

M. Corneli¹, F. Sprega¹, C. Gatto², L. Giurgola², Jana D'Amato Tóthová², P. Torresan¹

¹ Banca degli Occhi della Regione Marche, ² AL.CHI.MI.A s.r.l.

Nuovi dispositivi medici certificati CE per la processazione della membrana amniotica

P. Torresan

Responsabile Banca degli Occhi della Regione Marche



 **SIBO**
Società Italiana Banche degli Occhi

Genova, 21 aprile 2012

Introduzione

- L'applicazione della membrana amniotica non rappresenta una terapia salvavita, ma di certo un'importante soluzione terapeutica che permette di migliorare la qualità della vita.
- La membrana amniotica deve essere processata sterilmente, cercando di mantenere inalterate le sue proprietà e di non impiegare agenti che possano risultare tossici sul tessuto e sui riceventi.

Introduzione

- Circa il **35% della membrana amniotica** processata presso la nostra Struttura dal 2007 ha mostrato di essere **contaminata in maniera persistente** al termine della sua lavorazione.



Decontaminare,
o non decontaminare,
questo è il problema!

Introduzione

- La **decontaminazione** può alterare le **caratteristiche peculiari** della **membrana amniotica vitale**?



Analisi della bibliografia

- **Alto tasso di contaminazione** della membrana amniotica.
- **Composizione ed attività eterogenee** dei cocktail di antibiotici ed antifungini impiegati nella decontaminazione da parte delle varie Banche dei Tessuti.
- **Condizioni di tempo e temperatura** di decontaminazione e di lavaggio **poco definite**.

Scopo

1

Eliminare i **contaminanti** dal tessuto

2

Mantenere la **vitalità** del tessuto

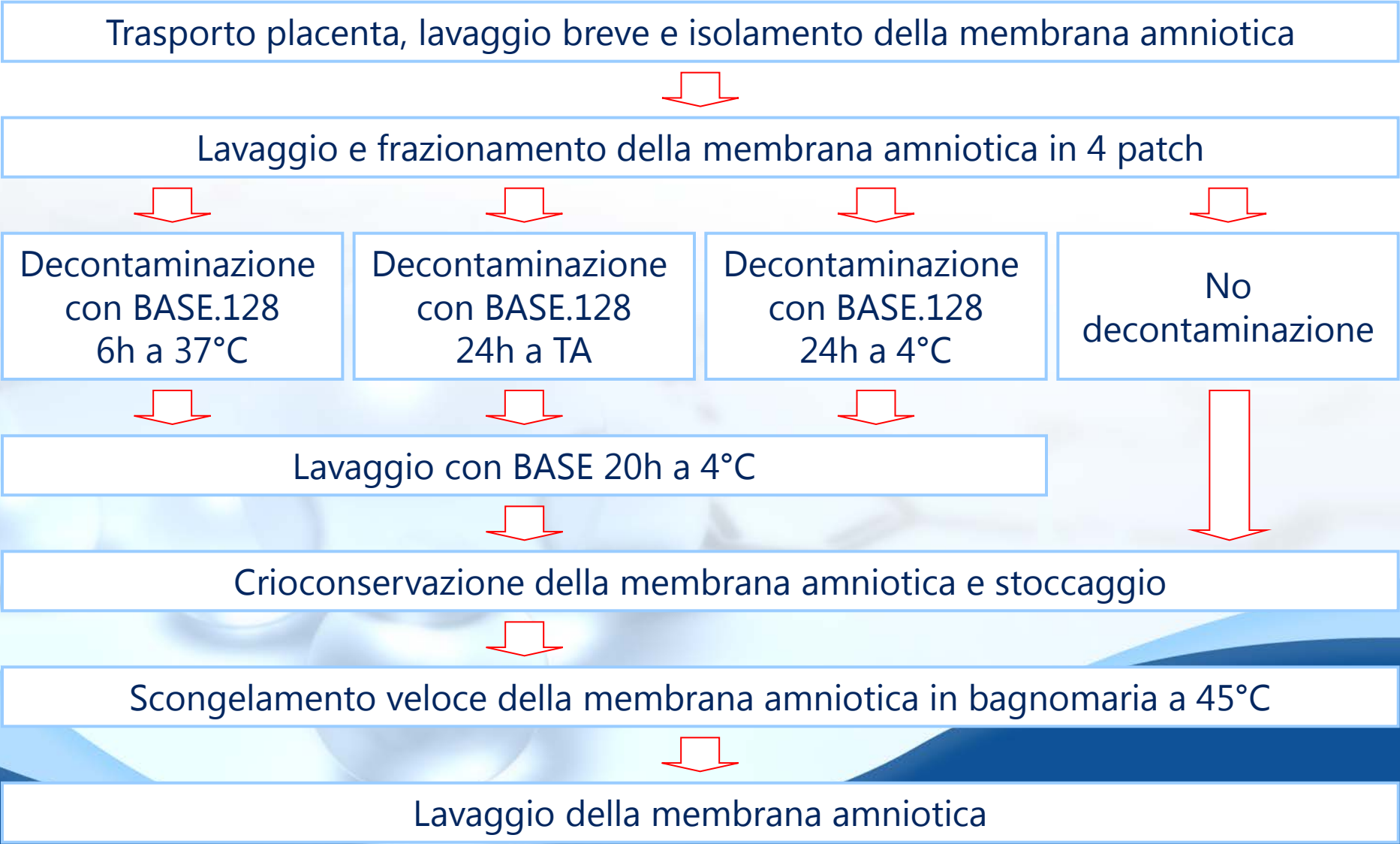
3

Mantenere la **morfologia** del tessuto

4

Eliminare **antimicrobici** e **DMSO** dal tessuto

Diagramma operativo sintetico



Trasporto placenta, lavaggio breve e isolamento della membrana amniotica

Lavaggio e frazionamento della membrana amniotica in 4 patch

Decontaminazione
con BASE.128
6h a 37°C

Decontaminazione
con BASE.128
24h a TA

Decontaminazione
con BASE.128
24h a 4°C

No
decontaminazione

Lavaggio con BASE 20h a 4°C

Crioconservazione della membrana amniotica e stoccaggio

Scongelamento veloce della membrana amniotica in bagnomaria a 45°C

Lavaggio della membrana amniotica

Soluzioni impiegate

ALCHIMIA
BASE
LAVAGGIO



ALCHIMIA
BASE.128
DECONTAMINAZIONE

VS
SOLUZIONE FISIOLÓGICA
E
RPMI 1640

Decontaminazione

- Gli **effetti della decontaminazione** della membrana amniotica sono stati verificati in **tre condizioni di tempo e temperatura** di incubazione in **BASE.128**:

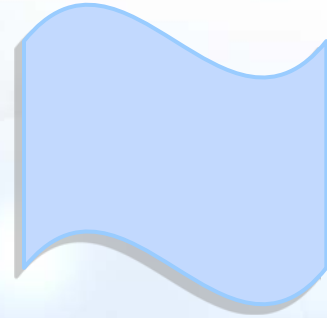
1	6h	a	37°C
2	24h	a	TA
3	24h	a	4°C

Segue una fase
di lavaggio/incubazione
per **20h** a **4°C** in **BASE**

Materiali



3
PLACENTE



3
MEMBRANE
AMNIOTICHE



6h a 37°C



24h a TA



24h a 4°C



Non Decontaminato

3x4
PATCH

Metodo pre-cryo

■ Protocollo interno

PLACENTA

1. Lavaggio breve con fisiologica
2. Isolamento membrana amniotica

MEMBRANA AMNIOTICA

1. Lavaggio con fisiologica
2. Frazionamento
3. Criocongelamento
4. Stoccaggio

■ Protocollo modificato

PLACENTA

1. Lavaggio breve con fisiologica
2. Isolamento membrana amniotica

MEMBRANA AMNIOTICA

1. Lavaggio con BASE
2. Frazionamento
3. Decontaminazione con BASE.128
4. Lavaggio/incubazione con BASE
5. Criocongelamento
6. Stoccaggio

Metodo post-cryo

■ Protocollo interno

MEMBRANA AMNIOTICA

1. Lavaggio con fisiologica corrente
2. Incubazione in fisiologica a TA
3. Lavaggio con fisiologica corrente
4. Incubazione in RPMI 1640 a TA

■ Protocollo modificato

MEMBRANA AMNIOTICA

1. Lavaggio con fisiologica corrente
2. Incubazione in fisiologica a TA
3. Lavaggio con fisiologica corrente
4. Incubazione in BASE a TA

Valutazione del tessuto

- La **qualità** della membrana amniotica è stata accuratamente **valutata ad ogni passaggio del processo di lavorazione** (pre- e post-cryo) tramite:

1

Prove microbiologiche
(**BACTEC**, **HB&L** e **TSB** a 37°C per 7 giorni)¹

2

Prove istologiche
(**Ematossilina-Eosina**)¹

3

Prove di vitalità cellulare
(**MTT**)¹

¹ Test svolti presso i laboratori della Banca degli Occhi della Regione Marche

Valutazione del tessuto

- Al termine della fase post-cryo, la **membrana amniotica** e la **soluzione crioconservante** sono state valutate per:

Presenza di contaminanti microbici
(**TG** a 33°C e **TSB** a 23°C per 14 giorni)²

4

Presenza di residui di antimicrobici
(**Test di diffusione su Agar/HPLC**)²

Presenza di residui di DMSO
(**HPLC**)²

² Test svolti presso i laboratori della Ditta AL.CHI.MI.A s.r.l.

Risultati prove microbiologiche

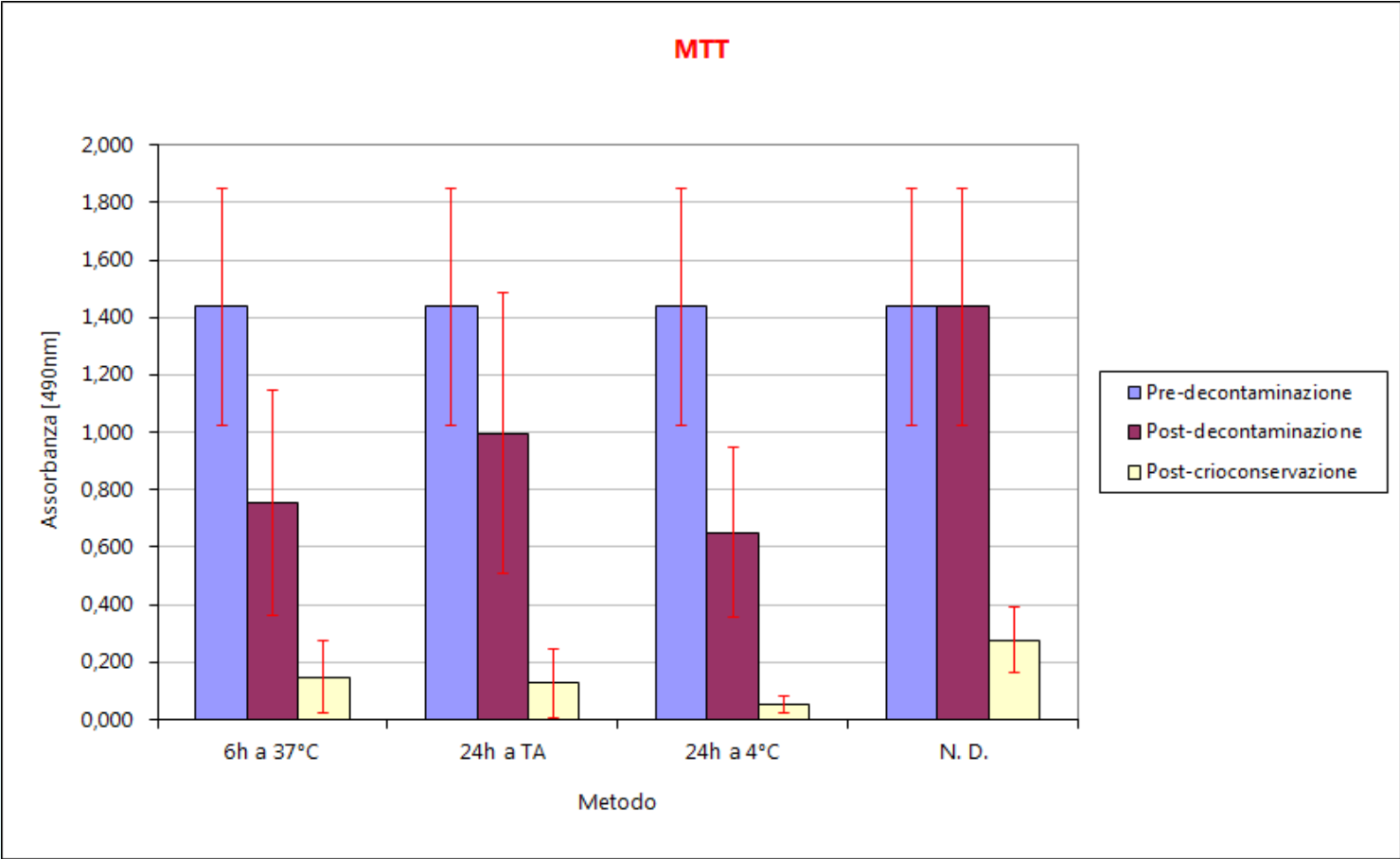
1

PLACENTA	TEST PLACENTA	TRATTAMENTO	TEST PRE-CRYO MEMBRANA AMNIOTICA	TEST POST-CRYO MEMBRANA AMNIOTICA
1	<i>S. lugdunensis</i> <i>S. haemoliticus</i>	6h-37°C	Campioni negativi	Campioni negativi
		24h-TA	Campioni negativi	Campioni negativi
		24h-4°C	Campioni negativi	Campioni negativi
		N. D.	Campioni negativi	Campioni negativi
2	<i>K. pneumoniae</i>	6h-37°C	Campioni negativi	Campioni negativi
		24h-TA	Campioni negativi	Campioni negativi
		24h-4°C	Campioni negativi	Campioni negativi
		N. D.	Campioni negativi	Campioni negativi
3	<i>S. simulans</i> <i>S. hominis</i>	6h-37°C	Campioni negativi	Campioni negativi
		24h-TA	Campioni negativi	Campioni negativi
		24h-4°C	Campioni negativi	Campioni negativi
		N. D.	Campioni negativi	Campioni negativi

Risultati prove istologiche

PLACENTA	TRATTAMENTO	TEST PRE-CRYO MEMBRANA AMNIOTICA	TEST POST-CRYO MEMBRANA AMNIOTICA
1	6h-37°C	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	24h-TA	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	24h-4°C	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	N. D.	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
2	6h-37°C	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	24h-TA	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	24h-4°C	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	N. D.	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
3	6h-37°C	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	24h-TA	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	24h-4°C	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni
	N. D.	Tessuto indenne da lesioni	Tessuto indenne da lesioni

Risultati prove di vitalità cellulare



Risultati prove di vitalità cellulare

3

CONFRONTO	PRE-CRYO	POST-CRYO
N. D. vs 6h-37°C	$ Z_T _{0,05} = 1,53 < 1,96$ Differenza statisticamente non significativa	$ Z_T _{0,05} = 1,09 < 1,96$ Differenza statisticamente non significativa
N. D. vs 24h-TA	$ Z_T _{0,05} = 0,66 < 1,96$ Differenza statisticamente non significativa	$ Z_T _{0,05} = 1,09 < 1,96$ Differenza statisticamente non significativa
N. D. vs 24h-4°C	$ Z_T _{0,05} = 1,97 > 1,96$ Differenza statisticamente significativa	$ Z_T _{0,05} = 1,97 > 1,96$ Differenza statisticamente significativa

Significatività statistica determinata secondo il
Test di Wilcoxon/Mann-Whitney (n=3)

Risultati prove di vitalità cellulare

3

TRATTAMENTO	DURATA TOTALE DECONTAMINAZIONE	VITALITÀ % PRE-CRYO vs N. D.	VITALITÀ % POST-CRYO vs N. D.
6h-37°C	26h (6h dec. + 20h lav.)	53	10
24h-TA	44h (24h dec. + 20h lav.)	69	9
24h-4°C	44h (24h dec. + 20h lav.)	45	4
N. D.	0h	100	19

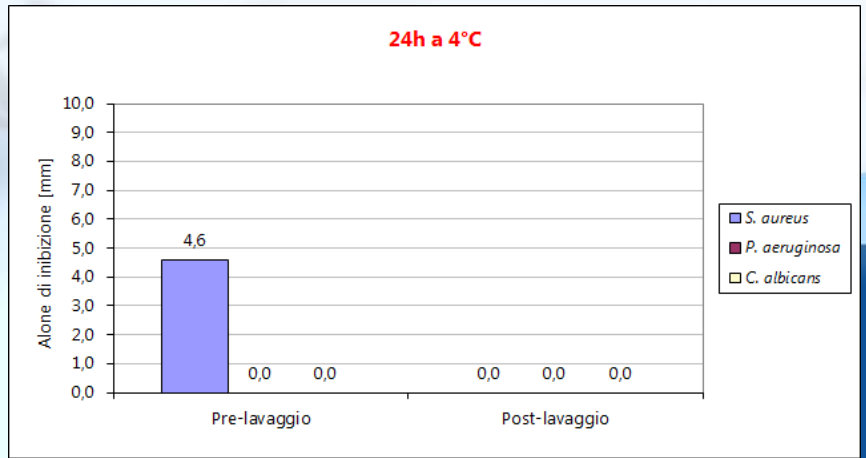
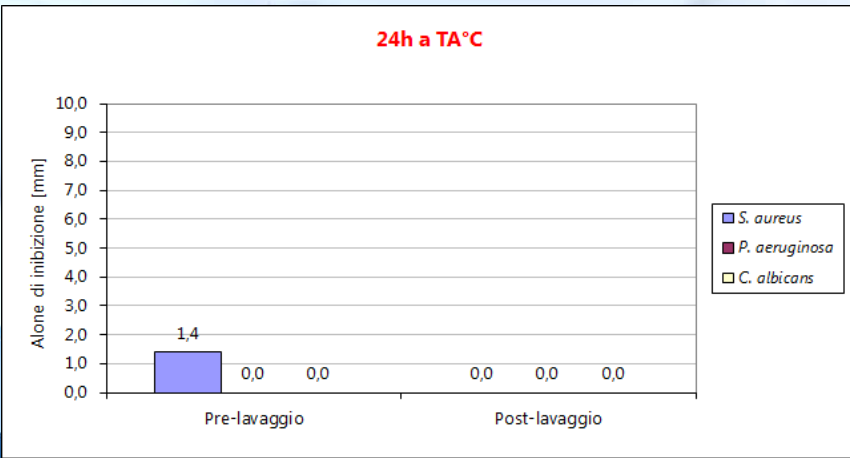
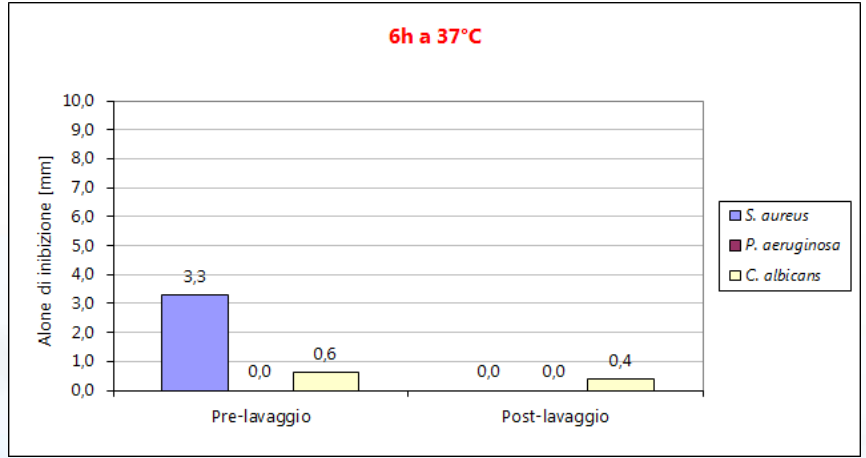
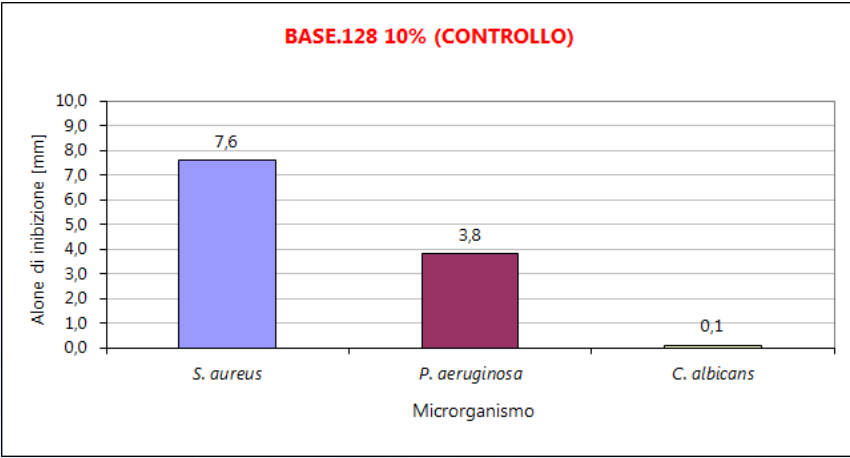
Risultati prove microbiologiche

ALCHIMIA

4

PLACENTA	TRATTAMENTO	TEST POST-CRYO SOLUZIONE CRIOCONSERVANTE	TEST POST-CRYO MEMBRANA AMNIOTICA
1	6h-37°C	Campioni negativi	Campioni negativi
	24h-TA	Campioni negativi	Campioni negativi
	24h-4°C	Campioni negativi	Campioni negativi
	N. D.	Campioni negativi	Campioni negativi
2	6h-37°C	Campioni negativi	Campioni negativi
	24h-TA	Campioni negativi	Campioni negativi
	24h-4°C	Campioni negativi	Campioni negativi
	N. D.	Campioni negativi	Campioni negativi
3	6h-37°C	Campioni negativi	Campioni negativi
	24h-TA	Campioni negativi	Campioni negativi
	24h-4°C	Campioni negativi	Campioni negativi
	N. D.	Campioni negativi	Campioni negativi

Risultati test di diffusione su Agar¹



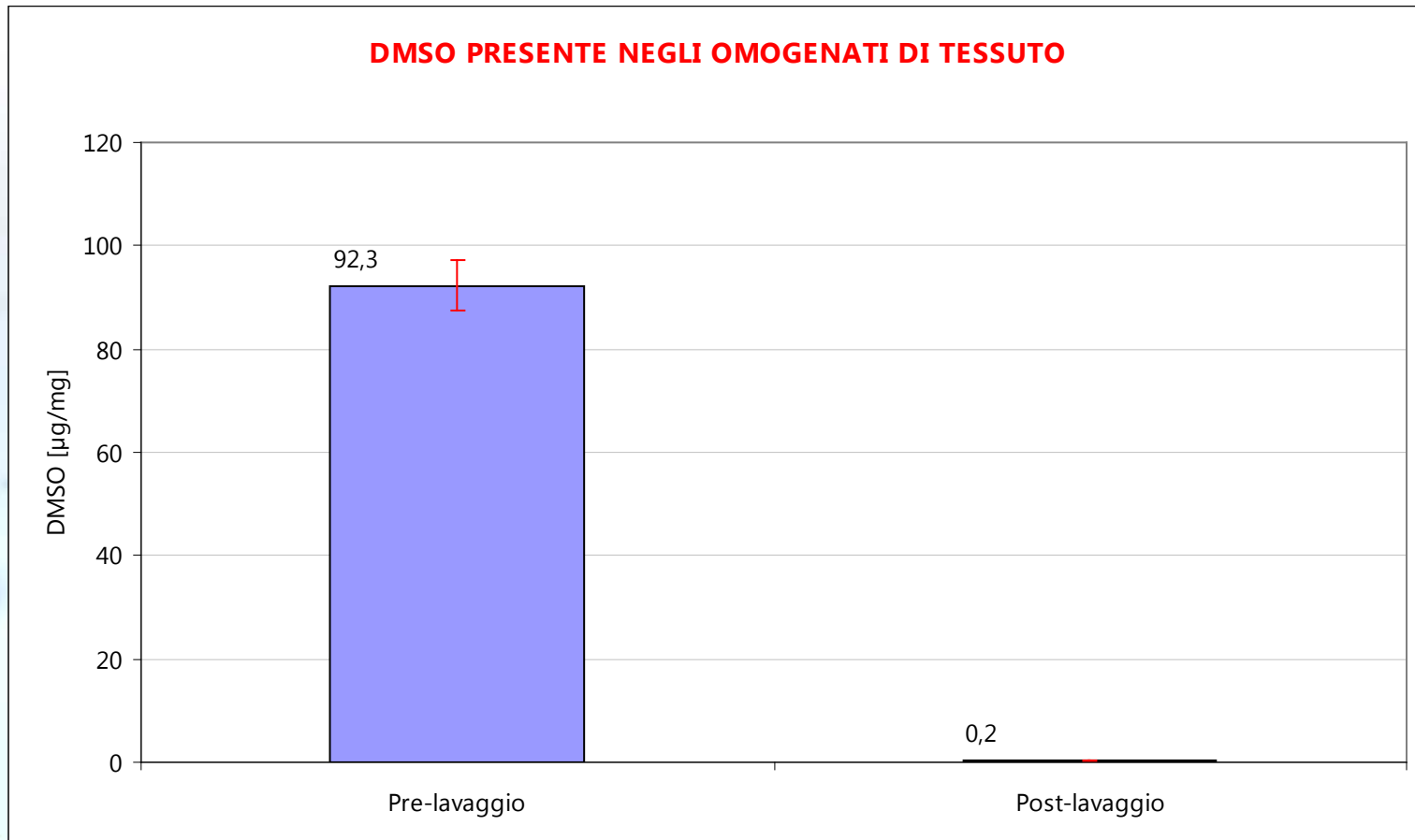
¹ Eseguito su omogenati di tessuto

Risultati prove HPLC

ALCHIMIA

4

CAMPIONE	ANFOTERICINA B [µg/ml]	CEFOTAXIME [µg/ml]	GENTAMICINA [µg/ml]	VANCOMICINA [µg/ml]
OMOGENATO MEMBRANA AMNIOTICA	0	0	0	0
SOLUZIONE CRIOCONSERVANTE	0	0	0	0
LIQUIDO LAVAGGIO	0	0	0	0



Conclusioni – prove microbiologiche

- Le **placente** donate sono risultate **tutte contaminate**.
- I **contaminanti sono stati rimossi** dalla membrana amniotica già durante le fasi di lavaggio iniziali, benché **il lavaggio semplice** non sempre elimina i contaminanti ma ne **riduce solo le UFC/ml**.

Conclusioni – prove istologiche

- La **membrana amniotica non ha subito modificazioni** indotte dal contatto con le soluzioni decontaminanti.

Conclusioni – prove di vitalità

- **Ulteriori esperimenti sono necessari** per confermare i dati ottenuti nel presente studio.

Conclusioni – prove HPLC

- La **concentrazione degli antimicrobici** presenti negli omogenati di membrana amniotica dopo il processo di decontaminazione risulta **estremamente bassa** e viene **completamente azzerata** dopo la fase di lavaggio post-cryo, (il tessuto trattiene/adsorbe i decontaminanti in maniera estremamente limitata).
- Le **prove microbiologiche finali non vengono "falsate"** dalla presenza degli antimicrobici.

Conclusioni – prove HPLC

- Il **rischio** di manifestare uno **shock anafilattico** dovuto ad eventuali residui di antimicrobici è **sensibilmente diminuito**.
- Il lavaggio post-cryo ha permesso di **eliminare totalmente il DMSO** dalla membrana amniotica.

Grazie

Thank You *Mahalo*
Tack **Kiitos**
Grazie **Toda**
Obrigado **Thanks**
Takk **Gracias** **Merci**