

## REPARTO DEI SUBSTRATI CELLULARI E IMMUNOLOGIA CELLULARE

Relazione del Dirigente Responsabile Dott. G. Lombardi

### ATTIVITÀ DI SERVIZIO

#### Laboratorio Colture Cellulari

L'attività svolta ha riguardato il reperimento, l'amplificazione, il controllo, la conservazione ed impiego/distribuzione di colture cellulari di differente tipologia. Nel laboratorio si riconoscono le seguenti articolazioni interne:

- area di servizi generali
- area di preparazione ed amplificazione di colture cellulari di differente natura, incluse le cellule stromali mesenchimali
- aree adibite all'esecuzione di controlli qualitativi, eseguiti in accordo a linee guida internazionali, al fine di accertare l'assenza di contaminanti microbici e virali, valutare la specie di origine
- area di deposito di materiale biologico (frigoriferi a +5°C, congelatori a -24°C e ≤-65°C, conservatori di azoto liquido). Tale area si identifica attualmente con la nuova struttura rappresentata dalla Biobanca IZSLER.

Nell'insieme, il laboratorio delle colture cellulari conta 624 tipi di cellule, per un ammontare superiore a 40.000 fiale depositate.

Nell'anno 2016 sono stati distribuiti 106 tipi cellulari. Le Istituzioni che si sono rivolte al Centro per l'acquisto di campioni cellulari sono sia Nazionali che Internazionali servendosi della Biobanca come interfaccia (BVR). L'attività di servizio comprende anche la fornitura di cellule anche alle Sezioni provinciali e ai reparti interni.

Il laboratorio opera nel rispetto del sistema qualità specifico per questo settore, che consiste nella Certificazione ISO 9001: 2008 in associazione al sistema dell'Accreditamento ISO/IEC 17025 comune a tutto l'Istituto e più mirato alla esecuzione di metodi di prova.

Si è conclusa la sperimentazione clinica relativa alle cellule stromali mesenchimali (CSM)allogene in ambito veterinario principalmente utilizzate per la terapia di cavalli e cani con lesioni tissutali naturali. La relazione finale con i risultati ottenuti dal trattamento è stata inviata al Ministero della Salute nel mese di febbraio 2017

I risultati sino ad ora ottenuti hanno evidenziato la completa innocuità di questi elementi cellulari allogene ed esiti clinici soddisfacenti.

Essi sono stati allestiti nel laboratorio colture cellulari, sottoposte e controlli qualitativi e depositate nella biobanca.

L'impiego di emoderivati: Plasma ricco di Piastrine – PRP e lisato del Plasma ricco di Piastrine –LP, nel settore veterinario è continuato nel 2016 ampliandosi soprattutto per numero di fiale preparate. I suddetti prodotti biologici ad impiego autologo, in ragione delle caratteristiche anti-infiammatorie e dei numerosi fattori di crescita di cui sono provvisti, sono ampiamente richiesti dai veterinari .

Le applicazioni sono di tipo tendino-legamentose, osteo-articolari e, più recentemente, oculari sia nella specie equina che in quella canina e felina.

Nel 2016 sono state distribuite oltre 246 dosi di prodotti biologici(PRP/LP). L'introduzione del PRP liofilizzato ha consentito ai veterinari di disporre di un prodotto di facile conservazione e utilizzo ampliandone ulteriormente l'uso.

#### **Riassunto attività svolte per la Biobanca nel 2016**

Il Centro di Referenza ed in particolare il Laboratorio delle Colture Cellulari è stato designato "Centro di Collaborazione Internazionale per le Biobanche Veterinarie Colture Cellulari dell'OIE". In data 4 novembre

2016 è stata ricevuta la notifica per l'estensione del Patent Depper a batteriofagi e plasmidi in accordo al Trattato di Budapest sul riconoscimento internazionale del deposito di microrganismi ai fini della procedura in materia di brevetti. Al fine di divulgare le informazioni inerenti le attività della Biobanca dell'IZSLER è stata preparata la locandina in lingua inglese. Inoltre, è stato inserito un catalogo on-line utile per le ricerche e richiesto dagli utenti esterni che hanno la possibilità di visualizzare in un elenco organico tutto ciò che è presente in BVR, suddiviso per risorsa biologica. Il Catalogo prevede dei link per l'accesso diretto alle schede tecniche. Su richiesta di AIFA, a seguito dell'ispezione presso il Laboratorio CQF, sono stati elaborati specifici certificati di analisi per colture cellulari, batteri, micoplasmi e virus relativi a ciascun lotto, al fine di implementare le informazioni presenti nelle schede.

### **Centro di Referenza per i Metodi Alternativi, Cura e Benessere degli Animali da Laboratorio**

Il Centro di Referenza Nazionale dei Metodi Alternativi, Benessere e Cura degli Animali da Laboratorio, ha perseguito l'attività relativa alla messa a punto e standardizzazione di tecnologie in vitro in accordo al principio delle "3Rs", come indicato dalla Direttiva Europea 2010/63/UE recepita con il Decreto Ministeriale 4 Marzo 2014 n° 26. Gli obiettivi perseguiti dal laboratorio sono stati la messa a punto di metodi approvati da OECD ed applicabili nei laboratori del Centro di Referenza (test di Ames, test del micronucleo, test di carcinogenicità) e lo sviluppo di test diagnostici sierologici e di biologia molecolare per il controllo sanitario degli animali da laboratorio. Ulteriori settori oggetto di ricerca hanno riguardato l'allestimento di modelli di laboratorio in sistemi tridimensionali (3D) sia di tipo statico che dinamico e lo sviluppo di tecnologie innovative "Organ on Chip", l'accertamento della tossicità di alcune tipologie di nano-particelle metalliche mediante test *in vitro*, la valutazione dell'efficacia antivirale di siRNA nei confronti di differenti biotipi dell'influenza A, lo sviluppo di anticorpi sintetici alternativi all'utilizzo di animali per il monitoraggio sanitario degli animali stabulati.

#### **Nuova struttura in GMP**

Il Laboratorio Controllo Qualità, dopo un percorso iniziato nell'anno 2014, mediante la predisposizione del sistema documentale (Standard Operating Procedure), l'allestimento dei laboratori sia di area classificata sia di area non classificata, la formazione del personale operante all'interno della struttura, ha sottomesso la domanda di autorizzazione per Officina Farmaceutica ad AIFA e, dopo visita ispettiva eseguita nel maggio 2016, si è riusciti ad ottenere l'Autorizzazione ad operare secondo il sistema qualità delle Good Manufacturing Practice (GMP) al fine di eseguire i controlli qualità inerenti i farmaci ed i prodotti di terapie avanzate inerenti la medicina umana. Inoltre, è stata spedita la richiesta anche al Ministero della Salute al fine di ottenere la medesima autorizzazione per i controlli inerenti i farmaci della Medicina Veterinaria. A tale proposito, la visita ispettiva è stata effettuata a Febbraio 2016 e si sta provvedendo alla verifica delle conformità al fine di arrivare anche alla fine di questo percorso per operare in ambito GMP per la medicina veterinaria.

#### **Attivazione del percorso delle Buone Pratiche di Laboratorio: sistema qualità "BPL"**

Il Centro di Saggio per le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) ha comportato la predisposizione del sistema documentale e l'individuazione del personale coinvolto in questo percorso. Nell'anno 2016 si è iniziato a valutare il tipo di approccio gestionale ed il percorso formativo da intraprendere per il personale interessato a questo tipo di attività. A tale proposito, nell'anno 2016 è stato organizzato in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità un corso inerente le BPL aperto sia a discenti IZSLER sia esterni.

## Laboratorio di Immunologia Cellulare

Il Laboratorio di Immunologia Cellulare ha realizzato 2 nuovi metodi di prova in conformità con la programmazione assegnata delle attività di servizio:

1. Metodo di prova interno per la rivelazione di interferon-gamma nel liquido ruminale tramite ELISA sandwich
2. Metodo di prova interno per la determinazione di immunoglobuline nel liquido ruminale di bovini tramite ELISA sandwich

Tali metodi elaborati sono stati ratificati, pubblicati ed inseriti in Sistema Qualità.

Il Laboratorio, in collaborazione con l'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica di Piacenza, ha inserito i due metodi di cui sopra nel contratto di servizio relativo allo sfruttamento del brevetto Europeo "Application 11735547.9-1405, Patent 2580597" Methods and kits for the evaluation of a ruminant's diet".

Il Laboratorio ha ulteriormente sviluppato il proprio pacchetto di diagnostica predittiva per bovine in asciutta e lo ha presentato nel corso ECM "DIAGNOSTICA PREDITTIVA A SFONDO IMMUNOLOGICO DELLE MALATTIE CONDIZIONATE NEGLI ANIMALI DI INTERESSE ZOOTECNICO".

## ALTRE TIPOLOGIE DI ANALISI

### Laboratorio Colture Cellulari

Oltre al settore delle colture cellulari, il laboratorio è impegnato in una serie di attività analitiche su prodotti biologici /farmaceutici che vengono svolte sia con metodologie sviluppate dal laboratorio, in accordo a linee guida Internazionali (UNI EN ISO) o indicate dalla Farmacopea Europea.

Le medesime hanno le seguenti tipologie:

- convalida di processi di sterilizzazione, disinfezione ed inattivazione di agenti patogeni, potenziali contaminanti di attrezzature, strutture, matrici e campioni biologici di strutture operanti in GMP;
- controllo per l'identificazione di virus contaminanti lotti di prodotti farmaceutici di derivazione animale, ma impiegati in terapia umana;
- ricerca di virus estranei in cellule staminali umane ed animali destinate alla terapia cellulare;
- ricerca della contaminazione di prodotti biologici da parte di micoplasmi mediante diverse metodologie
- controllo di prodotti biologici per la verifica della specie animale di origine;
- determinazione dell'efficacia di nuove molecole/prodotti ad inibire la replicazione virale, mediante indagini *in vitro* ed *in vivo*;
- test di citotossicità *in vitro*.
- Indagini di trasformazione cellulare *in vitro* e tumorigenicità *in vivo* in prove di convalida di prodotti utilizzabili in Terapia cellulare

Le indagini indicate vengono eseguite mediante test basati su reazioni di biologia molecolare e mediante inoculazione di colture cellulari recettive. Per le suddette indagini vengono utilizzati sia cellule che virus depositati nella Biobanca dell'IZSLER e rappresentanti standard di riferimento.

## ATTIVITÀ DI RICERCA

- Accertamento dell'impiego terapeutico delle cellule staminali in Medicina Veterinaria;
- Determinazione di parametri qualitativi su cellule staminali umane ed animali utilizzabili in Medicina Rigenerativa
- Messa a punto di reazioni di biologia molecolare per l'identificazione di virus murini
- Sviluppo di un sistema 3D per la coltivazione di linee cellulari stabilizzate
- Strategie innovative finalizzate ad inibire la replicazione del virus influenzale (siRNA)

- Allestimento di modelli 3D
- Sviluppo di test alternativi all'utilizzo di animali da laboratorio