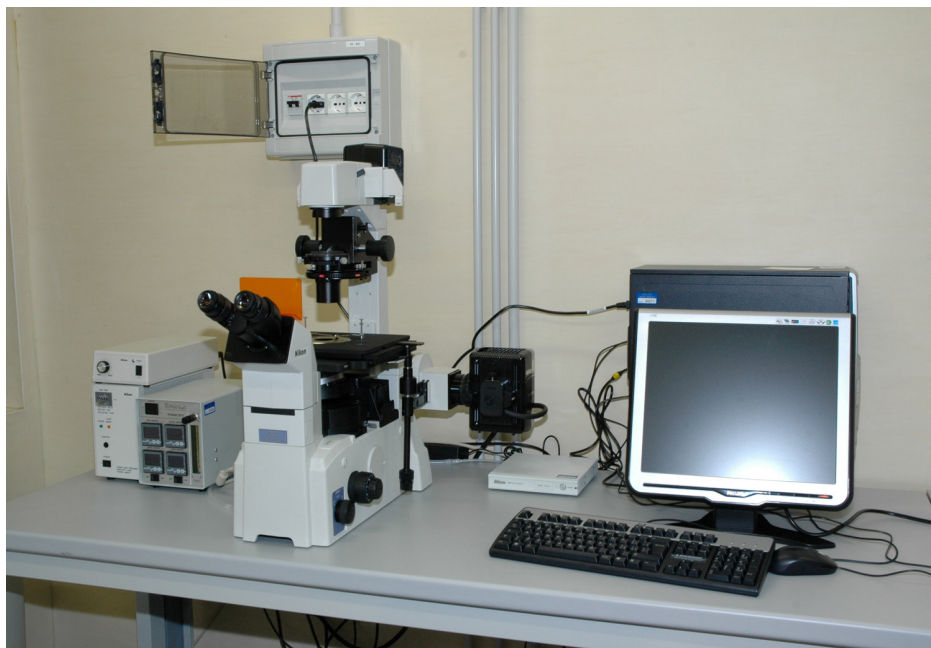


CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE DEI SUBSTRATI CELLULARI
(Dirigente Responsabile : Dr.ssa Maura Ferrari)

Relazione attività perseguita anno 2009



Microscopio con funzione Time-laps



1. Obiettivi Strategici

L'attività del Centro di Referenza dei Substrati Cellulari viene perseguita in accordo alle linee operative indicate dal Ministero della Salute al momento del suo riconoscimento (22 luglio 1991, protocollo n°600.2/24438/3525). Le stesse riguardano da un lato attività prettamente Istituzionali e, dall'altro, linee di ricerca aventi differenti finalità. Il Centro opera in conformità con gli standard ufficiali, seguendo i criteri e le metodologie previste dalla Farmacopea Europea e secondo il sistema qualità in conformità alle prescrizioni della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. In particolare, si prefigge l'obiettivo di disporre di materiale biologico con adeguate caratteristiche qualitative utilizzabili nei laboratori dell'Ente e richieste dalle Organizzazioni afferenti al Centro ed operanti sia nel settore pubblico che in quello privato.

Il Centro si suddivide in differenti aree di seguito indicate nell'ambito delle quali vengono perseguite corrispondenti linee operative:

- servizi generali e di sterilizzazione del materiale impiegato;
- preparazione di terreni colturali e di reagenti;
- allestimento ed amplificazione di colture cellulari di primo impianto, incluse cellule specializzate e cellule staminali mesenchimali;
- propagazione di linee cellulari stabilizzate di nuova acquisizione;
- amplificazione di cellule richieste dall'utenza o per uso interno e ripreparazione di stocks cellulari per il mantenimento/ripristino della collezione;
- controlli qualitativi, volti ad accertare contaminazioni da parte di agenti microbici e virali di differente natura, specie di origine e livelli di endotossine batteriche.

Di seguito viene sinteticamente riportata l'attività perseguita nei differenti settori.

2. Attività di servizio

2.1 Servizi generali e sterilizzazione del materiale impiegato

In tale ambito tutto il materiale sistematicamente utilizzato nei differenti laboratori viene regolarmente sottoposto a cicli di lavaggio e di sterilizzazione. Il personale addetto a tale area è inoltre adibito alla manutenzione ordinaria delle attrezzature.

2.2 Settore relativo all'allestimento di terreni colturali e reagenti

In ragione delle elevate caratteristiche qualitative dei terreni e reagenti impiegati nell'amplificazione dei numerosi tipi di substrati cellulari gli stessi vengono richiesti anche da altri laboratori sia della Sede che delle Sezioni periferiche. Gli stessi, prima del loro impiego, vengono sottoposti ad accurati controlli volti ad accertare la completa assenza di agenti contaminanti.

Tabella n°1. Quantità di terreni colturali allestiti nell'anno 2009

Terreno tipo	Quantità (litri)
MEM	545
D-MEM	80
RPMI 1640	80
Mc Coy, Ham's F10, Ham'F12	45
Terreno per cheratinociti (CEC)	10
Leibovitz, M199, Iscove's	25
Soluzioni saline /PBS	520
Soluzioni enzimatiche	70
Terreni microbiologici (BAB – SAB)	24
Antibiotici	11
TOTALE	1410

2.3 Amplificazione di colture cellulari

L'attività relativa all'ampliamento e mantenimento della collezione di cellule si è concretizzata nella preparazione degli stocks sia di nuovi tipi di cellule sia di quelli già presenti, per i quali è necessaria la ricostituzione del numero di fiale ritenuto congruo. Mediamente vengono congelate 70 fiale per ciascun tipo cellulare, 50 delle quali rappresentano lo "stock di lavoro". Attualmente la collezione è

costituita da **205** linee cellulari stabilizzate normali, **232** linee cellulari stabilizzate di tipo tumorale, **61** colture di cellule di primo impianto e **56** ibridomi. Complessivamente sono **41400** le fiale di cellule in deposito. Sono inoltre conservati elementi cellulari allestiti da soggetti affetti da malattia di Alzheimer, quale materiale di riferimento per l'intera comunità scientifica. Nel corso del periodo di riferimento sono state acquisite ed amplificate 9 nuove linee cellulari e sono stati ripristinati nuovi stocks per un ammontare di 654 fiale (tabella n°2).

Tabella n°2. Nuovi stocks cellulari allestiti

Nuove linee cellulari n°	Fiale allestite n°
9 (42 stocks)	537
Nuovi stocks	Fiale allestite
28 (linee già presenti)	117
COMPLESSIVAMENTE	
554 colture cellulari collezionate	41400 fiale depositate

3. Enti richiedenti e numero di cellule distribuite

Nel corso del tempo le richieste relative alla fornitura di cellule sono andate gradualmente aumentando. Nel corso del 2009 sono state distribuite 334 colture cellulari. Parallelamente è aumentato il numero delle Organizzazioni afferenti al Centro come testimoniato dalle **25** nuove Organizzazioni, **23** delle quali Nazionali e **2** Internazionali. Il numero complessivo delle Organizzazioni attualmente afferenti al Centro è indicato nella sottostante tabella.

Tabella n°3. Cellule distribuite e nuove Organizzazioni afferenti al Centro

Cellule distribuite n°	Nuove Organizzazioni afferenti al Centro
334	Nazionali n° 23
	Internazionali n° 2
COMPLESSIVAMENTE 745 ORGANIZZAZIONI AFFERENTI AL CENTRO. DELLE QUALI	
634 NAZIONALI	111 INTERNAZIONALI

4. Applicazione terapeutica di cellule staminali mesenchimali (CSM)

Visto il crescente interesse del settore ippiatrico per l'impiego delle CSM nella terapia rigenerativa, il Centro Substrati Cellulari ha attivato un progetto di ricerca per lo studio *in vitro* ed *in vivo* delle caratteristiche biologiche di tali cellule. A tale proposito una sezione della banca-cellule del Centro è stata dedicata alla conservazione di campioni di CSM equine isolate da midollo osseo e tessuto adiposo.

Nel 2008 è nato un gruppo di lavoro composto, oltre che dal Reparto Substrati Cellulari, da altre Unità Operative rappresentate rispettivamente dalla Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, dall'Ospedale Rizzoli di Bologna, dalla Società Privata "Avantea" di Cremona e dalla Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna.

Queste strutture, nell'ambito di un progetto sperimentale, forniscono ai veterinari richiedenti sospensioni di CSM per l'impiego *in vivo* ed hanno elaborato dei protocolli operativi, in concerto con i medici veterinari ippiatrici, per l'applicazione delle CSM nella terapia rigenerativa di lesioni teno-legamentose e cartilaginee nella specie equina.

Nel 2009 **42** cavalli sono stati sottoposti all'impianto di CSM, 13 di essi sono stati trattati con cellule isolate da midollo osseo mentre 29 da tessuto adiposo.

Tabella n°4. Cellule staminali mesenchimali fornite ai veterinari ippiatrici.

Cavalli sottoposti a terapia cellulare con:	
CSM DA MIDOLLO OSSEO	CSM DA TESSUTO ADIPOSO
n°13	n°29

Complessivamente, dall'inizio di tale attività sono stati trattati n°70 cavalli con CSM e attualmente essi sono sottoposti a follow up.

5. Controlli qualitativi

Gli stessi vengono perseguiti con il fine di accertare le caratteristiche intrinseche e verificare che le colture cellulari collezionate siano esenti da contaminazioni di varia natura.

Tali controlli vengono svolti con differenti metodologie alcune delle quali di "screening", che vengono svolte durante le varie fasi del processo produttivo; inoltre, al termine del ciclo operativo il prodotto viene sottoposto alle indagini previste dalla Farmacopea Europea. A seconda della natura dell'agente contaminante oggetto dell'indagine, alcuni controlli vengono eseguiti applicando più metodologie, impiegate in associazione poiché caratterizzate sia da una diversa sensibilità che specificità.

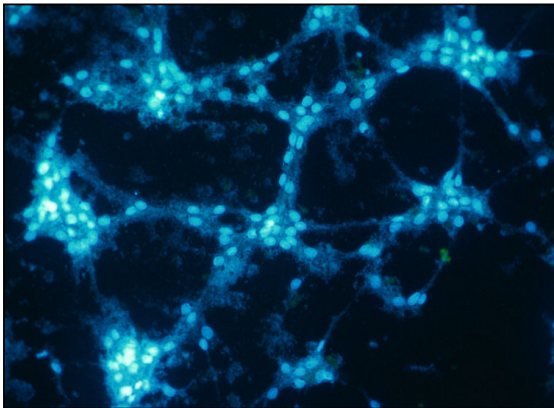
Le indagini routinariamente perseguite sono volte ad accertare le seguenti contaminazioni :

5.1 Batteri, funghi e lieviti.

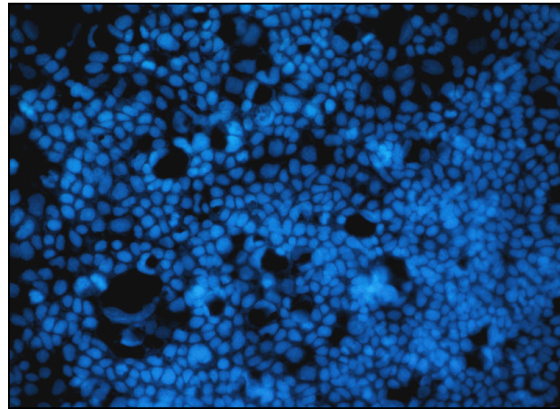
L'indagine prevede l'esecuzione di 3 passaggi seriali in appropriati terreni microbiologici, ognuno ad intervalli di 7 giorni e la necessità di operare in isolamento in camere assolutamente sterili.

5.2 Micoplasmi.

Ad ogni passaggio cellulare le colture sono sottoposte ad una colorazione che consente di evidenziare DNA extra-cellulare ascrivibile alla presenza di eubatteri, inclusi i micoplasmi (colorazione di Hoechst). Ad ogni processo di congelamento la coltura è sottoposta inoltre ad un'analisi immuno-enzimatica, che consente di rilevare le specie di micoplasmi più frequentemente contaminanti le colture di tessuto ed è spesso affiancata da una reazione di PCR. Al termine del processo produttivo tali tests vengono associati all'esame ufficiale consistente nell'impiego di cellule indicatrici (VERO) inoculate con estratti del campione in esame e, dopo l'esecuzione di passaggi seriali, le medesime vengono sottoposte alla colorazione di Hoechst. I micoplasmi vengono anche ricercati sul materiale di origine animale utilizzato, quali il siero fetale e gli enzimi proteolitici ottenuti rispettivamente dalla specie bovina e da quella suina.



Cellule contaminate da micoplasmi



Cellule non contaminate.

5.3 Virus animali ed umani.

Gli stessi vengono ricercati sia sui reagenti che sulle colture cellulari attraverso reazioni classiche di virologia, così come tramite reazioni di biologia molecolare (PCR, real time-PCR).

5.4 Endotossine batteriche

Il livello di endotossina prodotta da batteri Gram negativi viene valutato principalmente sui reagenti di origine animale e sull'acqua utilizzata per la preparazione dei reagenti e dei terreni colturali. La prova è eseguita impiegando il *Limulus polyphemus*, esso è infatti in grado di indurre la formazione di un coagulo in presenza di un estratto di amebociti, come previsto dalla normativa Ufficiale.

5.5 Tumorigenicità.

Tale parametro viene accertato attraverso tests *in vitro* ed *in vivo* volti rispettivamente ad evidenziare colonie di cellule trasformate in terreno semi-solido e la formazione di neoformazioni in animali timectomizzati.

5.6 Caratterizzazione della specie di origine.

La specie di origine di una coltura cellulare viene confermata attraverso l'analisi del profilo isoenzimatico, come stabilito dalla normativa inserita nella Farmacopea Europea. Parallelamente ad essa viene svolta l'analisi del DNA mitocondriale attraverso una PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Nella tabella n°5 vengono riportati le tipologie ed il numero di controlli eseguiti nel 2009.

Tabella n°5. tipo e numero di controlli qualitativi svolti

Tipologia di controllo	Numero
Eubatteri (screening) (batteri, funghi, lieviti)	6042
Eubatteri (controllo ufficiale)	19
Micoplasmi (screening):	
Col. Hoechst	2314
Analisi immunoenzimatica	74
PCR	400
Esame colturale (Controllo Ufficiale)	7
Virus	2263
Specie di origine	20
Tumorigenicità	0
TOTALE	11139

6. Servizi e attività diagnostica

Oltre alla distribuzione di cellule di varia natura il Centro svolge altre attività di servizio con il fine di rilevare eventuali contaminazioni di prodotti biologici o di cellule di altri Enti.

Gli accertamenti eseguiti sono della stessa natura di quelli effettuati quali “controlli interni” e vengono generalmente richiesti per la determinazione della purezza nei confronti di agenti contaminanti di varia natura oltre che per la valutazione di caratteristiche oncogene/tumorigene in cellule impiegate nella produzione di prodotti biologici.

Gli Enti richiedenti tali servizi sono ascrivibili a Centri Ospedalieri impegnati nel settore ematologico ed in quello dei trapianti terapeutici.

Ditte Farmaceutiche richiedono controlli su reagenti di derivazione animale (siero ed enzimi), di cellule impiegate nel ciclo produttivo e di prodotti finiti.

In particolare le richieste che pervengono al Centro riguardano i seguenti agenti, alcuni dei quali potenzialmente responsabili di zoonosi:

- micoplasmi (in campioni di latte o di altra natura);
- retrovirus endogeni (specie suina e bovina);
- virus erpetici linfotropici (specie suina);
- epatite E nelle specie aviare e suina;
- pestivirus;
- circovirus;
- virus propri della specie umana: HIV, HTLV, HBV, HCV, EBV, HSV, Parvovirus, CMV);
- adenovirus, epatite A, norovirus.

7. Epidemiologia: Creazione di una banca di dati

La divulgazione delle informazioni relative alle cellule collezionate, alle loro caratteristiche intrinseche ed ai servizi forniti dal Centro ha reso necessaria la creazione di una banca dati accessibile agli utilizzatori. La medesima è attualmente consultabile sul sito dell'Istituto (www.izsler.it; banca cellule) ed è oggetto di variazioni graduali, ma progressive volte a perfezionare le conoscenze relative alle attività ed alle cellule disponibili, nonché a semplificare le procedure relative alla loro acquisizione o alla richiesta di fornitura di servizi.

8. Ricerca e sperimentazione

Ha differenti indirizzi che nel loro insieme sono finalizzati al perfezionamento dei metodi di controllo qualitativo e ad un impiego delle colture cellulari in altri settori fra i quali quello terapeutico.

9. Progetti attivati ed attualmente in corso

- PRF 2006 301: *Diagnosi e profilassi dell'influenza aviaria e studio dei meccanismi di evoluzione virale e trasmissione interspecie.*
- PRC 2007 011: *Sviluppo e miglioramento dei protocolli di crioconservazione delle colture cellulari.*
- PRF 2007 302: *Adult mesenchymal stem cells: differentiative lineages and applications in autologous and allogenic implantation and tissue remodelling.*

- PRC 2008 013: “Linee guida per l'adozione di un sistema di qualità basato sui principi della buona pratica di laboratorio (BPL) e in accordo alle ISO 9001 in un laboratorio di produzione di cellule e controlli qualitativi”.
- FLUTRAIN 2007: “Training and Technology Transfer of Avian Influenza Diagnostics and Diseases Management Skills”.
- Regione Lombardia 2008: Validazione dei substrati cellulari collezionati.

10. Aggiornamento e formazione professionale (Corsi, convegni e giornate di studio in cui è stato coinvolto il Centro Substrati Cellulari)

- Cellule staminali: potenzialità terapeutica in sicurezza.
- ISBER Congress, May 12-15, 2009 Portland (USA).
- BBMRI, 8-9 Febbraio, 21 Luglio (Bruxelles, Roma).

11. Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali ed internazionali

Richieste di pareri, suggerimenti, consigli, vengono sistematicamente rivolti al Centro Substrati Cellulari da parte delle numerose Organizzazioni afferenti al Centro e relativi alle modalità ottimali di coltivazione ed impiego delle colture cellulari.

Più recentemente sono stati avviati rapporti di collaborazione con Unità Ospedaliere, principalmente Centri di ematologia, per il controllo qualitativo, con particolare riferimento alla rilevazione di eventuali contaminanti microbici e virali, delle cellule destinate al trapianto di midollo osseo.

Altre collaborazioni sono state avviate con centri di medicina rigenerativa impegnati nel settore della terapia cellulare, quali l'Ospedale Niguarda di Milano ed il Centro di Medicina Rigenerativa di Modena, e con ditte farmaceutiche per il controllo di prodotti derivati da tessuti animali e destinati alla specie umana.

La scrivente partecipa a Convegni Nazionali ed Internazionali come relatrice su argomenti riguardanti le colture cellulari dal così definito “Bio-banking” all'applicazione in ingegneria tissutale, ai controlli di qualità, alla messa a punto di metodiche relative all'isolamento e caratterizzazione di cellule staminali.

Le principali Organizzazioni con le quali sussistono rapporti pressoché costanti di collaborazione sono di seguito riportate:

- Istituto di Zootechnica, Università Cattolica del S. Cuore di Piacenza, Piacenza
- Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano
- Centro di Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del S. Cuore, Cremona
- Istituto di Anatomia Patologica e Patologia Generale, Università degli Studi di Parma
- Istituto Superiore di Sanità, Roma
- Altri Istituti Zooprofilattici
- Istituto di Malattie Infettive, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia
- Divisione di Urologia, Modulo di Immunoterapia, Ospedale S. Orsola Malpighi, Bologna
- Centro di Riferimento Nazionale per la coltura dell'epidermide *in vitro* e banca tessuti, Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano
- Divisione di Cardiocirurgia degli Spedali Civili, Brescia
- Istituto “Lazzaro Spallanzani”, Rivolta d'Adda, Bergamo
- Dipartimento Ingegneria Materiali e Tecnologie Industriali, Università degli Studi di Trento
- Reparto di rigenerazione tissutale ossea, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna
- Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bologna

Numerosi rapporti, scambi e collaborazioni sono in corso con Enti che operano nell'ambito delle Scienze Biomediche, operanti sia nel settore Medico-Biologico che Veterinario, Ditte Nazionali ed Internazionali operanti con le colture cellulari (Avantea, Rottapharm, Respharma, Holostem-Medicina Rigenerativa, Guna, Kiron, Areta, Medestea, Biodiversity, Bioveta, Merial, Veterina, Biorep, Chiesi farmaceutici).