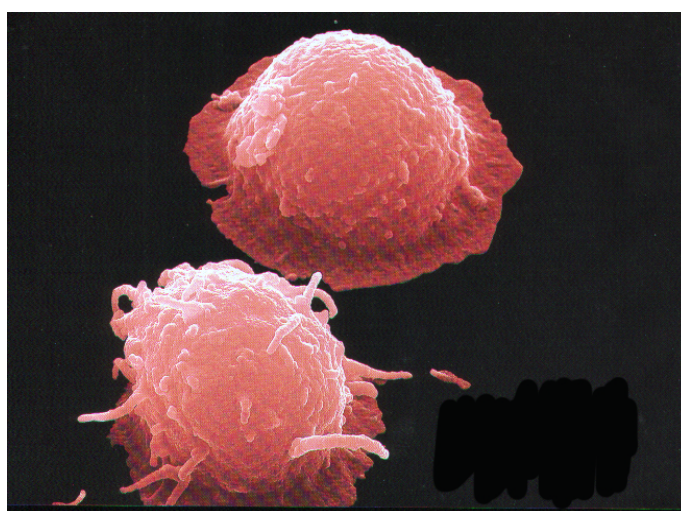


# “Processazione e crioconservazione delle cellule staminali da cordone ombelicale: esperienza del Servizio di Immunoematologia e Trasfusione di Mantova”

PP. Pagliaro, C. Glingani, S. Saia, B. Presciuttini



Scopo di questa Tesi universitaria (di cui offriamo qui una sintesi) è quello di presentare i dati relativi ai criteri di validazione, alle modalità di lavorazione e alla conservazione delle unità di sangue da cordone ombelicale raccolte presso i reparti di Ostetricia degli ospedali di Mantova, Asola e Pieve di Coriano, che sono i centri di raccolta afferenti alla Banca di sangue da cordone ombelicale del Servizio immuno-trasfusionale di Mantova. Questo servizio è attuato grazie all'Associazione Onlus BAMCO.

Le **cellule staminali** ottenute dal sangue del **cordone ombelicale** sono cellule di grande interesse scientifico perché contengono una quota significativa di progenitori emopoietici immaturi, quota solitamente più elevata rispetto a quella del midollo osseo, con una capacità clonogenica superiore. Questo è forse dovuto alla presenza di sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche dotate di notevole capacità di ricostituzione ematologica a lungo termine dopo il trapianto. Cellula staminale è un termine utilizzato per definire una cellula “generica”,

indifferenziata, in grado di autoriprodursi e dare origine ai numerosi tipi di cellule differenziate che eseguono specifiche funzioni dell'organismo (11,42).

A seconda della loro potenzialità, le cellule staminali si distinguono in totipotenti, pluripotenti (o multipotenti), unipotenti. (11,38) A seconda delle fonti di raccolta, invece, si distinguono in:

- **embrionali autologhe**: derivano da una cellula-uovo, non fecondata, privata del suo nucleo che viene sostituito con quello di una cellula somatica adulta, ottenendo così cellule dotate dello stesso patrimonio genetico della cellula madre che possono essere trapiantate senza rischio di rigetto;
- **fetali**: possono essere ricavate da aborti naturali; sono pluripotenti e possiedono caratteristiche intermedie fra quelle embrionali e quelle adulte;
- **da sangue placentare**: vengono prelevate dalla placenta e dal cordone ombelicale dopo il parto e sono pluripotenti;
- **da adulto**: presenti nel midollo osseo e nel sangue periferico; sono pluripotenti e provvedono al mantenimento dei tessuti e alla loro riparazione dopo un danno (11,38).

Le cellule staminali emopoietiche del midollo osseo e del sangue periferico sono funzionalmente definite da due caratteristiche peculiari: capacità di automantenimento e capacità di ricostituzione linfo-emopoietica a lungo termine in un ricevente irradiato (27,31). Le cellule staminali danno origine a cellule progenitrici che, per definizione, non sono riconoscibili morfologicamente, ma solo funzionalmente in base alla loro capacità di formare aggregati clonali in sistemi di coltura in vitro (30). I progenitori ontogenicamente più precoci, definiti multipotenti (data la loro capacità di differenziazione multilineare), progressivamente perdono la capacità di automantenimento e si orientano lungo le varie filiere differenziative emopoietiche; generano cloni costituiti da cellule progenitrici unipotenti che, a loro volta, generano precursori morfologicamente riconoscibili, destinati a dare origine a cellule mature terminali dotate di funzioni specializzate, ma completamente prive di potenziale proliferativo (27,30,31). La costante produzione di cellule emopoietiche mature richiede sia l'automantenimento delle cellule staminali che la produzione di cellule progenitrici ed è legata ad un processo dinamico complesso che riflette risposte funzionali integrate a fattori cellulari e umorali, intra- ed extracellulari, di tipo stimolante, facilitante o inibente (27). La ricostituzione della mielo-linfopoiesi dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche ottenute da midollo osseo costituisce la dimostrazione più evidente dell'attività funzionale delle cellule staminali le quali, in condizioni basali, garantiscono la produzione di circa 200 g/die di cellule mieloidi (1,2).

Studi di immunostochimica hanno dimostrato che l'antigene CD34 è espresso, indipendentemente dalla linea differenziativa, solo da cellule ontogeneticamente immature, mentre non è espresso da cellule mature (13): sono cellule CD34+ tutti i progenitori mieloidi e linfoidi.

## **IMPIEGO TERAPEUTICO DELLE CELLULE STAMINALI**

L'impiego delle cellule staminali emopoietiche a scopo di trapianto, autologo o allogenico, è ormai ben consolidato.

Le cellule staminali emopoietiche sono presenti nel midollo osseo, nel sangue periferico e nel sangue di cordone ombelicale (4,5). Le cellule staminali emopoietiche midollari si ottengono attraverso il prelievo di sangue midollare; quelle da sangue periferico possono essere ottenute mediante una procedura aferetica, dopo chemioterapia e mobilizzazione con fattore di crescita emopoietico (39); le cellule staminali presenti nel sangue di cordone ombelicale si ottengono invece al momento del parto (33).

Nel **trapianto autologo** di cellule staminali emopoietiche, il donatore è al tempo stesso ricevente: le cellule staminali emopoietiche rendono possibile la ripresa dell'emopoiesi dopo somministrazione di dosi mieloablativi di chemioterapia e radioterapia, configurandosi dunque come una potente e raffinata terapia di supporto utile per molte neoplasie ematologiche (in particolare Linfoma di Hodgkin, Linfomi non Hodgkin, Mieloma) (5,20,22) e non ematologiche (tra cui carcinoma della mammella, microcitoma polmonare, teratocarcinoma nell'adulto; neoplasie ossee primitive e neoplasie del sistema nervoso centrale nel bambino) (8,14,22,47). Il trapianto autologo trova indicazione anche in alcune forme di malattie autoimmuni (come Lupus eritematoso sistemico, Artrite reumatoide, Sclerosi multipla), in pazienti non responsivi ai trattamenti con dosi convenzionali di farmaci immunosoppressori, con risultati favorevoli (32).

Il **trapianto allogenico** di cellule staminali emopoietiche trova indicazione in numerose malattie ematologiche neoplastiche (in particolare Leucemie acute, Leucemia mieloide cronica, Mieloma) e non neoplastiche (Talassemia, Anemia aplastica, Drepanocitosi, Malattie congenite del metabolismo) (15,36). Il donatore è ricercato, sulla base della compatibilità per il sistema HLA, tra i fratelli o tra potenziali donatori iscritti ai registri nazionali ed internazionali (15,36). La valutazione della compatibilità per HLA prevede lo studio di 10 loci HLA, con un grado di accettabilità di 9 loci su 10 per definire compatibile un potenziale donatore e questo richiede di effettuare la ricerca su un gran numero di donatori (15,44). Il tempo medio, quindi, che intercorre

tra l'avvio della ricerca da registro e il momento del trapianto è di alcuni mesi, tempo che per alcuni pazienti è superiore alla concreta aspettativa di vita (18).

Le possibilità terapeutiche offerte dalle **cellule staminali cordonali** sono del tutto sovrapponibili a quelle sopra elencate (18). Il primo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche di cordone ombelicale è stato effettuato nel 1988 in un paziente di circa 8 anni affetto da una malattia ematologia congenita, Anemia di Fanconi, il cui donatore era il fratellino neonato HLA-compatibile (fu una donazione "dedicata") (16).

Uno dei vantaggi offerti dall'utilizzo delle cellule staminali emopoietiche cordonali è dato dal fatto che il grado di compatibilità richiesto è inferiore rispetto a quanto necessario per il trapianto di cellule staminali emopoietiche midollari o periferiche: vengono identificati 6 antigeni del sistema HLA (contro i 10 necessari per la compatibilità delle cellule midollari) e la differenza di 1 o 2 antigeni rispetto al ricevente non incide significativamente sull'esito del trapianto stesso. Ciò consente di aumentare significativamente il numero di soggetti che possono essere avviati al trapianto (17,23,28,37,44).

Questo tuttavia può rappresentare anche un limite: il maggior grado di tolleranza immunologica tra donatore e ricevente riduce il conflitto immunologico esercitato dalle cellule immunocompetenti nei confronti del ricevente e in particolare nei confronti delle cellule neoplastiche del ricevente (fenomeno definito "graft versus leukemia", GVL, cioè aggressione verso la malattia) (9). Ne può conseguire una maggior frequenza di ritardato attecchimento o di ripresa di malattia a seguito di trapianto di cellule staminali emopoietiche da cordone ombelicale, rispetto al trapianto delle cellule staminali emopoietiche midollari (9,18).

I vantaggi rappresentati dalla disponibilità di unità di cellule staminali emopoietiche cordonali sono rappresentati dalla semplicità e dall'innocuità del prelievo, dalla disponibilità di un gran numero di unità di sangue cordonale conservato nelle banche, dall'immediata disponibilità delle stesse al momento della richiesta da parte del Centro Trapianti e dalla maggior probabilità di individuare una unità compatibile con il ricevente, dovendo ricercare un numero inferiore di antigeni del sistema di istocompatibilità (18,35,44).

## **APPLICAZIONI POTENZIALI**

Le cellule staminali rappresentano un'importante prospettiva per la rigenerazione di organi danneggiati. Un approccio terapeutico risolutivo mira alla ricostruzione del tessuto alterato mediante il trapianto di nuove cellule che possono sostituire quelle distrutte o alterate dalla



malattia (12,18,19,28,49). La possibilità di espandere in vitro queste cellule potrebbe consentire di disporre di un maggior numero di cellule da utilizzare in fase di trapianto (28).

Numerose applicazioni terapeutiche sono in fase sperimentale come, ad esempio, la ricostruzione del midollo spinale danneggiato da traumi fisici (34), la cura di malattie neurodegenerative (34), la cura di malattie muscolo-scheletriche come Distrofia muscolare di Duchenne (34), la ricostituzione del tessuto cardiaco dopo un infarto del miocardio e la riparazione dei vasi sanguigni da processi patologici progressivi come l'arteriosclerosi e l'ipertensione arteriosa (50).

## MODALITA' ESECUTIVE

Le modalità esecutive per la raccolta di sangue cordonale possono essere suddivise in quattro fasi (33):

- 1) fase informativa e arruolamento della gestante (di competenza del personale ostetrico e delle volontarie della BAMCO);
- 2) fase di raccolta (di competenza del personale ostetrico della sala parto e della sala operatoria);
- 3) fase di accettazione dell'unità (di competenza del personale tecnico biomedico);
- 4) fase di lavorazione e stoccaggio (di competenza del personale tecnico dedicato).

Tutto il processo è stato sottoposto a certificazione della qualità, requisito indispensabile per l'istituzione di una banca di sangue da cordone ombelicale.

### Fase informativa e arruolamento della gestante:

La trasmissione delle informazioni relative al prelievo di sangue cordonale può partire dal ginecologo e/o dall'ostetrica. **L'arruolamento definitivo, invece, avviene in occasione di periodiche riunioni con il personale della BAMCO: qui vengono fornite le informazioni dettagliate relative all'intero processo e consegnati i moduli** del consenso informato, il questionario anamnestico ed il modulo per l'iscrizione all'associazione onlus BAMCO; tutti gli standard nazionali ed internazionali sono concordi nel definire che ciò non deve essere effettuato dopo che il travaglio è già iniziato (33,43). Questa modalità organizzativa consente al personale ostetrico di non essere gravato di un carico di lavoro addizionale nel corso dell'assistenza al parto e nello stesso tempo lo salvaguarda dal rischio di ottenere un consenso informato frettoloso e non sufficientemente meditato da parte della gestante.

Durante gli incontri di arruolamento vengono, inoltre, sottolineati i criteri di esclusione alla raccolta del sangue: la positività sierologica per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, TPHA (37,47,48),

l'epoca di gestazione <34<sup>a</sup> settimana (33,43,44), la rottura delle membrane >12 ore (33,43,44), la comparsa di febbre >38°C nelle 24 ore prima del parto (33,43,44), la presenza di liquido amniotico tinto di meconio (33,43,44), la presenza di stress fetale (33,43,44). Vengono anche illustrati alla madre donatrice i criteri sulla base dei quali l'unità raccolta non può essere conservata: la quantità insufficiente di sangue placentare raccolto (33), la documentazione di emocoltura positiva al controllo di sterilità microbiologico aerobio e anaerobio (33), la documentazione di febbre nella madre nelle 24 ore successive al parto e di segni di infezione nel neonato nelle 24 ore successive alla nascita (33,43,44).

#### Fase di raccolta:

Il prelievo è eseguito dall'ostetrica che assiste al parto, sia in caso di parto per via naturale che in caso di parto cesareo con analoghe modalità (33,42). Il prelievo può essere eseguito con la placenta ancora in utero o a secondamento avvenuto e risulta ottimale quando viene eseguito immediatamente dopo il clampaggio del cordone ombelicale (24,40). La raccolta deve essere effettuata in modo sterile con il rispetto di tutte le manovre asettiche. Il clampaggio e la resezione del cordone ombelicale devono essere effettuati il più vicino possibile al punto di inserzione sul neonato. Una volta individuata la vena ombelicale, si procede con accurata disinfezione del tratto di funicolo e si effettua la venipuntura con l'ago sterile da prelievo connesso alla sacca di raccolta (24,33,40). Il sangue placentare viene lasciato defluire per caduta nella sacca mescolandola delicatamente per consentire una corretta miscelazione del sangue con l'anticoagulante. Quando il flusso spontaneo si arresta, si effettua una delicata spremitura del funicolo per recuperare il sangue cordonale residuo (33,40).

Solo il 50-60% delle unità raccolte ha un volume sufficiente. Questo può dipendere da vari fattori: un difficoltoso incannulamento della vena ombelicale, un funicolo povero di sangue o troppo corto o tortuoso, un clampaggio non precoce, un prelievo eseguito non immediatamente dopo il clampaggio (25,33).

#### Fase di accettazione dell'unità:

Il trasporto della sacca dalla sala parto alla Banca deve essere effettuato in un contenitore atto a prevenire la rottura della sacca. La sacca di sangue placentare deve essere etichettata con i dati anagrafici della madre e del neonato e i moduli devono essere perfettamente compilati e firmati. L'unità viene conservata in frigoemoteca a temperatura controllata (4°C) e la lavorazione deve essere effettuata entro 36-48 ore dal prelievo. (33,43,44)

#### Fase di lavorazione e stoccaggio:

La valutazione preliminare consiste nella determinazione del volume di sangue prelevato e nella ricerca di eventuali coaguli, frammenti di tessuto o precipitati: in questo caso la sacca viene

filtrata e nuovamente pesata. Se poi il volume risulta ancora adeguato, l'unità viene processata (33). Le unità con volume netto inferiore a 50 ml sono state eliminate, segnate sul modulo di registrazione delle non conformità e ne è stata data comunicazione alla madre.

Prima della centrifugazione si effettua il campionamento iniziale per la valutazione della cellularità. Tale dato risulta critico per le unità destinate a trapianto allogenico: le unità vengono considerate idonee se contengono un numero di cellule mononucleate  $> 800 \cdot 10^6$  (23), mentre per le unità destinate ad eventuale trapianto autologo il dato va solo acquisito e non costituisce motivo di eliminazione.

Dopo centrifugazione, il sangue viene sottoposto a riduzione di volume per rimozione dei globuli rossi (33) e poi avviato alla criopreservazione. Sono stati allestiti i flaconi per le prove di sterilità aerobia e anaerobia. Le sacche da congelamento sono state criopreservate mediante congelatore automatico a discesa controllata della temperatura, quindi conservate in appositi contenitori in vapori di azoto a  $-145-155$  °C (26), dotati di sensori e collegati a dispositivi di allarme. E' necessario un congelamento a temperatura programmata che metta in equilibrio la nucleazione e la concentrazione di soluti al fine di garantire la vitalità cellulare.

La prima causa di eliminazione dell'unità di sangue cordonale è determinata da:

- Volume scarso
- Presenza di coaguli
- Positività materna dei marker sierologici
- Errata identificazione dell'unità e/o modulistica non conforme
- Non integrità della sacca

La seconda causa di eliminazione è di tipo tecnico e può essere dovuta a:

- Errata saldatura dell'unità con conseguente perdita di materiale biologico
- Rottura della sacca in centrifuga

La contaminazione microbiologica rappresenta la terza causa di eliminazione delle unità raccolte.

Sono stati condotti dei **controlli di qualità** nella validazione delle unità di sangue placentare che hanno riguardato:

1. La conta delle cellule nucleate totali (emocromo)
2. La vitalità cellulare
3. Il numero delle cellule CD34+
4. Il controllo microbiologico
5. Lo screening infettivologico comprendente i test HBsAg, HCVAb, HIVAb, TPHA.

## **RISULTATI**

L'attività della Banca di sangue da cordone ombelicale afferente al Servizio di Immunoematologia e Trasfusione dell'Ospedale "Carlo Poma" di Mantova ha avuto inizio a partire dal Gennaio 2004.

Ad intervalli trimestrali, secondo un protocollo predefinito, una delle unità è stata destinata a controllo di qualità. I dati sotto riportati relativi ai controlli di qualità si riferiscono alle unità destinate a tale scopo tra il novembre 2004 e il giugno 2007. Successivamente sono riportati i risultati relativi alle unità raccolte e gestite dalla Banca di sangue da cordone ombelicale nel corso del 2006, considerato rappresentativo dell'attività dato l'elevato numero di unità raccolte e bancate.

### ***1) Controlli di qualità interni***

Il controllo di qualità è stato eseguito su unità di sangue non idonee al bancaggio (per volume scarso e appositamente congelate) oppure su unità rimaste in quarantena per oltre 18 mesi, delle quali non è disponibile il controllo a 6 mesi della madre donatrice e per questo considerate non più utilizzabili. I risultati dei controlli di qualità vengono riferiti agli standard interni di validazione, definiti da apposito protocollo.

Le unità destinate a controllo di qualità sono state tredici: due sono risultate "non conformi" per controllo di sterilità positivo eseguito dopo scongelamento. Entrambe le unità erano state raccolte dopo un parto per via fisiologica. Il tipo di batterio evidenziato suggerisce che, per entrambe le unità, la contaminazione non sia attribuibile alla manipolazione, ma più verosimilmente alla raccolta. Gli altri indicatori di Qualità hanno dato risultato "conforme": integrità della sacca; vitalità cellulare; conta delle cellule CD34+.

### ***2) Controllo di qualità microbiologico***

I controlli di sterilità vengono effettuati su tutte le unità raccolte che non vengono eliminate per volume insufficiente. I dati relativi alla contaminazione microbiologica delle unità di sangue placentare afferenti al nostro servizio riguardano tutte le unità bancate da Gennaio 2004 al 30 Giugno 2007, pari a 1234 unità, e mostrano 38 campioni positivi, pari al 3% delle unità totali. Nel 60,5% dei casi le unità sono state eliminate per contaminazione di microorganismi aerobi, mentre nel 39,5% sono state eliminate per contaminazione da anaerobi. Delle unità eliminate per

controllo microbiologico solo 4 erano state raccolte in madri che presentavano positività al tampone vagino-rettale per Streptococco  $\beta$ -emolitico, ma in nessuna delle 4 unità il microorganismo isolato apparteneva allo stesso ceppo presente nel tampone materno.

### 3) Unità raccolte nel 2006

Nel corso del 2006 sono state raccolte complessivamente 896 unità, sia dopo parto fisiologico che dopo parto cesareo, come illustrato nella **Tabella I** che riporta le unità conservate e le unità eliminate.

**TABELLA I: Unità raccolte nel 2006 suddivise per tipologia di parto.**

	Unità raccolte	Parto fisiologico	Parto cesareo
Totale unità raccolte	<b>896</b>	583 ( 65%)	313 (35%)
Totale unità conservate	<b>516 (57.6%)</b>	307 (52.6%)	209 (66.8%)
Totale eliminate	380 (42.4%)	276 (47.3%)	104 (33.2%)

Le madri donatrici erano nel 98% dei casi di nazionalità italiana, provenienti per lo più dalla Lombardia o da regioni limitrofe. L'età media era di 33 anni. Nell'1,3% dei casi si è trattato di parto gemellare (12 parti su 884 parti). La raccolta è stata effettuata ad un'epoca di gestazione compresa tra la 34° e la 41° settimana, con una media gestazionale di 37 settimane. In tutte le gestanti è stato effettuato il tampone vagino-rettale, come indicato nella **Tabella II**.

**TABELLA II: Valutazione delle percentuali delle unità eliminate per emocoltura positiva in presenza o assenza di tampone vagino-rettale positivo.**

	Unità conservate (anno 2006)	Controllo sterilità positivo	% unità eliminate
Mamme con tampone positivo	<b>94</b>	<b>4</b>	<b>4,3%</b>
Mamme con tampone negativo	<b>422</b>	<b>17</b>	<b>4,0%</b>

Delle 380 unità eliminate sono state valutate le cause di eliminazione, in particolare il volume, il controllo microbiologico ed eventuali cause tecniche. La principale causa di eliminazione di un campione raccolto è la scarsità di volume (347 campioni sul totale degli 896 raccolti, pari a 38.7%); in 21 casi su 896 (2.3%), invece, è risultata positiva l'emocoltura; in 11 casi su 896 (1.2%) si è rotta la sacca in centrifuga. I risultati sono elencati nella **Tabella III**.

**TABELLA III: Unità eliminate nell'anno 2006.**

		<b>Parto Fisiologico</b>	<b>Parto Cesareo</b>
Totale unità eliminate	380	276	104
Unità eliminate per volume scarso	347 / 380 91.3%	254/347 73.2 %	93/347 26.8%
Unità eliminate per emocoltura positiva	21 / 380 5.5%	17/380 4,5%	4/380 1 %
Unità eliminate per HBsAg positività	1 / 380 0.2%	0%	1/380 0.2%
Unità eliminate per rottura in centrifuga	11 / 380 2.9%	5/380 1.3%	6/380 1.6%

Sono stati valutati i dati relativi alla conta leucocitaria, effettuata con contaglobuli automatico, e alla determinazione delle cellule CD34+, eseguita in citofluorimetria, nelle unità bancate nell'anno 2006 per valutare una possibile correlazione tra volume, cellularità e conta CD34/ul. Nonostante un apparente incremento del numero di cellule CD34+ parallelamente con l'aumento del volume delle unità, è risultato molto alto il valore di deviazione standard che denota un'ampia variabilità. Queste stesse considerazioni sono valide se si analizzano i dati relativi al numero assoluto di cellule CD34+ contenute nelle unità raccolte.

## **DISCUSSIONE e CONCLUSIONI**

Le unità di sangue da cordone ombelicale raccolte nel 2006 sono state 896 e di queste il 58% è stato considerato idoneo alla conservazione, mentre il 42% è stato eliminato per cause tecniche e/o sanitarie. Questi dati sono in linea con quanto pubblicato in letteratura, secondo cui la percentuale di unità non idonee alla conservazione, rispetto a quelle prelevate, varia dal 38,9% al 56% (25,41).

Il protocollo attualmente in uso presso la Banca di Sangue da Cordone ombelicale di Mantova prevede che l'unità raccolta venga ritenuta inizialmente idonea se il volume è superiore o uguale a 50 ml: per volumi inferiori l'unità viene scartata per volume insufficiente. Nella casistica qui presentata emerge che il volume medio delle unità raccolte dopo taglio cesareo è più elevato rispetto a quello delle unità raccolte dopo parto per via vaginale: 70.7 ml rispetto a 65 ml, come peraltro osservato in altre casistiche (42). Secondo la nostra esperienza la differenza di volume ha una giustificazione di carattere puramente organizzativo: le raccolte effettuate durante il taglio cesareo beneficiano di un'unità operativa in più, la strumentista presente in sala operatoria, così si può prestare maggiore attenzione nell'effettuare il clampaggio precoce e, laddove necessario, la mungitura del funicolo.

Il volume dell'unità raccolta sembra correlare con la conta leucocitaria, ma non con la quantità di cellule CD34+ totali se non per volumi molto elevati. Esiste, infatti, un'ampia variabilità sia in termini di conta leucocitaria totale sia in termini di cellule CD34+: la media del numero di CD34+ totali tende ad incrementare con l'aumento del volume, ma parallelamente aumenta anche il valore della deviazione standard.

Valutando le unità non conservate (380/896 unità, pari al 42,4%), oltre il 91% è eliminato per volume insufficiente (pari al 38,9% delle unità totali raccolte). Questo dato viene sottolineato durante gli incontri con le gestanti al fine di evidenziare che la quantità di sangue raccolto, nonostante l'esperienza del personale abilitato alla raccolta, potrebbe non raggiungere il volume minimo per il bancaggio (50 ml) a causa delle caratteristiche del funicolo.

La contaminazione batterica è imputabile a: non corretta disinfezione del funicolo durante la raccolta; scorrette manipolazioni durante il procedimento di criopreservazione; contaminazione durante la fase di stoccaggio; contaminazione durante la fase di scongelamento. Al fine di diminuire le eliminazioni per emocoltura positiva, sono stati inseriti controlli ed azioni correttive adeguate.

L'analisi della procedura di centrifugazione ci ha permesso di spiegare che la rottura è indipendente dal volume dell'unità, ma è dovuta ad un non corretto posizionamento della sacca nel cestello. Il ripetersi di questo evento, che ha inciso inizialmente per il 3% delle cause di eliminazione, ha prodotto un'azione correttiva da parte del Responsabile Assicurazione della Qualità che, modificando opportunamente la procedura, ha permesso di diminuire la frequenza al di sotto dell'1%.

Come ultima analisi abbiamo cercato di dimostrare che la positività al tampone vagino-rettale non è correlata al controllo microbiologico positivo dell'unità. Infatti, su 422 unità raccolte da madri donatrici con il tampone negativo, 17 unità sono state eliminate per contaminazione batterica (4%), mentre su 94 madri donatrici con tampone positivo per Streptococco  $\beta$ -emolitico solo in 4 unità il controllo microbiologico si è rivelato positivo (4%), ma in nessun caso per Streptococco  $\beta$ -emolitico. Questo conferma che il tampone positivo non è una controindicazione alla raccolta.

L'analisi dei dati presentati consente di trarre le seguenti conclusioni:

delle unità raccolte, il 42% viene eliminato: per volume insufficiente il 38,7% del totale delle unità raccolte (91% delle unità eliminate); in piccola quota, pari al 2,3% del totale delle unità raccolte (5,5% delle unità eliminate), per contaminazione batterica. Non emerge tuttavia alcuna correlazione tra la contaminazione batterica dell'unità ed il tampone vaginale positivo della madre.

Trattandosi di unità destinate ad uso autologo, la conta delle cellule mononucleate e delle cellule CD34+ non rappresenta un criterio di eliminazione dell'unità.

Il continuo riesame del processo e la rilevazione di non conformità consente di evidenziare le criticità e di individuare le eventuali opportune azioni correttive. Viene, infine, sempre sottolineato durante gli incontri con le gestanti che l'unità raccolta potrebbe non essere idonea alla conservazione.



# ICONOGRAFIA

Figura 1. Accettazione dell'unità

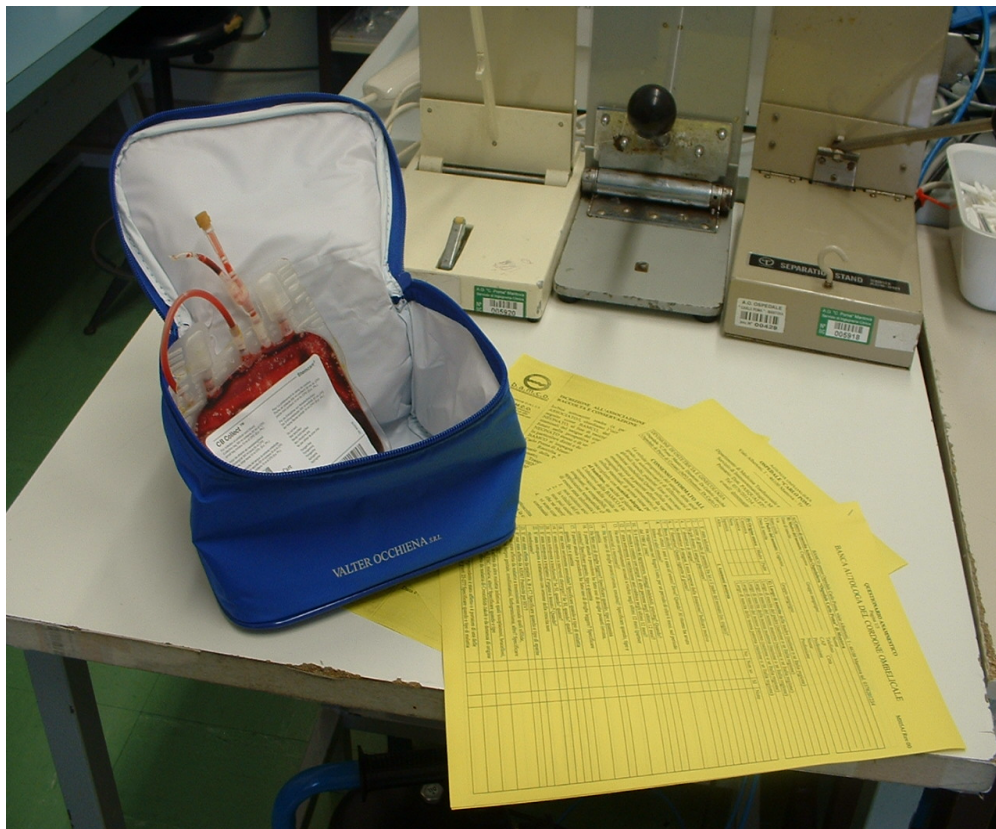


Figura 2. Scomposizione dell'unità



Figura 3. Sacche per Crioconservazione



Figura 4. Congelatore a discesa programmata





Figura 5. Stoccaggio dell'unità

