**3° SIMPOSIO "CELLULE STAMINALI:
DALLA BIOLOGIA ALLA CLINICA"**



Torino, 9-12 novembre 2011 Centro Congressi Lingotto

Produzione di globuli rossi concentrati ad alto valore qualitativo e conservazione a lungo termine

Gianluca Lodi

UO Medicina Trasfusionale
AOU S. Anna – Ferrara
Direttore: Roberto Reverberi

Torino, 10 Novembre 2011

Produzione di Globuli Rossi Concentrati (GRC)

1. Sangue Intero



2. Aferesi





**CENTRO
NAZIONALE
SANGUE**



**MOUNT SINAI
SCHOOL OF
MEDICINE**

International Workshop

**"Making Blood from Progenitors Ex-vivo"
September 19th, 2011**

Organized by
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
and
ITALIAN NATIONAL BLOOD CENTRE
ROME, ITALY

In collaboration with
TISCH CANCER INSTITUTE
MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE
NEW YORK (NY), USA

Aula Pocchiari
Istituto Superiore di Sanità
Viale Regina Elena, 299 - Roma

Good Practices (GPs) & Good Manufacturing Practices (GMPs)

Produzione di emocomponenti (da sangue intero e da aferesi)

- Monitoraggio delle procedure
- Garanzia dei controlli di qualità





European Medicines Agency (EMA)

Stabiliscono le condizioni per la regolamentazione/valutazione
della ... *blood collection, component & derivate production*
... intesa come *pharmaceutical manufacturing process*



... per mezzo degli atti legislativi del ...

Ministero della Salute

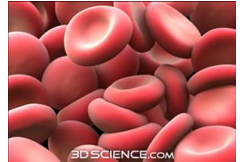
Punti sottoposti a regolamentazione

- Reclutamento, accettazione e **selezione del donatore**
 - registrazione
 - valutazione
 - idoneità
- Procedura della **raccolta (da sangue intero e da aferesi)**
 - presidi medico chirurgici (sacche di raccolta)
 - tecnologie (separatori cellulari, circuiti e/o *bowl*)
 - soluzioni anticoagulanti e preservanti
- Pratica delle **lavorazioni post-raccolta**
(scomposizione/filtrazione/irradiazione)
- Garanzia delle **temperature di conservazione** dei singoli componenti e del plasma da destinare alla produzione degli emoderivati

... nella produzione di GRC viene inoltre stabilito

il criterio per licenziare la soluzione anticoagulante e preservante

**almeno il 75% dei GRC conservati nella
sacca di trasfusione dopo 24 ore dalla loro
infusione deve mantenersi vitale**



Gli emocomponenti sono autorizzati sulla base ...

- dell'analisi e controllo delle procedure di
 - raccolta
 - lavorazione
 - conservazione
- delle disposizioni di legge relative all'esecuzione di
 - esami di validazione biologica
 - prove di compatibilità pretrasfusionali

Per gli emocomponenti non è previsto nessun regolamento . . .

sugli standard di efficacia clinica (*clinical outcomes*)



sulle analisi formali di rischio/beneficio che vengono prodotte per i **terapeutici biologici** (valutazione del risultato terapeutico)

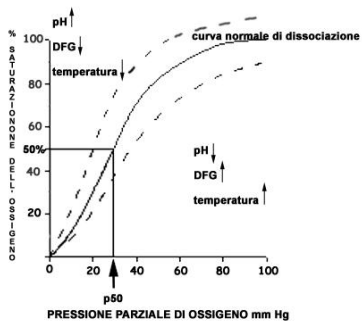


La principale funzione dei GRC

Cessione di O₂ ai tessuti, che dipende dalla capacità dell'Hb

- di cedere l'O₂ che lega (grado di affinità vs conc 2,3 DPG)
- di regolare il flusso ematico (libera *S-nitrosothiol* ad effetto vasodilatante, in proporzione equivalente al grado di ipossia)

CURVA DI DISSOCIAZIONE DELL'OSSIGENO





available at www.sciencedirect.com



www.elsevier.com/locate/jprot

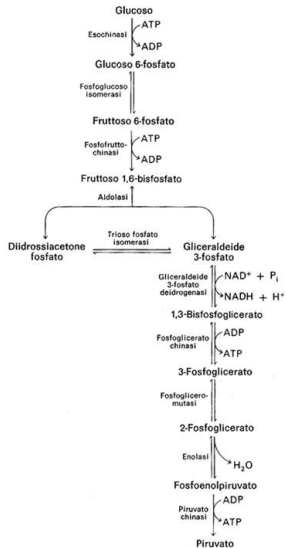


Review

Red cell storage[☆]

John R. Hess*

University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA



GRC. Lesioni da conservazione (I)

Perdita di energia (ATP) ... indispensabile per

- mantenimento della forma biconcava della cellula
- garantire la necessaria flessibilità di membrana

- **Danni reversibili** appena infusi i GRC rapidamente recuperano uno stato di alta (adeguata) energia, in presenza di sufficienti quantità di AMP/ADP
- **Danni irreversibili** le severe modificazioni strutturali (progressive fino all'emolisi) e di funzione che si presentano dopo prolungata conservazione non sono reversibili dopo il ripristino di ATP

GRC. Lesioni da conservazione (II)

Perdita di vitalità ... determinata da

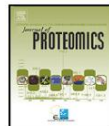
- Calo progressivo di conc intracell di 2,3 DPG / ATP / NO
- Formazione di lattato e consensuale calo di pH intracell
- Liberazione nel mezzo di conservazione di potassio
- Calo progressivo della deformabilità
- Rilascio di microvescicole (trombogeniche)
- Generazione di citochine (proinfiammatorie)



available at www.sciencedirect.com



www.elsevier.com/locate/jprot



Review

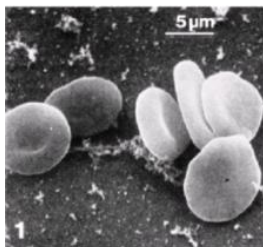
Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s)

Niels Lion^{a,b,*}, David Crettaz^a, Olivier Rubin^a, Jean-Daniel Tissot^a

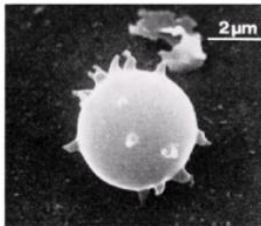
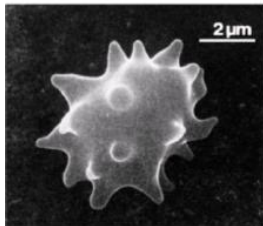
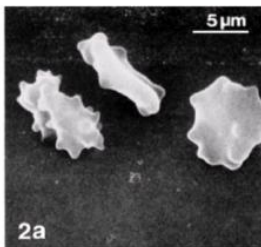
^aService Régional Vaudois de Transfusion Sanguine, Lausanne, Switzerland

^bLaboratoire d'Electrochimie Physique et Analytique (LEPA), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Switzerland

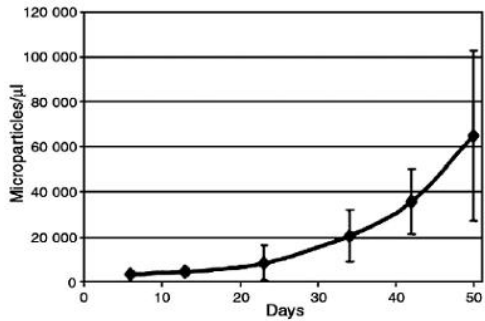
Discocita



Echinocita



Sferoechinocita (microvescicole)



Fenomeno di **microvescicolazione**
(GRC conservati in SAGM a 4°C)

Il fenomeno della **microvescicolazione** comporta

- irrigidimento di membrana e aumento di viscosità
 - causa di riduzione del flusso nel circuito capillare
- libera circolazione di molecole proinfiammatorie e procoagulanti
 - presenti sulla parete delle microvescicole
- progressiva lisi cellulare e liberazione di Hb e stromi
 - causa di danno endoteliale (> tubulo renale prossimale)

Emolisi (FDA - EMeA)

- *FDA (USA)* autorizza le soluzioni anticoagulanti e preservanti se alla fine della conservazione comportano **emolisi $< 1\%$**
- *EMeA (UE)* autorizza le soluzioni anticoagulanti e preservanti se alla fine della conservazione comportano **emolisi $< 0,8\%$**
- *FDA (USA)* ha quindi introdotto la **95/95 rule**:
il 99% delle unità GRC deve presentare emolisi $< 1\%$ per avere il 95% di certezza che il 95% delle unità sia validata
... che porta ad un **cut-off = 0,35%**

Lesioni da conservazione vs eventi avversi

Studi di coorte retrospettivi
dimostrano correlazione diretta tra durata della conservazione e indice di
morbidità/mortalità dopo trasfusione di GRC

**Meta-analysis of clinical studies of the purported deleterious
effects of “old” (versus “fresh”) red blood cells: are we
at equipoise?**

Eleftherios C. Vamvakas

*The available data do not support an adequate suspicion that old RBCs may be
associated with common adverse morbidity and/or mortality outcomes*

(TRANSFUSION March 2010)

Trials clinici randomizzati

- *RECESS (Red Cell Storage Duration Study) trial*
 - *NHLBI Transfusion Medicine and Hemostasis Clinical Trials Network (RBCs stored for 10 days or less vs 21 days or more in more than 12 years old ... in cardiac surgery patients)*
- *ABLE (Age of Blood Experiment) study*
 - *Canadian Clinical Trials Group (RBCs stored for 2 to 8 days vs 2 to 42 days in patients 16 years old or more ... in intensive care unit)*
- *ARIP (Age of Red Blood Cells in Premature Infants) study*
 - *Canada (RBCs stored for less than 7 days or to the standard of practice)*

Strategie di miglioramento per ... GRC ad alto valore qualitativo

- 1 Rigorosa selezione del donatore
- 2 **Uniformare i valori Hct** delle unità raccolte
- 3 Uniformare l'efficienza di separazione
- 4 Verificare e migliorare l'efficienza della **leucodeplezione**
(la rimozione di 3-5 log porta ad una percentuale di emolisi $< 0,2\%$)
- 5 Evitare la rimozione del *buffy coat* (ricco di reticolociti)
- 6 Migliorare gli attuali **sistemi di conservazione**
- 7 Trasfondere sangue fresco (*short storage*)
- 8 Eliminare il *removal-prone RBCs*

Removal-prone RBCs

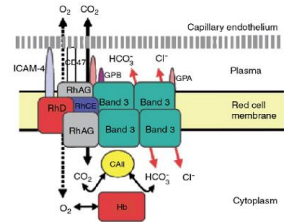
- Frazione (circa 30%) di GRC trasfusi che vengono rimossi entro 24h dal sistema reticolo endoteliale del ricevente
- Principale responsabile degli effetti collaterali (soprattutto nei politrasfusi)
 - accumulo marziale
 - stato infiammatorio (adesione GRC all'endotelio)
 - reazioni immuni (allo e auto anticorpi)
- Riducibile mediante l'impiego di nuove soluzioni conservanti
- Rimuovibile !?

Gerociti (senescent erythrocytes)

In Vivo

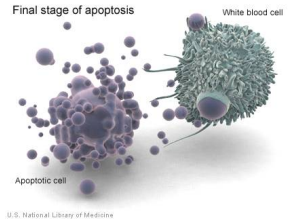
I gerociti vengono individuati

- dagli anticorpi (autologhi) prodotti verso antigeni di senescenza generati dalle modificazioni del dominio banda 3 (Naturally occurring antibodies = Nabs)
- dalla esposizione di fosfatidilserina



In Vitro

Analoghe modificazioni intervengono negli eritrociti durante la conservazione



U.S. National Library of Medicine

Red cell membrane: past, present, and future

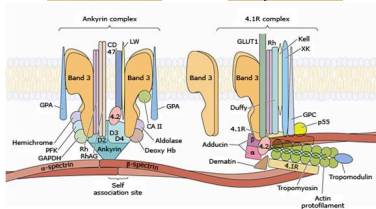
Naris Mohandas and Patrick G. Gallagher



Naris Mohandas



Patrick G. Gallagher





- Applicazioni della proteomica
 - allo studio delle
lesioni da conservazione dei GRC
 - Responsabile: Lello Zolla
 - Collaboratori: Anna Maria Timperio, Sara Rinalducci, Gian Maria D'Amici, Angelo D'Alessandro, Federica Gevi
 - Convenzionato con il Centro Nazionale Sangue
- Studio dei fenomeni di stress ossidativo subiti dalle proteine della membrana eritrocitaria durante lo stoccaggio di emazie leucodeplete risospese in soluzioni additive



Published Ahead of Print on October 11, 2011; as doi:10.3324/haematol.2011.051789
Copyright 2011 Ferrata Storti Foundation.

haematologica

the hematology journal

Early Release Paper

Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered erythrocyte concentrates: from metabolism to proteomics

by Angelo D'Alessandro, Gian Maria D'Amici, Stefania Vaglio, and Lello Zolla

Haematologica 2011 [Epub ahead of print]

Citation: D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, and Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered erythrocyte concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica*. 2011; 95:xxx
doi:10.3324/haematol.2011.051789

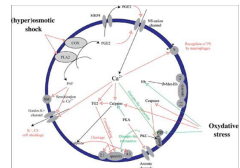
Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions

T. Yoshida,¹ J. P. AuBuchon,² L. Tryzelaar,¹ K. Y. Foster¹ & M. W. Bitensky¹

¹Biomedical Engineering Department, Boston University College of Engineering, Boston, MA, USA

²Cell Labeling Laboratory, Department of Pathology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, NH, USA

Conservare i GRC in atmosfera di gas inerti a saturazione di $O_2 < 4\%$... fino a 9 settimane!!



Sistemi di conservazione

- SAGM (ipertonico = 376 mOsm/L) e PAGGS (isotonico = 285 mOsm/L)
- AS-1 = *Adsol* (ridotto contenuto di mannitolo, rispetto al SAGM)
- AS-3 = *Nutricel* (ricco in fosfato e citrato, ma privo di mannitolo)
- AS-5 = *Optisol* (composizione simile al SAGM)

- RAS-2 = *ErythroSol* (autorizzato in Europa, con 1/2 dose CPD)

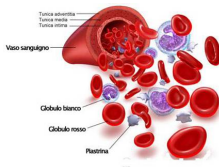
- EAS-64/76 = *Experimental Additive Solution* (arricchito di bicarbonati)
Hess, TR 2000/03
- AS in maggior volume (e con un miglior sistema tampone)
Hamasaki, VS 2000
- *Washing*
Meryman, VS 1991

Leucodeplezione

Dalla lisi dei globuli bianchi vengono liberati enzimi (glicosidasi, lipasi e proteasi) che attaccano la membrana eritrocitaria determinando:

- rimozione della componente glucidica (immunoprotettiva)
- dealchilazione dei lipidi
- clivaggio delle proteine

Rimuovendo i leucociti si migliora la vitalità dei globuli rossi e si riduce l'emolisi



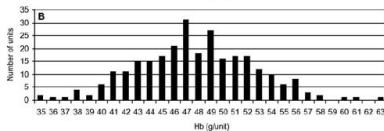
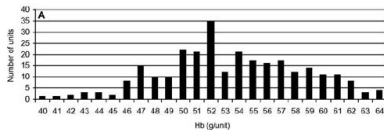
Uniformare i valori Hct delle unità raccolte

Contenuto di Hb . . . sempre diverso per

- il diverso valore per ogni singolo donatore
- le diverse lavorazioni post-raccolta (leucodeplezione, rimozione *buffy coat*)
- il diverso momento dell'utilizzo



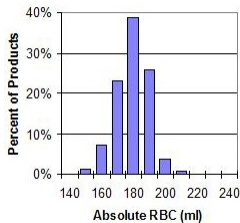
Contenuto di Hb in unità GRC (in AS) private di *buffy coat*



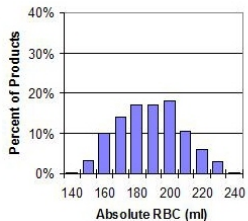
Contenuto di Hb in unità GRC (in AS) private di *buffy coat* e leucodeplete

GRC da aferesi: quantità

1. GRC da aferesi



2. GRC da sangue intero



GRC da aferesi: qualità (I)

Parametri (range)	GRC da aferesi	GRC da sangue intero (leucodepleti)
Contenuto medio di Hb / unità	58.1 g (53 – 61.2 g)	59.6 g (45.2 – 76.6 g)
Ematocrito medio	62% (61-65%)	58% (50-76%)
Volume medio dell'unità	269 mL (249-282)	302.7 mL (258-349)

GRC da aferesi: qualità (II)

	GRC da aferesi			GRC da sangue intero		
giorno	3	21	42	3	21	42
Hb libera (mg/dl)	9 ± 1	25 ± 9	43 ± 15	14 ± 3.8	42 ± 17.2	112 ± 56
K ⁺ (mmol/l)	2.24 ± 0.35	33.4 ± 2.34	46.6 ± 3.28	5.13 ± 0.4	34 ± 3.5	54.6 ± 5.8
pH	7.2 ± 0.2	6.8 ± 0.04	6.6 ± 0.1	6.9 ± 0.07	6.6 ± 0.03	6.5 ± 0.04

Valori espressi come media e deviazione standard

Doppia raccolta GRC in aferesi

- Procedura completamente automatica
- Validata per unità di raccolta fisse e mobili
- Prodotto raccolto con contenuto Hb programmabile
- Standardizzazione della raccolta
- Garanzia di integrità dei GRC
- Anticoagulazione costante
- Filtrazione in linea
- Risospensione in sol additiva
- Ottimale sottrazione plasma
- Ben tollerata dal donatore

Doppia raccolta GRC in aferesi: reazioni alla donazione

Procedure	n	Pallore	Nausea Vomito	Sincope	Convulsioni	Cefalea	Tossicità da citrato
Sangue intero	26290	1:111	1:1000	1:588	1:2941	1:4348	0
Piastrinoaferesi	4150	1:147	0	1:4000	1:4000	0	1:4000
Plasmaferesi	42185	1:55	1:10000	1:769	1:4166	0	0
2GRC aferesi	1683	1:52	0	0	0	0	0

Doppia raccolta GRC in aferesi: buona tolleranza

- Il tempo di donazione (circa 30 min) porta ad un buon equilibrio volemico
- Il rimpiazzo con soluzione salina comporta isovolemia
- La stringente selezione porta alla donazione soggetti in condizioni ottimali
- Non sono evidenti differenze
 - di pressione / frequenza cardiaca
 - nei tempi di recupero di Hb / Hct

nei donatori di 2GRC in aferesi vs donatori di 1GRC in aferesi

Doppia raccolta GRC in aferesi: vantaggi per il paziente

- Riduce l'esposizione antigenica
- Riduce l'effetto immunomodulante
- Migliora il controllo del dosaggio terapeutico
- Riduce (nelle prime fasi) i danni da conservazione
- Limita le sedute trasfusionali

Mibtel GRC ad alto valore qualitativo

- = sistemi di conservazione
- = procedure di congelamento
- ▲ *tailored donation/transfusion*
- = raccolta in aferesi
- ▲ leucodeplezione *prestorage*
- ▼ rimozione *buffy coat*
- »» rimozione dei gerociti
- »» impiego della proteomica



**XV CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA
DI EMAFERESI E MANIPOLAZIONE CELLULARE**

**XVI CORSO DI AGGIORNAMENTO IN EMAFERESI PER
PERSONALE INFERMIERISTICO E TECNICO**

**3° SIMPOSIO "CELLULE STAMINALI:
DALLA BIOLOGIA ALLA CLINICA"**



Torino, 9-12 novembre 2011 Centro Congressi Lingotto