



Emocomponenti ad uso non trasfusionale: produzione, qualità e sicurezza

Marina Buzzi

Banca dei Tessuti del Sangue Cordonale e Biobanca
Policlinico S.Orsola-Malpighi

EuNT

La caratteristica più importante di questi preparati derivati dal sangue adulto o cordonale è il rilascio nel sito di applicazione di un insieme di biomolecole che agiscono contemporaneamente attivando fenomeni autocrini e paracrini e creando un network di azioni che inducono poi l'effetto biologico della riparazione, rigenerazione e guarigione :

CITOCHINE

Sono molecole proteiche che mediante il legame a recettori di membrana o citoplasmatici modulano : crescita, differenziamento e morte delle cellule bersaglio (IL1, IL3, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13)

CHEMOCHINE

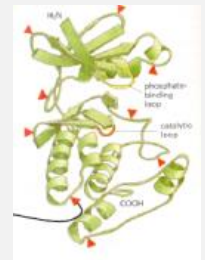
Sono una sottoclasse di citochine con azione chemotattica. La loro funzione caratteristica è stimolare la migrazione cellulare

FATTORI DI CRESCITA

Controllano una serie complessa di eventi: interazione cellula-cellula, cellula-matrice e legandosi ai recettori di superficie (tirosina-chinasi, serina-chinasi o treonina-chinasi) trasducono il segnale agendo sulla regolazione di geni determinando la proliferazione, differenziazione , apoptosi della cellula. (EGF, TGF- α , TGF- β , FGF, VEGF, PDGF, IGF, NGF, BDNF)

PROTEINE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE

Fibronectina, Albumina, Vitamina A, Vitamina E, Neuropeptidi, Alfa 2 macroglobulina



Gli emocomponenti ad uso non trasfusionale non sono sostanze inerti !

Modifiche al decreto 2 novembre 2015, recante: «Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti».

2. Gli emocomponenti per uso non trasfusionale ed i rispettivi requisiti essenziali sono indicati di seguito:

2.1. concentrato piastrinico: è ottenuto dalla centrifugazione del plasma ricco in piastrine; deve avere concentrazione piastrinica pari a $1 \times 10^6/L \pm 20\%$ e volume variabile secondo la tipologia di utilizzo. Può essere usato fresco o dopo congelamento. In concomitanza alla produzione di concentrato piastrinico, può essere prodotto plasma povero di piastrine quale componente accessorio del concentrato piastrinico (produzione di trombina);

2.2. lisato piastrinico: si ottiene dal concentrato piastrinico attraverso procedura di congelamento e scongelamento;

2.3. gel piastrinico: si ottiene a partire dal concentrato piastrinico, usato fresco o dopo congelamento e scongelamento (lisato piastrinico), previa attivazione del processo coagulativo. Di norma viene prodotto in sede di applicazione; può essere generato in fase di produzione e consegnato tal quale per l'uso;

2.4. colla di fibrina: è prodotta a partire dal plasma o dal plasma povero di piastrine, quale attivatore locale dei fenomeni coagulativi in sede chirurgica o quale supporto plastico in procedure chirurgiche;

2.5. collirio da siero: viene prodotto a partire da un prelievo ematico in cui viene attivata la coagulazione e quindi separata la componente sierica. Il siero può essere diluito con un volume di soluzione fisiologica o soluzione salina bilanciata (SSB) stabilito in relazione alla concentrazione dei fattori sierici presenti. La preparazione delle dosi viene effettuata secondo procedure che ne garantiscano la sterilità. Per ciascun prelievo sono prodotte aliquote di volume massimo di 1,5 mL, ciascuna corrispondente ad una somministrazione terapeutica giornaliera;

2.6. concentrato piastrinico collirio: viene prodotto a partire da lisato piastrinico.

- Monociti
- Siero autologo condizionato

Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects

Elii Erdem¹, Meltem Yagmur¹, Inan Harbiyecli², Hande Taylan-Sokeroglu³, Reha Ersoz⁴

Cornea:

September 2008 - Volume 27 - Issue - pp S25-S30
doi: 10.1097/IJO.0b013e3181773a0e
Symposium 1

Autologous Serum Eye Drops for the Treatment of Dry Eye Diseases

Kojima, Takashi MD*; Higuchi, Akhiro PhD†; Goto, Eiki MD‡; Matsumoto, Yukihiro MD†; Dogru, Murat MD‡; Tsubota, Kazuo MD†

Curr Pharm Biotechnol. 2012 Jun;13(7):1257-65.

The role of "eye platelet rich plasma" (E-PRP) for wound healing in ophthalmology.

Alio JL¹, Arnalich-Montiel F, Rodriguez AE.

Review

Comparison of the Clinical Effectiveness of Single Versus Multiple Injections of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis

A Systematic Review and Meta-analysis

Félix Vilchez-Cavazos,* MD, PhD, Juan Manuel Millán-Alanis,* MD,

Autologous serum eye drops for dry eye

Qing Pan^{1,2}, Adia Angelina³, Andrea Zambrano⁴, Michael M Thomas Heflin⁴, Li Tang⁵, and Esen K Akpek⁴

Review

Platelet-derived bio-products: Classification update, applications, concerns and new perspectives

Andrea Acebes-Huerta^a, Tamara Arias-Fernández^a, Ángel Bernardo^{a,b}, María Carmen Muñoz-Turrillas^{a,c}, Judit Fernández-Fuertes^{a,d}, Jerard Seghatchian^{e,1}, Laura Gutiérrez^{a,f,g,1}

Arch Ophthalmol. 2007 Jul;144(7):855-92. Epub 2007 May 9.

Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome.

Yoon KC¹, Heo H, Im SK, You IC, Kim YH, P

TRANSPLANTATION AND CELLULAR ENGINEERING

Proposal of standardized guidelines for the production and quality control of autologous serum eye drops in Korea: based on a nationwide survey

Hye Ryun Lee,¹ Yun Ji Hong,^{2,3} Soe Chung,⁴ Sang Mee Hwang,^{2,3} Taek Soo Kim,^{2,3} Eun Young Song,² Kyoung Un Park,^{2,3} Junghan Song,^{2,3} and Kyou Sup Han²

Meta-analysis

Different Intra-articular Injections as Therapy for Hip Osteoarthritis: A Systematic Review and Network Meta-analysis

Zhihu Zhao, M.D., Jian-xiong Ma, Ph.D., and Xin-long Ma, M.D.

Use of Umbilical Cord Serum in Ophthalmology

Kyung Chul Yoon*

STANDARD DI PRODOTTO ??

In tutti gli studi clinici non viene mai definita in modo chiaro la **preparazione e la caratterizzazione degli EuNT** utilizzati e sussiste inoltre anche una disomogeneità nella denominazione degli stessi.



Blood-Based Treatments for Severe Dry Eye Disease: The Need of a Consensus

Bernabei F et Al, J Clin Med 2019

Data highlights the elevated heterogeneity of processing of blood-based eye drops despite the assumption that any procedure in the preparation may impact the content of the active substances or may influence their delivery.

Preclinical studies are needed to standardize and compare blood based products, and an interdisciplinary work with transfusional medicine specialists is imperative to share information and competences.

There remains many unanswered questions regarding what might be considered optimal treatment, sketched as “The 5 Ws (and 2 Hs) for blood-based eye drops”, as follows.

Who is the patient to be treated, in terms of disease type, severity, and stage?

Why is a blood-based treatment needed, in terms of a target indication?

When is it appropriate to prescribe blood-based therapy, as too late is not always a good option?

Where are the products dispensed? Is a national/regional program a feasible solution to optimize resources?

What is the product of choice? Which source and preparation are targeted for a given patient? Is a patient self-report enough, or should the clinician who prescribed the product report the course, as surgeons do in organ transplants?

How is the product standardized in terms of processing to ensure optimal dilution, solvent, dispenser, and storage time?

How is treatment delivered to the ocular surface, in terms of posology, dose-size modulation, length of treatment, and number of cycles?

Table 1. PRP kits and device tested. Abbreviations: leucocyte platelet-rich fibrin (L-PRF); leucocyte platelet-rich plasma (L-PRP); pure platelet-rich fibrin (P-PRF); Pure platelet-rich plasma (P-PRP).

Type	Activation	System	Device	Manufacturer	Fields	Centrifugation	Ref
L-PRP	A-PRP	Closed	MyCells®	(Kaylight Technologies Ltd., Holon, Israel)	Wound healing	2054 g × 7 min	[12]
L-PRP	A-PRP/AA-PRP	Closed	Regenkit®	(RegenLab En Budron b2, 1052 Le Mont-sur-Lausanne, Swiss)	Wound healing; Hair regrowth	1500 g × 15 min	[2,4]
L-PRP	A-PRP	Closed	i-Stem®	(i-Stem, Biostems, Co., LTD., Seoul, Korea, 138-843)	Hair regrowth	1008 g × 10 min (1st) 1295 g × 10 min (2nd)	–
L-PRP	A-PRP	Closed	Mag-18 PRP®	(DTS MG Co., Ltd., Seoul, Korea, #B108-147)	Hair regrowth	1008 g × 10 min (1st) 1295 g × 10 min (2nd)	–
L-PRP	A-PRP	Closed	C-Punt®	(Biomed Device, MO, Italy, 41126)	Hair regrowth	161 g × 10 min (1st) 287 g × 15 min (2nd)	[4]
P-PRP	A-PRP/AA-PRP	Closed	Angel®	(Arthrex, Inc. Corporate Naples, FL, 1370)	Hair regrowth	1008 g × 15 min	[4]
P-PRP	A-PRP/AA-PRP	Closed	Selphyl®	(Factor Medical LLC, Langhorne, PA, 19047)	Wound healing; Hair regrowth; Breast and face when mixed with Fat graft	1100 g × 10 min	[3]
P-PRF	A-PRP/AA-PRP	Closed	Cascade®	(Musculoskeletal Transplant Foundation, Edison, NJ, 08837)	Wound healing; Hair regrowth; Breast and face when mixed with Fat graft	1100 g × 10 min (1st) 1372 g × 15 min (2nd)	[3]

4. Conclusions

Using the Kit with the PQSs and PQLSs as described in this study enables the isolation of A-PRP/AA-PRP, which meet a consensus quality criteria. As the discovery of new CQAs of PRP evolves, such as with respect to purity and potency, adjustments to these benchmark PQSs and PQLs will hopefully isolate A-PRP/AA-PRP of various CQAs with greater reproducibility, quality, and safety. Confirmatory studies will need to be completed to validate these findings.

Differenti risposte cliniche a seconda del kit utilizzato per la preparazione degli EuNT e a seconda dell' emocomponente prodotto (es: PRP non attivato o attivato).

Più si standardizzano le tecniche di preparazione (tempo, volumi, velocità di centrifugazione), più l' EuNT ottenuto risulta riproducibile

Review

A. Acebes-Huerta, Transfusion and Apheresis Science 2019

Platelet-derived bio-products: Classification update, applications, concerns and new perspectives

Table 1

Summary of aspects covered by proposed PRP-product classifications.

PRP-product classification, as proposed by previous communications consider several aspects. The ISTH classification proposal is the most comprehensive, considering sample collection conditions (anticoagulated blood or not), the purity (red blood cells -RBC- or white blood cells -WBC- content), the number of platelets in the product, whether platelets have been activated or not, or whether the PRP product has been frozen/thawed prior use.

	Dohan Ehrenfest (87)	DEPA (88)	ISTH (89)
Coagulated or not (PRP vs Fibrin Rich)	Yes	No	Yes
Preparation Method	No	No	Yes
WBC content	Yes (Leukocyte poor vs rich)	Yes (Purity)	Yes
RBC content	No	Yes (Purity)	Yes
Platelet number	No	Yes (Dose)	Yes
Platelet enrichment (PRP vs Whole Blood)	No	Yes (Efficiency)	No
Activation (Thrombin, CaCl ₂ ...)	No	Yes (Activation)	Yes
Frozen/Thawed	No	No	Yes

Table 2

Proposed matrix for new nomenclature classification of PRP products obtained.

Where PRP is the core ID, the Subscript refers to the application method, the Prefix refers to the characteristics and quality of the product, and the Superscript might be used to refer to other processing procedures prior application. For example, Leucocyte rich PRP lysed by 2 cycles of freeze-thaw eliminating cell debris by centrifugation, obtained from whole blood donation should now be called L-PRP_{FT2}^{WB, NoD}. The matrix could be extended per demand of new variables.

Subscript	Description
F	Fresh product. Contains live/intact platelets.
A	Platelets have been stimulated to release their cargo. It should be stated whether it has been activated by thrombin, collagen, CaCl ₂ , etc.
FTⁿN^m	Platelet rupture has been induced, and platelet content is released.
Sn	It should be stated whether platelets have been ruptured by freezing/thaw (FT) cycles ("N" is the number of cycles) or by sonication (Sn).
Superscript	Description
NoD	When an extra centrifugation is applied to remove cell debris, after activation, or mechanical rupture, it should be indicated.
Aph/WB	Apheresis or Whole Blood donation.
Prefix	Description
L	Contains WBC above threshold for pure PRP.
R	Contains RBC contamination.
Fn	Fibrin Rich.
PF	Plasma Free.

Cosa significa STANDARD DI PRODOTTO?

- Ottimizzazione e Standardizzazione della preparazione (tempi, volumi, incubazioni, centrifugazioni, reagenti usati)
- Valutazione del contenuto in biomolecole (non correlano necessariamente con il numero di Plt)
- Scelta del device ottimale per la conservazione e distribuzione
- Valutazione in vitro dose/risposta
- Valutazione in vivo dell'efficacia

OTTIMIZZAZIONE E STANDARDIZZAZIONE DI CONCENTRATI PIASTRINICI DA SANGUE CORDONALE: ESPERIENZA DELLA RETE DELLE BANCHE CORDONALI ITALIANE

Multicentre standardisation of a clinical grade procedure for the preparation of allogeneic platelet concentrates from umbilical cord blood

Rebulla P et Al , Blood Transf 2015

Table III - Volume, total platelet count, total white blood cell (WBC) count, total red blood cell (RBC) count, and haemoglobin (Hb) content of cord blood (CB) units before processing, of platelet rich plasma (PRP) obtained after the first centrifugation and of the final CBPC before cryopreservation.

Unit/Fraction	Volume (mL)	Platelets (10 ⁹)	WBC (10 ⁶)	RBC (10 ⁹)	Hb (g)
CB unit	97.6±20.2	23.4±6.8	956.8 (535.9-1430.2)	305.5 (195.1-463.5)	7.4±2.1
PRP	34.7±9.8	14.3±5.8	12.7 (2.7-151.5)	0.8 (0-3.0)	n.d.
% recovery from CB	n.d.	59.7±19.3	1.4 (0.3-13.2)	0.3 (0-0.9)	
CBPC	11.4±4.4	11.3±4.9	7.2 (1.0-105.7)	0.6 (0.2-2.4)	n.d.
% recovery from PRP	n.d.	79.2±21.7	67.5 (10.6-144.8)	n.d.	
% recovery from CB	n.d.	47.7±17.8	0.8 (0.1-12.0)	0.2 (0.1-0.7)	

Table IV - Volume and platelet concentration (mean±SD) and coefficient of variation (CV) of platelet concentration of the CBPC prepared at the different banks participating in the Italian Cord Blood Platelet Gel project.

Bank (n. of CBPC)	Volume (mL)	Platelet concentration (x10 ⁹ /L)	CV of platelet concentration (%)
A (180)	10.0±3.7	991±83	8
B (152)	11.6±4.8	1,016±216	21
C (129)	11.8±4.7	939±156	17
D (112)	13.4±5.0	1,041±133	13
E (89)	10.8±3.6	944±327	35
F (71)	10.1±3.4	1,066±225	21
G (70)	13.6±4.2	895±374	42
H (64)	15.5±4.5	1,031±225	22
I (61)	11.1±2.7	1,020±195	19
L (58)	8.4±2.1	1,066±185	17
M (47)	11.0±4.4	983±138	14
N (30)	10.3±3.3	1,174±530	45

SD: standard deviation; CBPC: cord blood platelet concentrates.

Table V - Costs (in Euro) incurred at one bank for the production of one CBPC.

Item	Cost/item	N.	Cost/CBPC
<i>Materials</i>			
Wafers for sterile docking	3.29	3	9.87
Multiple bag kit for 1 st centrifugation	6.10	0.25	1.53
Multiple bag kit for 2 nd centrifugation	17.69	0.50	8.85
Multiple bag kit for CBPC cryopreservation	25.25	0.33	8.33
Subtotal			28.58
<i>Laboratory tests and labour</i>			
CB group (ABO/Rh)	7.90	1	7.90
Complete blood count	4.05	5	20.25
HBsAg	10.00	1	10.00
Anti-HCV	8.95	1	8.95
Anti-TPHA	3.70	1	3.70
Anti-HTV1/2	8.95	1	8.95
HTLV-I/II	13.15	1	13.15
Tri-NAT (HCV, HIV, HBV)	18.00	1	18.00
PPP culture	26.44	1	26.44
Technician's time (Euro/hour)	30.00	0.5	15.00
Subtotal			132.34
Total			160.92

Conclusions

In conclusion, our study suggests that CBPC can be easily standardised at the national level. This evidence could facilitate the development of clinical trials aimed at the full evaluation of the therapeutic value of this new blood component in different conditions. Based



Autologous serum eye drops for dry eye

Qing Pan^{1,2}, Adla Angelina³, Andrea Zambrano⁴, Michael Marrone⁵, Walter J Stark⁴, Thomas Heflin⁴, Li Tang⁶, and Esen K Akpek⁴

BIOLOGICAL EYE DROPS

Am J Ophthalmol. 2007 Jul;144(1):86-92. Epub 2007 May 9.

Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome.

Yoon KC¹, Heo H, Im SK, You IC, Kim YH, Park YG.

CLINICAL SCIENCE

Application of Umbilical Cord Serum Eyedrops for the Treatment of Dry Eye Syndrome

Kyung-Chul Yoon, MD, PhD,* Seong-Kyu Im, MD,* Yeoung-Geol Park, MD, PhD,*
Young-Do Jung, MD, PhD,† Seong-Yeul Yang, MD, PhD,† and Jin Choi, MD, PhD‡

Comparative role of 20% cord blood serum and 20% autologous serum in dry eye associated with Hansen's disease: a tear proteomic study

Somnath Mukhopadhyay¹, Sumali San², Himadri Datta²

Cornea:

September 2008 - Volume 27 - Issue - pp S25-S30

doi: 10.1097/ICO.0b013e31817f3a0e

Symposium 1

Cornea • Volume 25, Number 3, April 2006

Autologous Serum Eye Drops for the Treatment of Dry Eye Diseases

Cornea. 2011 Jul;30(7) Kojima, Takashi MD*; Higuchi, Akihiro PhD†; Goto, Eiki MD‡; Matsumoto, Yukihiko MD†; Dogru, Murat MD†; Tsubota, Kazuo MD†

Application of umbilical cord serum eyedrops for recurrent corneal erosions.

Yoon KC¹, Choi W, You IC, Choi J.

Int J Ophthalmol. Vol. 7, No. 5, Oct.18, 2014 www. IJO. cn
Tel:8629-82245172 8629-82210956 Email:ijopress@163.com

·Clinical Research·

Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects

*Elii'Erdem*¹, *Meltem Yagmur*¹, *Inan Harbiyeli*², *Hande Taylan-Sekeroglu*³, *Reha Ersoz*¹

Use of Umbilical Cord Serum in Ophthalmology

Kyung Chul Yoon*

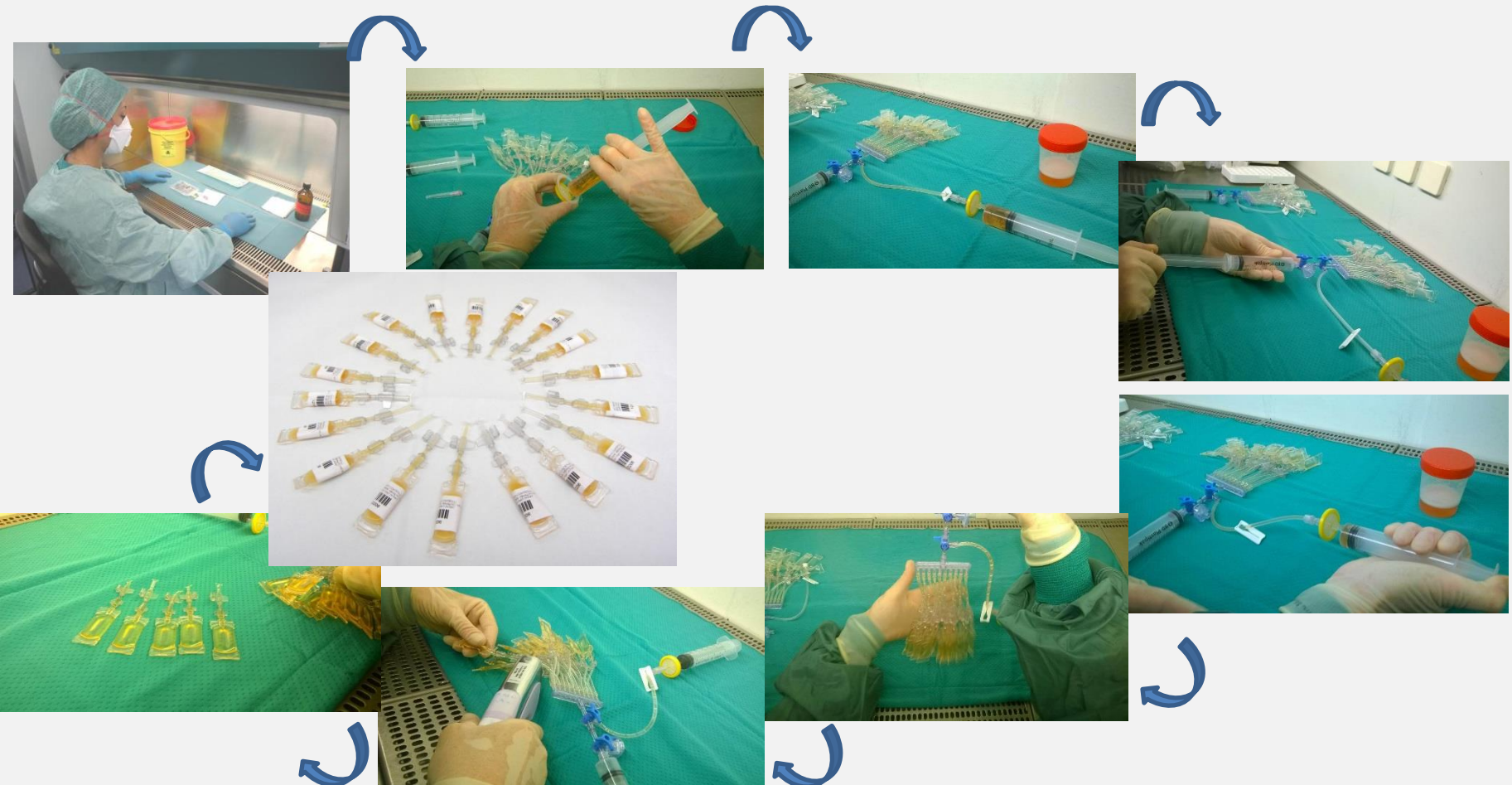
Efficacy of Standardized and Quality-Controlled Cord Blood Serum Eye Drop Therapy in the Healing of Severe Corneal Epithelial Damage in Dry Eye

Versura P et Al , Cornea 2013

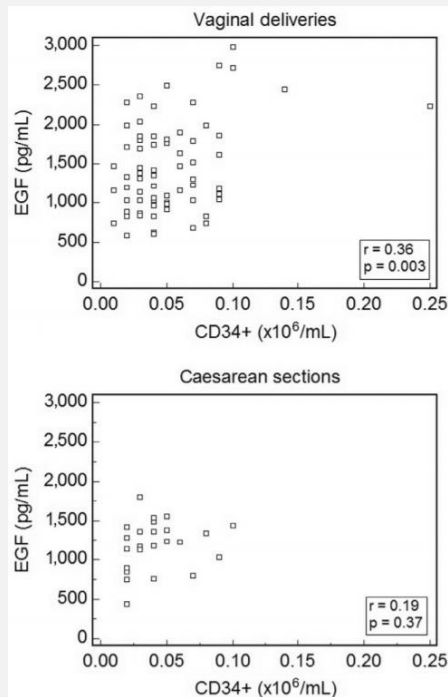
STANDARDIZZAZIONE E PREPARAZIONE SIERO COLLIRIO

- Abbiamo deciso arbitrariamente di standardizzare il nostro prodotto rispetto al contenuto di **EGF**, essendo questo un fattore rilevante nel mantenimento dell'omeostasi della superficie oculare.
- Il contenuto di EGF si è dimostrato variare da soggetto a soggetto ma nella maggior parte dei sieri testati aveva un valore $> 1.0 \text{ ng/ml}$
- Abbiamo considerato quindi questo come valore soglia per i campioni finalizzati alla preparazione del siero collirio
- Per cercare di ridurre la variabilità si è deciso di preparare i colliri partendo da pool di 10 sieri omogruppo
- La diluizione del pool è stata quindi definita del 20% in soluzione fisiologica, per ottenere una fornitura giornaliera di EGF di $0,10\text{-}0,30 \text{ ng / ml}$ che corrisponde ad circa **0.15 ng /occhio**, simile al contenuto fisiologico di lacrime umane.
- La diluizione inoltre riduce la quantità di TGF beta che ad alte concentrazioni inibisce la crescita epitelio corneale (Karamichos D et al 2014, Panchioli S et al 1998)

Sotto cappa a flusso laminare in camera sterile i sieri preselezionati sono stati scongelati, riuniti, diluiti al 20% con soluzione salina tamponata con fosfato e filtrati (Millex HV 0,4 μm). La preparazione è stata quindi suddivisa in fiale monodose (0.8-1 ml) utilizzando un dispositivo medico COL-20 (Biomed Italy). Le singole fiale sono state poi etichettate, registrate nel sistema gestionale informatico e congelate a -80°C . La scadenza a -80°C è di 2 anni.



GF	Source	Median	Min	Max	p
EGF	CB-S	1,254.4	516.8	2,824.0	<0.0001
	PB-S	646.0	283.8	1,754.0	
IGF-1	CB-S	53.5	40.3	81.2	<0.0001
	PB-S	159.9	76.7	352.0	
TGF- β	CB-S	51.3	30.2	75.1	<0.0001
	PB-S	38.4	19.8	52.8	
VEGF	CB-S	686.8	31.9	1,856.0	<0.0001
	PB-S	30	21	35	



Confronto tra CBS
e siero materno

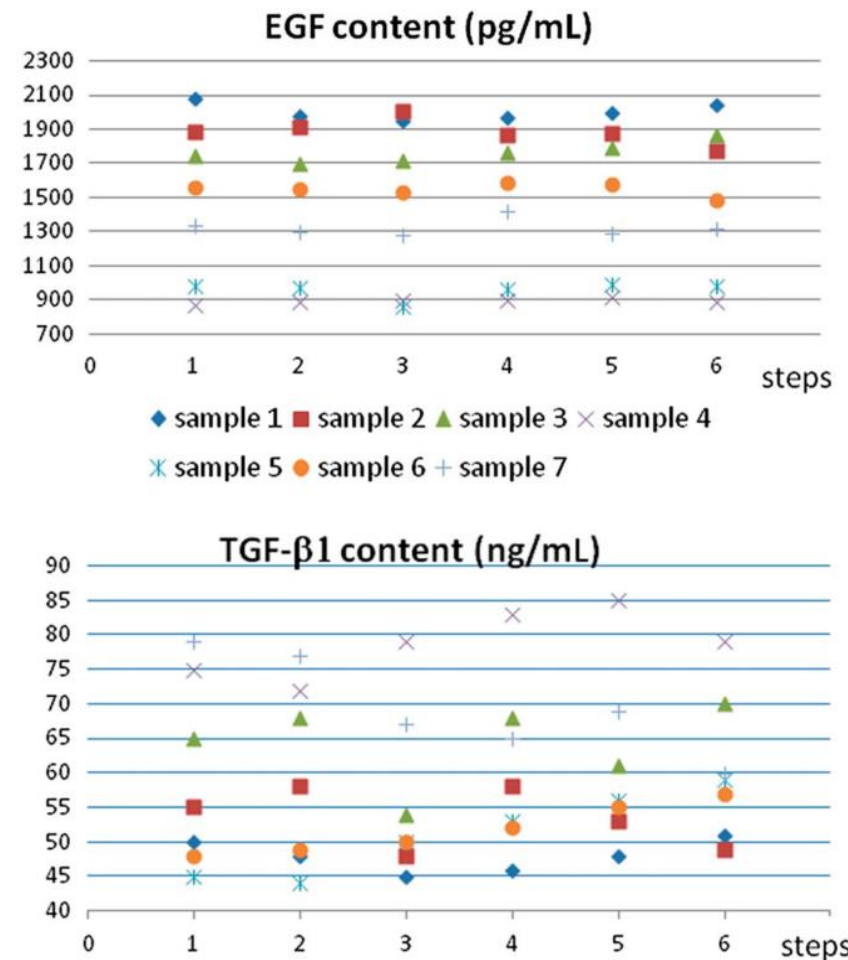


FIGURE 2. Evaluation of EGF and TGF- β 1 content in different step points of the preparation procedure of CBS eye drops,

La valutazione del contenuto di EGF e TGF-beta1 in tutte le fasi di preparazione del siero collirio cordonale hanno dimostrato che non vi sono variazioni nel contenuto dovute alla manipolazione e alla conservazione a lungo termine

Confronto tra lacrime e vari emocomponenti

Table 1. Comparison of several components between natural tears and different hemoderivatives used in corneal surface.

Component	Tear	AS	PRP	UCS
pH	7.4	7.4	6.61–7.26	7.4
Osmolarity	298–300	296	296	296
Water (%)	98	91	–	–
Albumin (g/dL)	0.39	4–5.3	–	–
Globulins (g/dL)	0.27	2.3	–	–
EGF (ng/mL)	0.2–0.3	0.1–0.2	0.27–4.9	0.5
TGF- β (ng/mL)	2–10	6–33	6.4–67.3	57
NGF (pg/mL)	107.5–468	54–401	37.7	730
IGF-1 (ng/mL)	75.5–157	375	93.5	230
PDGF (ng/mL)	1.33	15–17	13–86	–
VEGF (pg/mL)	–	34.7–160	60–124	–
Vitamin A (ng/mL)	16	372	–	231
Vitamin C (mg/mL)	0.117	0.02	–	–
SP (pg/mL)	69.8–157	71–169	–	245
Lysozyme (mg/mL)	1.4	6	–	6
Surface IgA (μ g/mL)	1190	2	–	–
Fibronectin (μ g/mL)	21	30–205	28.9–31.1	–
Lactoferrin (ng/mL)	1650	266	–	–
Calcium (mmol/L)	0.3–2	2.5	–	–
Potassium (mmol/L)	26–42	4.5	–	–
Sodium (mmol/L)	120–170	140	–	–

AS: autologous serum; EGF: epidermal growth factor; IGF-1: insulin-like growth factor 1; NGF: nerve growth factor; PDGF: platelet-derived growth factors; PRP: platelet-rich plasma; SP: substance P; TGF- β : transforming growth factor β ; UCS: umbilical cord blood serum; VEGF: vascular endothelial growth factor.

Villatoro AJ et al,
Int. J. Mol. Sci. 2017,18, 2264

Progetti di ricerca Regionale Piano Sangue e Plasma per il triennio 2013-2015

“Efficacia comparativa di colliri a base di sangue omologo da fonti diverse nel trattamento di cheratopatie gravi. - Studio clinico randomizzato”

Finanziato 25 giugno 2015 protocollo 60400 – CRS a Marina Buzzi

Protocollo CE 100/2016/O/Sper, PI Prof. E. Campos, approvato 11 ottobre 2016

Autorizzazione DG 10 gennaio 2017

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03064984

	N°	Maschi	Femmine	Gruppo ABO
Donatori di sangue	123	29	94	A 43, B 9, AB 17, O 54
Unità di sangue cordonale	107	59	48	A 45, B 9, AB 9, O 44

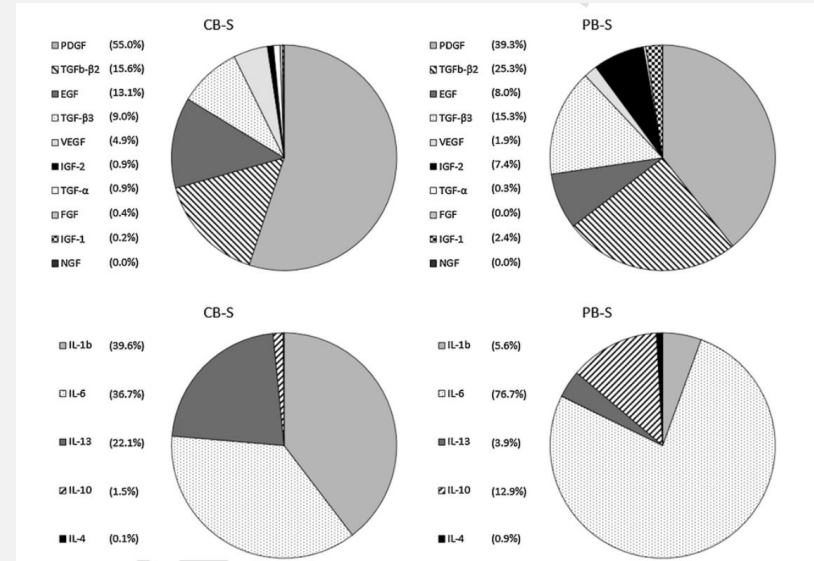


A partire da questi sieri, solo per il trattamento dei 60 pazienti arruolati nel protocollo di studio sono state preparate 2500 vials

Blood Preparations	EGF (ng/mL)	TGF- β 1 (ng/mL)	PDGF (ng/mL)	Fibronectin (ng/mL)	Vitamin A (nmol/mL)	Vitamin E (nmol/mL)
Serum	0.82 $\pm$ 0.46*	45.84 $\pm$ 3.24*	15.58 $\pm$ 5.98*	455.09 $\pm$ 65.64*†	3.52 $\pm$ 1.02*†	35.58 $\pm$ 8.18†
FFP	0.01 $\pm$ 0.01	6.26 $\pm$ 1.89	1.37 $\pm$ 1.27	128.06 $\pm$ 66.64	2.35 $\pm$ 0.39	29.22 $\pm$ 3.23
Platelet releasate	1.55 $\pm$ 0.3†	287.6 $\pm$ 132.36†	86.04 $\pm$ 22.6†	6.32 $\pm$ 1.83	0.06 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.18

Liu L et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:2438–2444

GF	CB-S	PB-S	P
IGF-1	13.6 (13.1-17.5)	*95.7 (93.0-106.8)	< 0.001
IGF-2	56.7 (56.5-69.4)	*302.0 (288.9-330.8)	< 0.001
EGF	*831.4 (833.2-1002.4)	316.3 (314.0-361.4)	< 0.001
TGF- α	*54.6 (57.0-71.0)	11.1 (11.2-14.8)	< 0.001
TGF- β 1	62346.7 (59882.7-64739.0)	*65780.3 (64678.9-69284.1)	0.007
TGF- β 2	1109.6 (1077.5-1120.5)	1059.1 (1043.1-1083.5)	0.014
TGF- β 3	638.7 (616.1-647.1)	636.8 (626.1-657.7)	0.378
FGF	*23.0 (20.8-30.6)	0.8 (0.8-1.1)	< 0.001
PDGF	*3233.2 (3461.7-4274.3)	1575.4 (1490.2-1808.0)	< 0.001
VEGF	*246.0 (288.8-475.5)	58.4 (64.5-95.5)	< 0.001
NGF	*0.8 (0.8-1.2)	0.03 (0.03-1.0)	< 0.001
IL-1B	*8.3 (59.1-207.3)	0.7 (1.5-3.3)	< 0.001
IL-4	*0.27 (0.32-0.52)	0.02 (0.19-0.58)	< 0.001
IL-6	*6.8 (-670.6-3411.7)	5.4 (19.6-45.8)	0.007
IL-10	*4.3 (4.4-5.3)	2.6 (1.8-15.8)	< 0.001
IL-13	*14.0 (54.1-94.2)	0.3 (0.9-2.5)	< 0.001



Buzzi M et al. Transfus Apher Sci. 2018; 57:549-555

Poichè I differenti fattori di crescita regolano differenti processi cellulari coinvolti nella riparazione corneale , alla luce dei nostri risultati , si può ipotizzare un utilizzo del siero collirio cordonale o del siero collirio adulto a seconda del target cellulare da trattare . La maggior quantità di EGF , TGF α e PDGF nel CB-S lo rende più adatto al trattamento dei difetti dell' epitelio corneale mentre il PB-S , considerati anche i livelli di IGF superiori, sarebbe più appropriato nella riparazione dei difetti stromali

Controlli di Qualità

- Qualificazione biologica
- Per il sierocollirio verifica della concentrazione di EGF(o altro GFs) nel pool
- Controlli microbiologici (batteri aerobi, anaerobi e miceti) su ogni preparazione

Validazione metodo per i controlli microbiologici

I **test microbiologici** per la ricerca di batteri aerobi ed anaerobi e miceti sono eseguiti ad ogni preparazione sul **prodotto finale** inoculando una quantità definita di emocomponente.

Questi test di sterilità sono stati validati per quantitativi definiti di prodotto finale secondo i requisiti della *Farmacopea europea, parte generale «Test biologici»*, capitolo 2.6.27 «Controllo microbiologico dei prodotti cellulari».

i FN PLUS
i FA PLUS



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE DIREZIONE REGIONALE Asse di Direzione - Intervento e Assistenza Policlinico S. Orsola-Malpighi Unità Operativa di Microbiologia		REPORT DI REGISTRAZIONE DEI RISULTATI DI VALIDAZIONE DEL TEST DI STERILITÀ E FERTILITÀ DEI FLACONI		R02P512 Bati Rev. 0 Pagina 1 di 1 Data di applicazione: 03/07/2014		
FLACONE: iFA plus		Lotto: 3045461		Scadenza: 2016-09-01		
RICHIEDENTE: 18 Aprile 2016		Lotto: 8.077		Scadenza: 2017-01-18		
Operatore: Michela Popolucci						
Tipo di test	Inoculo con: Nota 1	ID flacone	ID laboratorio	Crescita attesa	Crescita rilevata	Tempo di rilevazione
Sterilità	-	AIGQ360	3502523981	Nessuna	Nessuna	
Fertilità	SA 30 cfu	AIGQ38V	3502525481	S.aureus	S.aureus	16h; 08'
Fertilità	SA 10 cfu	AIGQ37Y	3502525281	S.aureus	S.aureus	17h; 20'
Fertilità	SA 10 cfu	AIGQ386	3502525381	S.aureus	S.aureus	17h; 20'
Fertilità	BS 30 cfu	AIGQ35H	3502524581	B.subtilis	B.subtilis	14h; 08'
Fertilità	BS 10 cfu	AIGQ34B	3502524381	B.subtilis	B.subtilis	14h; 16'
Fertilità	BS 10 cfu	AIGQ37T	3502524481	B.subtilis	B.subtilis	14h; 16'
Fertilità	PA 30 cfu	AIGQ38G	3502525181	P.aeruginosa	P.aeruginosa	18h; 16'
Fertilità	PA 10 cfu	AIGQ36X	3502524981	P.aeruginosa	P.aeruginosa	19h; 20'
Fertilità	PA 10 cfu	AIGQ36X	3502525081	P.aeruginosa	P.aeruginosa	18h; 48'
Fertilità	CA 30 cfu	AIGQ360	3502524881	C.albicans	C.albicans	66h; 48'
Fertilità	CA 10 cfu	AIGQ37P	3502524681	C.albicans	C.albicans	127h; 20'
Fertilità	CA 10 cfu	AIGQ39H	3502524781	C.albicans	C.albicans	170h; 32'
Fertilità	AB 30 cfu	AIGQ375	3502524281	A.brasiliensis	A.brasiliensis	42h; 48'
Fertilità	AB 10 cfu	AIGQ365	3502524081	A.brasiliensis	A.brasiliensis	47h; 28'
Fertilità	AB 10 cfu	AIGQ35M	3502524181	A.brasiliensis	A.brasiliensis	47h; 04'

Nota 1: SA: Staphylococcus aureus NCTC 10788
BS: Bacillus subtilis NCTC 10400
PA: Pseudomonas aeruginosa NCTC 12924
CA: Candida albicans NCPF 3179
AB: Aspergillus brasiliensis NCPF 2275

Validato il: 18/05/2016

Firma: _____

FASI DEL PROCESSO:

MODALITA' OPERATIVA:

1. Identificazione dei prodotti e del relativo volume da sottoporre a test di sterilità



Materiale	Volume sottoposto a test in ogni flacone
Aferesi cellule staminali ematopoietiche periferiche criopreservate (HPC + DMSO)	0.5 ml
Aferesi cellule staminali ematopoietiche periferiche (HPC o PBSC)	1 ml
Cellule selezionate	1 ml
Concentrato piastrinico (PRP)	0.5 ml
Globuli rossi	2 ml
Midollo <u>criopreservato</u> in DMSO	1 ml
Midollo	1 ml
Piastrine	2 ml
Plasma	2 ml
Sangue cordonale + DMSO	0.3 ml
Sangue cordonale lavato con soluzione fisiologica + albumina + destrano	1 ml
Siero da sangue cordonale per preparazioni oftalmiche (<u>sierocollirio</u>)	1 ml
Liquido congelamento tessuti	2 ml

2. Selezione dei flaconi

→ BacT/ALERT *iFA plus* e *iFN plus* che contengono polimeri assorbenti con proprietà di neutralizzare molecole ad attività antimicrobica

3. Verifica sterilità dei flaconi

→ Incubazione dei flaconi BacT/ALERT *iFA plus* e *iFN plus* nello strumento BacT/ALERT per 7 gg.

Risultato atteso: ASSENZA di CRESCITA MICROBICA

4. Verifica fertilità dei flaconi

→ Inoculo di ceppi batterici e fungini¹ a titolo noto (30 CFU) nei flaconi.

Risultato atteso: CRESCITA MICROBICA entro 7 gg

5. Test di specificità

→ L'identificazione dei microrganismi cresciuti deve essere consistente con quella dei ceppi noti inoculati; assenza di falsi positivi

6. Verifica del limite di rilevazione (sensibilità analitica)

→ Inoculo di ceppi batterici e fungini¹ a titolo noto (10 CFU) nei flaconi.

Risultato atteso: CRESCITA MICROBICA entro 7 gg

7. Verifica del limite di rilevazione in presenza del prodotto.

→ Inoculo di ceppi batterici e fungini¹ a titolo noto (10 e 30 CFU) nei flaconi in presenza del materiali da testare.

Risultato atteso: CRESCITA MICROBICA entro 7 gg

TEST EFFETTUATO	RISULTATI OTTENUTI NELLA FASE di VALIDAZIONE		RISULTATI VALIDAZIONE NUOVI LOTTI di FLACONI	
Verifica sterilità flaconi aerobi <i>iFA plus</i>	Nessuna crescita		Nessuna crescita (n=7)	
Verifica sterilità flaconi anaerobi <i>iFN plus</i>	Nessuna crescita		Nessuna crescita (n=5)	
Verifica fertilità flaconi <i>iFA plus</i>	Crescita rilevata Tempo medio di positivizzazione per: - batteri aerobi (<i>B.subtilis</i>, <i>S.aureus</i>, <i>P.aeruginosa</i>): - miceti (<i>C.albicans</i>, <i>A.brasiliensis</i>)	17h 50' 84h 38'	Crescita rilevata; Tempo medio di positivizzazione per: - batteri aerobi (<i>B.subtilis</i>, <i>S.aureus</i>, <i>P.aeruginosa</i>): - miceti (<i>C.albicans</i>, <i>A.brasiliensis</i>):	16h 48' 79h 19'
Verifica fertilità flaconi <i>iFN plus</i>	Crescita rilevata Tempo medio di positivizzazione per batteri anaerobi (<i>C.sporogenes</i>):	21h 24'	Crescita rilevata Tempo medio di positivizzazione per batteri anaerobi (<i>C.sporogenes</i>):	21h 33'
Test di specificità	100% concordanza tra identificazioni ottenute e quella attesa (n=18)		100% concordanza tra identificazioni ottenute e quella attesa (n=120)	
Limite di rilevazione (sensibilità analitica)	10 CFU		10 CFU	
Limite di rilevazione in presenza del prodotto	10 CFU		----	

Il sistema BacT/ALERT opera conformemente alle specifiche tecnico-funzionali. L'esecuzione dei test di sterilità, fertilità, specificità e limite di rilevazione ha evidenziato che i lotti di flaconi utilizzati sono sterili e la composizione del terreno è idonea alla crescita dei microrganismi testati, anche con carica microbica molto bassa (10 CFU). Il sistema non genera risultati falsi positivi e falsi negativi e i prodotti sottoposti a convalida non interferiscono con la crescita microbica.

Il sistema così convalidato dà maggiori garanzie di **sensibilità e sicurezza**.

Platelet-rich plasma lyophilization enables growth factor preservation and functionality when compared with fresh platelet-rich plasma

Leticia Queiroz da Silva , Silmara Aparecida de Lima Montalvão,

Amauri da Silva Justo-Junior, José Luiz Rosenberis Cunha Júnior, Stephany Cares Huber,

Carolina Caliári Oliveira & Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Am J Sports Med. 2017 Mar;45(4):954-960. doi: 10.1177/0363546516674475. Epub 2016 Dec 13.

Platelet-Rich Plasma Powder: A New Preparation Method for the Standardization of Growth Factor Concentrations.

Kieb M^{1,2}, Sander F¹, Prinz C³, Adam S⁴, Mau-Möller A¹, Bader R¹, Peters K⁴, Tischer T¹.

Conservazione emocomponenti ad uso non trasfusionale :

- Congelamento -80°C
- Liofilizzazione

campione	EGF	TGF-a	IGF-2	IGF1		PDGFbb		bNGF	TGFb1	TGfb2	TGFb3
1 LIO	204	102,2	336	129,3		3802		4,94	54883	936,6	660,9
1CONG	227	111,7	332	129,1		3486		3,78	54653	1002,3	759,5
2 LIO	135	27,8	373	138,7		1852		2,04	37208	823,1	626,7
2CONG	130	24,1	331	122,2		2237		2,31	46179	943,2	609,6
3 LIO	263	51,6	293	107,8		3526		7,28	39970	876,8	626,7
3CONG	295	53,3	332	127,2		2959		7,68	45488	986,4	679,7

Considerazioni:

- Necessità di definire uno standard di prodotto per ogni EuNT attraverso la collaborazione tra Trasfusionisti
- Necessità di trial clinici multicentrici che utilizzino EuNT standardizzati
- Il futuro: una terapia mirata con EuNT preparati in modo da ottenere una concentrazione ottimale di quelle biomolecole necessarie alla rigenerazione dello specifico tessuto



Costi?





POLICLINICO DI SANT'ORSOLA

Dipartimento Testa, collo e organi di senso
Unità Operativa Oftalmologia

U.O. Oftalmologia, Università
degli Studi di Bologna
Piera Versura

