

Έκθεση Ελέγχου Βιωσιμότητας

Σύμφωνα με την υπ' αριθμ. Α17/2015 εισαγγελική παραγγελία, στις 10 Ιουλίου, ημέρα Τρίτη, του έτους 2018 και ώρα 10:30 πρωινή, παρουσία των: κου Μπελογιάννη Κωνσταντίνου (Μεσεγγυούχος), της κας Κουρούπη Γεωργίας (Τεχνικός σύμβουλος) των κυριών Παπαγεωργάκη Θάνου, (Δικηγόρος, Υπεύθυνος Νομικής Υπηρεσίας Ομίλου ΥΓΕΙΑ) και Ζερβέα Πέτρου (Δικηγόρος, Νομική Υπηρεσία Ομίλου ΥΓΕΙΑ), καθώς και του κου Σιάνα Φιλίππου (πρώην εργαζόμενος της εταιρείας "Stem Health"), προσήλθαμε οι: Μιχαλόπουλος Ευστάθιος (Διοριζόμενος Πραγματογνώμονας) και Παναγούλη Ευφροσύνη (Διοριζόμενη Πραγματογνώμονας), με σκοπό να επιλέξουμε καθ' υπόδειξη του κου Σιάνα δείγματα, προς έλεγχο βιωσιμότητας.

Συγκεκριμένα, εκ των έντεκα (11) δεξαμενών όπου φυλάσσονται δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος, **ΜΟΝΟ από τις τέσσερις (4) δεξαμενές, ο κος Σιάνας κατόρθωσε να ανακτήσει δεκαογτώ (18) δείγματα (που δεν προορίζονται για κλινική χρήση, παρά μόνο για έλεγχο ποιότητας) προς έλεγχο βιωσιμότητας, καθώς στις υπόλοιπες 7 δεξαμενές δεν υπήρχαν παρόμοια δείγματα για έλεγχο.**

Μετά την ανάκτηση των δειγμάτων, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κουτί, το οποίο αποθηκεύθηκε σε μια εκ των δεξαμενών στις εγκαταστάσεις της εταιρείας «Stem Health», μέχρι την τελική τους επεξεργασία από το εργαστήριο της Ελληνικής Τράπεζας Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος (ΕΛΤΟΠΑ) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

Στις 12 Σεπτεμβρίου και ώρα 09:30 πρωινή, παρουσία του κου Ζερβέα Πέτρου και της κας Κουρούπη Γεωργίας, παραλάβαμε από τις εγκαταστάσεις της εταιρείας «Stem Health», τα δείγματα και τα τοποθετήσαμε σε δοχείο με ξηρό πάγο για την ασφαλή μεταφορά τους στις εγκαταστάσεις του ΠΒΕΑΑ. Οι κωδικοί των δειγμάτων, η ημερομηνία επεξεργασίας από τη «Stem Health», η θέση τους στη δεξαμενή, καθώς και ο αριθμός της δεξαμενής από όπου προήλθαν τα δείγματα, καταγράφονται στο Παράρτημα Ι.

Ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κυτταρομετρητή ροής Cytomics FC-500 και η ανάλυση των μετρήσεων έγινε με το λογισμικό CXP Analysis Software. Προαναλυτικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας της ευθυγράμμισης της δέσμης LASER του κυτταρομετρητή ροής. Ο έλεγχος αυτός αφορά στα οπτικά και υδραυλικά συστήματα του οργάνου και επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος ειδικών μικροσφαιρών (Flow-Check Fluorospheres, Beckman Coulter).

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός αντιδραστήριων Stem-Kit (Beckman Coulter). Πρόκειται για συνδυασμό μονοκλωνικών αντισωμάτων, συζευγμένων με φθοριοχρώματα, και άλλων αντιδραστηρίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής μονοκλωνικά αντισώματα και χρωστικές για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των λευκών αιμοσφαιρίων:

- CD45-FITC (Fluorescein isothiocyanate)
- CD34-PE (Phycoerythrin)
- 7-AAD (Aminoactinomycin D)
- Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (IO Test 3)
- Σφαιρίδια μέτρησης απόλυτου αριθμού κυττάρων (Flow Count Beads)

Η επιλογή των φθοριοχρωμάτων FITC, PE και της χρωστικής 7AAD έγινε λόγω του ότι η χρωματική επικάλυψη των φασμάτων εκπομπής τους είναι μηδαμινή. Για την ανάλυση της βιωσιμότητας των λευκών αιμοσφαιρίων επιλέχθηκε το συνιστώμενο πρωτόκολλο της εταιρείας Beckman-Coulter, που χρησιμοποιείται στο εργαστηριό μας. Σύμφωνα με αυτό, ο θετικός πληθυσμός CD45+ που παρουσιάζει αρνητικό σήμα ως προς την χρωστική 7-AAD μπορεί να θεωρηθεί ως πληθυσμός ζωντανών λευκών αιμοσφαιρίων. Αντιστοίχως, ο διπλά θετικός πληθυσμός CD45+ και CD34+ που παρουσιάζει αρνητικό σήμα ως προς την χρωστική 7-AAD μπορεί να θεωρηθεί ως πληθυσμός ζωντανών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η στρατηγική επιλογής των κατάλληλων κυτταρικών πληθυσμών (gating)

δημιουργήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της βιωσιμότητας είναι καταγεγραμμένα στο Παράρτημα Ι.

Σύμφωνα με τους όρους και προϋποθέσεις της 6^{ης} έκδοσης του εγχειριδίου ποιότητας, του Παγκόσμιου Οργανισμού για τη Διαπίστευση των Κυτταρικών Θεραπειών (FACT-Netcord), στα δείγματα που προορίζονται για κλινική χρήση η βιωσιμότητα των λευκών αιμοσφαιρίων (Viability of CD-45) πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση του 40% μετά την απόψυξή τους (Παράρτημα ΙΙ). Στο πρότυπο του FACT-Netcord, υπάρχει μια **βασικότερη εξαίρεση στο άρθρο E2.3** (Παράρτημα ΙΙΙ), κατά την οποία, όταν τα **δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος δεν πληρουν απόλυτα τις προϋποθέσεις του οργανισμού FACT-Netcord,** και εφόσον το εργαστήριο έχει ενημερώσει για τη μη-καταλληλότητα του δείγματος, **ο Ιατρος-Αιματολόγος μεταμοσχευτής αναλαμβάνει πλήρως την ευθύνη για την χορήγησή τους,** αναλόγως την αναγκαιότητα του περιστατικού. Συγκεκριμένα, κατά τη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε αιματολογικά νοσήματα, απαιτούνται βάσει προτύπου 2.5×10^7 λευκά αιμοσφαίρια ανά χιλιογράμμο σωματικού βάρους του ασθενούς. Συνεπώς, ακόμα και εάν ένα δείγμα έχει χαμηλό ποσοστό βιωσιμότητας, αλλά ο αριθμός των κυττάρων του είναι αρκετά υψηλός ώστε να μπορέσει να καλύψει τις αναγκές του ασθενούς, τότε μπορεί να χορηγηθεί από τον Ιατρό-Αιματολόγο.

Βάσει των δεδομένων του προτύπου που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα οποία είναι τα διεθνώς παραδεδεδγμένα και τα οποία ακολουθεί και η ΕΛΤΟΠΙΑ του ΠΒΕΑΑ, **το μεγαλύτερο ποσοστό των μετρήσεων βιωσιμότητας στα δείγματα που προήλθαν από την εταιρεία «Stem Health» πληρούν τις προϋποθέσεις και είναι κατάλληλα για το σκοπό που προορίζονται, ως προς τη συγκεκριμένη παράμετρο, και όπως προσδιορίζονται στο Παράρτημα Ι.** Στη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάστηκαν όμως και δείγματα με ποσοστό βιωσιμότητας χαμηλότερο των δεδομένων του προτύπου. Στα δείγματα αυτά δε γνωρίζουμε την αρχική βιωσιμότητα των κυττάρων κατά το στάδιο της επεξεργασίας τους και πριν την κατάψυξή τους ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τη βιωσιμότητα μετά την απόψυξή τους. Συνεπώς, δε γνωρίζουμε αν εξ'αρχής τα δείγματα αυτά είχαν χαμηλό ποσοστό βιωσιμότητας ή όχι. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως κατά την απόψυξη των δειγμάτων καταγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία περίπου 10-15% μείωση της αρχικής βιωσιμότητας. Άρα στα εν λόγω δείγματα, τα οποία φέρουν ποσοστό βιωσιμότητας

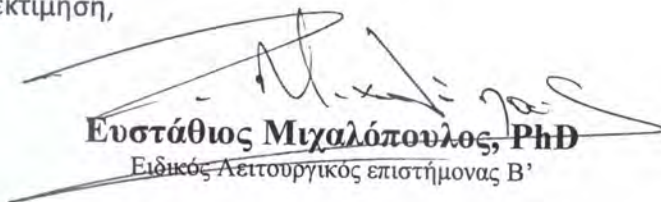
περίπου 30%, ενδεχομένως η αρχική βιωσιμότητα, πριν την απόψυξή τους να ήταν περίπου στο 40 με 45%. Επιπροσθέτως, τονίζεται ότι ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε δείγματα, τα οποία ανακτήθηκαν από συγκεκριμένες δεξαμενές και όχι από όλες, μιας και δεν υπήρχαν παρόμοια δείγματα σε άλλες δεξαμενές. Για αυτον τον λόγο δεν μπορεί να δοθεί σαφής εικόνα για τη βιωσιμότητα των υπόλοιπων δειγμάτων, είτε αυτά προέρχονται από τις δεξαμενές που ελεγχθησαν είτε από αυτές που δεν ελέγχθησαν, καθότι στην ίδια δεξαμενή εντοπίστηκαν ταυτόχρονα δείγματα με χαμηλή (30%), αλλά και υψηλή βιωσιμότητα (64%). Δεν εντοπίστηκαν όμως μη βιώσιμα δείγματα.

Συμπερασματικά, αναφέρουμε πως το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων που ελέγχθησαν πληρούν τις προϋποθέσεις βιωσιμότητας όπως αυτές αναφέρονται στο πρότυπο FACT-Netcord.



Ευφροσύνη Παναγούλη, MSc
Βιολόγος

Με εκτίμηση,



Ευστάθιος Μιχαλόπουλος, PhD
Ειδικός Λειτουργικός επιστήμονας Β'

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

SAMPLE A/A	TANK	LEVEL	Date of Birth	Date of Processing	Stem Health ID	ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑ% FLOW CYT. of diluted 1:1 sample	CD45+ absolute concentration Cells/ μ L-FLOW CYT. of diluted 1:1 sample	CD34+ absolute concentration Cells/ μ L- FLOW CYT. of diluted 1:1 sample
1	ST01	UPPER	N/A	N/A	2585	42,77	9958	19
2	ST01	UPPER	N/A	N/A	2585	43,87	12370	19
3	ST01	UPPER	N/A	N/A	2585	50,94	5242	10
4	ST05	UPPER	20/10/2010	21/10/2010	RB00031	48,11	13386	59
5	ST05	UPPER	20/10/2010	21/10/2010	RB00032 (CPLD)	31,24	8082	4
6	ST05	UPPER	20/10/2010	21/10/2010	RB00032	30,8	9931	6
7	ST05	LOWER	6/10/2010	7/10/2010	RB00027	54,89	6016	9
8	ST05	LOWER	6/10/2010	7/10/2010	RB00028	58,97	6353	25
9	ST05	LOWER	15/10/2010	15/10/2010	RB00030	64,09	7072	19
10	ST06	UPPER	N/A	N/A	NP2546	54,64	5732	11
11	ST06	UPPER	N/A	N/A	NP2546	55,32	6198	15
12	ST06	UPPER	N/A	N/A	NP2546	53,7	5891	13
13	ST11	UPPER	N/A	N/A	NP2254	59	8649	13
14	ST11	UPPER	N/A	N/A	NP2254	56,95	6700	9
15	ST11	UPPER	N/A	N/A	NP2254	53,07	6501	9
16	ST11	LOWER	2013	2013	NP2233	39,22	10486	23
17	ST11	LOWER	2013	2013	NP2233	42,79	8296	20
18	ST11	LOWER	2013	2013	NP2233	47,37	10822	27

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

APPENDIX V

SPECIFICATION REQUIREMENTS FOR CORD BLOOD UNITS STORED FOR CLINICAL ADMINISTRATION

Test	Unrelated Specification		Related Specification	
	Fresh Post-Processing Sample	Post-Thaw Attached Segment or Representative Sample Prior to Release	Fresh Post-Processing Sample	Post-Thaw Attached Segment or Representative Sample Prior to Release
Total nucleated cell count	$\geq 5.0 \times 10^6$		Enumerated	
Total nucleated cell recovery	Should be $\geq 60\%$		Should be $\geq 60\%$	
Total viability	$\geq 85\%$		$\geq 70\%$	
Viable CD34 count	$\geq 1.25 \times 10^6$			
Viability of CD34 cells	$\geq 85\%$	$\geq 70\%$	$\geq 85\%$	$\geq 70\%$
Viability of CD45 cells		$\geq 40\%$		$\geq 40\%$
CFU (or other validated potency assay) ¹		Growth (or positive result for potency)		Growth (or positive result for potency)
Microbial Screen	Negative for aerobes, anaerobes, fungus		Negative for aerobic and anaerobic bacteria and fungi - OR - identify and provide results of antibiotic sensitivities	
Donor screening and testing	Acceptable as defined by Applicable Law and NetCord-FACT Standards		Acceptable as defined by Applicable Law and NetCord-FACT Standards	
Identity		Verified		Verified

¹There should be evidence of potency by CFU or other validated potency assay on a fresh post-processing sample.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

STANDARD:

E2.3

The nature of ineligible or nonconforming CB units shall be disclosed to the registry and/or the requesting party.

Explanation:

Prior to listing a CB unit for search, CBB must review the unit record for nonconformances. For unrelated CB units, nonconformities must be provided to the registry to facilitate efficient search and selection processes for interested Clinical Programs. There are also situations when information about a unit is requested from an entity or individual other than a registry, such as physicians considering related administration or seeking a unit with a rare HLA type. Nonconformances must also be provided to those parties.

Example(s):

Examples of nonconforming CB units include:

- Units without an attached segment,
- Units with an incomplete maternal health questionnaire,
- Units with incomplete infectious disease testing,
- Units with positive infectious disease markers.