



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN:

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

IMPLEMENTAZIONE DEI TEST DI  
STERILITÀ SU TESSUTO ADIPOSO DA  
IMPIANTO

IMPLEMENTATION OF STERILITY TESTS  
ON ADIPOSE TISSUE IMPLANTS

Studente:  
IRENE DI PRIMIO

Relatore:  
PROF. ELISABETTA DAMIANI

Correlatore:  
PROF. MONICA CRICCA

Correlatore:  
DOTT.SSA ELENA BONDIOLI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023



## SOMMARIO

|                                                                    |        |
|--------------------------------------------------------------------|--------|
| - INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI .....                            | pag.5  |
| - IL TESSUTO ADIPOSO .....                                         | pag.7  |
| - LE CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO .....                   | pag.11 |
| - SCOPO DEL TRAPIANTO DEL TESSUTO ADIPOSO .....                    | pag.14 |
| - BANCA CUTE REGIONALE EMILIA-ROMAGNA (RER) .....                  | pag.16 |
| - SISTEMA QUALITÀ ISO-GMP .....                                    | pag.20 |
| - LA NORMATIVA DI RIFERIMENTO .....                                | pag.21 |
| - IL VALIDATION MASTER PLAN .....                                  | pag.23 |
| - LA STERILITÀ .....                                               | pag.24 |
| - IL TESSUTO ADIPOSO COME PRODOTTO TERAPEUTICO “BORDERLINE” .....  | pag.25 |
| - IL PERCORSO DEL TESSUTO ADIPOSO: DAL PRELIEVO ALL’UTILIZZO ..... | pag.28 |
| - MATERIALI E METODI .....                                         | pag.31 |
| - FLACONI BactAlert BioMérieux .....                               | pag.31 |
| - IL SISTEMA BactAlert 3D® .....                                   | pag.31 |
| - TEST DI FERTILITÀ .....                                          | pag.35 |
| - ANALISI DEI FLACONI POSITIVI MEDIANTE VITEK® MS PRIME .....      | pag.39 |

|                                                                                  |        |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------|
| - IDENTIFICAZIONE DI <i>ASPERGILLUS NIGER</i> .....                              | pag.40 |
| - UTILIZZO PRATICO DEL SISTEMA BactAlert 3D® PER L'ANALISI SU TESSUTO ADIPOSO .. | pag.41 |
| <br>                                                                             |        |
| - RISULTATI .....                                                                | pag.44 |
| <br>                                                                             |        |
| - DISCUSSIONE .....                                                              | pag.51 |
| <br>                                                                             |        |
| - CONCLUSIONI .....                                                              | pag.53 |
| <br>                                                                             |        |
| - BIBLIOGRAFIA .....                                                             | pag.54 |

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Attualmente, la Medicina Rigenerativa è considerata un settore interdisciplinare di ricerca e applicazioni cliniche, il cui obiettivo è riparare, sostituire o rigenerare cellule, organi e tessuti per ripristinare funzioni compromesse da difetti congeniti, malattie, traumi o invecchiamento. Questa disciplina emergente utilizza una combinazione di vari approcci terapeutici, che includono l'impiego di molecole solubili, prodotti di ingegneria tissutale, riprogrammazione cellulare, terapie geniche e terapie basate sull'uso di cellule staminali consolidate.

Il tessuto adiposo è un tessuto ampiamente utilizzato in ambito clinico-trapiantologico in quanto rappresenta una sorgente di cellule staminali con proprietà rigenerative. Per le sue proprietà rigenerative, il tessuto adiposo trova ampia applicazione clinica nell'ambito della medicina rigenerativa e ricostruttiva quali ortopedia, chirurgia senologica, chirurgia plastica, dermatologia, chirurgia generale, vulnologia e otorinolaringoiatria (*Linee guida CNT, 2016; Battaglini et al., 2019; Combi et. al., 2011, Mingazzini et. al., 2010; Moffa et. al., 2018*).

Negli ultimi anni si è aperto uno scenario collaborativo in cui l'azienda privata (*Lipobank S.R.L. Milan, IT*) e la *Banca della Cute della Regione Emilia-Romagna* hanno intrapreso un percorso innovativo nell'ambito della crioconservazione del tessuto adiposo. La collaborazione, autorizzata dal *Centro Regionale Trapianti*, prevede l'attivazione presso la *Banca della Cute della Regione Emilia Romagna (RER)* della nuova funzione di banking del tessuto adiposo autologo che viene lavorato, convalidato e stoccato per fine trapiantologico presso la Banca, avvalendosi di una tecnologia di crioconservazione e scongelamento del tessuto adiposo brevettata secondo i più alti standard di sicurezza e sterilità certificati da *Organismi Notificati di Importanza internazionale (TUV)*.

*Lipobank* si impegna a fornire alla *Banca della Cute* la propria metodica brevettata oltre alla strumentazione tecnica necessaria, da allocare all'interno dei locali della Banca per l'attività di banking (predisposizione delle aliquote, congelamento e scongelamento, consulenza nei controlli di sicurezza, vitalità e sterilità dei campioni raccolti) oltre che all'affiancamento di personale tecnico – scientifico e logistico-amministrativo come supporto operativo al personale dell' Azienda Unità Sanitaria Locale (*AUSL*) Romagna.

La Banca della Cute provvede alla convalida del tessuto adiposo, con finalità di bancaggio dello stesso, per l'autotrapianto sul paziente candidato ad interventi rigenerativi in diversi ambiti specialistici, realizzando tutte le attività connesse, conseguenti e strumentali: dagli esami di laboratorio necessari al fine di controlli di vitalità e sterilità, al congelamento, stoccaggio e, a richiesta, di scongelamento dei campioni di tessuto adiposo da utilizzarsi solo al fine di trapianto autologo, per i pazienti che ne facciano richiesta a *Lipobank* (<https://www.auslromagna.it/notizie/comunicati/item/4203-banca-regionale-cute-al-via-attivita-di-banking-di-tessuto-adiposo-autologo-e-sviluppo-attivita-di-ricerca-nel-campo-della-bioingegneria-tessutale>).

La produzione dei prodotti biologici per fine terapeutico sono soggette a rigorose regolamentazioni internazionali, principalmente atte a garantire la sicurezza del prodotto finale destinato alla somministrazione ai pazienti.

Questa regolamentazione richiede l'implementazione di specifici criteri e procedure, compresa la pianificazione dettagliata delle attività di produzione e la valutazione dei rischi. Un aspetto cruciale è la garanzia della sterilità del prodotto, che viene ottenuta attraverso l'uso di pratiche asettiche durante la lavorazione e la produzione in ambienti controllati chiamati Clean Rooms o "Camere Bianche". Inoltre, viene eseguito un test di sterilità sul prodotto finale per confermare la sua assenza di contaminazione.

Il tessuto adiposo in particolare viene campionato e sottoposto a saggi di sterilità durante tutte le fasi del processo produttivo: dopo il prelievo chirurgico (tessuto adiposo fresco), dopo l'aggiunta della soluzione di congelamento specifica prevista dalla procedura operativa e infine dopo lo scongelamento, prima di essere rilasciato su richiesta.

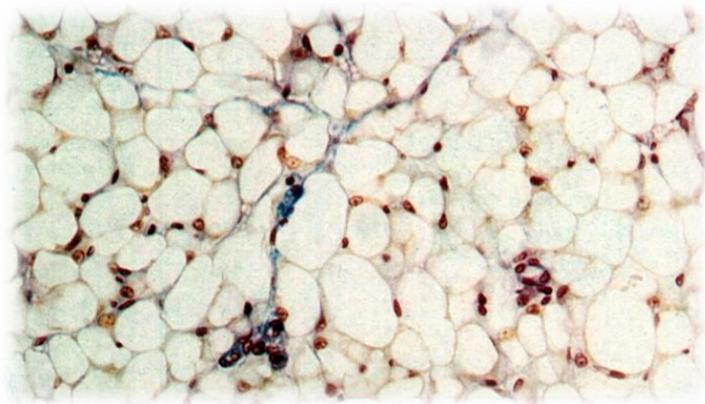
I saggi di sterilità, relativi al tessuto adiposo in carico alla *Banca Regionale della Cute (RER)*, vengono eseguiti dal personale tecnico e dirigenziale della *Batteriologia*, settore afferente all'Unità Operativa di *Microbiologia*, situato nella stessa sede (*Laboratorio Unico della Romagna*). I controlli di sterilità vengono effettuati attraverso l'impiego della tecnologia del sistema *BactAlert 3D® BioMérieux (BioMérieux Italia Spa)*

Lo scopo di questo lavoro è produrre dati utili di confronto applicativo-pratico tra diverse tipologie di flaconi forniti da *Biomérieux*, al fine di dare un contributo all'implementazione dei protocolli di sterilità relativi alla gestione pratica del tessuto adiposo.

## IL TESSUTO ADIPOSO

La cellula adiposa, o adipocita, costituisce l'unità morfo-funzionale del tessuto adiposo, un tipo di tessuto connettivo specializzato di derivazione mesenchimale. La sua principale funzione è quella di agire come riserva energetica nel corpo. L'adipocita è altamente specializzato nella sintesi, nell'accumulo e nel rilascio dei lipidi (*Adamo et al., 2005*)

Le cellule adipose si distinguono in due tipi principali: quelle uniloculari e quelle multiloculari. Le cellule adipose uniloculari, anche chiamate monovacuate, hanno forma sferica con un diametro superiore ai 100  $\mu\text{m}$ . Sono caratterizzate dalla presenza di una grande goccia lipidica centrale, chiamata liposoma, che contiene lipidi e non ha membrana. Questa goccia lipidica spinge il nucleo verso la periferia della cellula, riducendo il citoplasma a un sottile anello, dando alla cellula un aspetto istologico a "castone". Le cellule adipose uniloculari spesso si trovano raggruppate in ammassi, conferendo loro una forma poliedrica. Queste cellule costituiscono il tessuto adiposo bianco (*WAT, White Adipose Tissue, Fig. 1*), che è il tipo più comune di tessuto adiposo nell'organismo umano e appare giallo o biancastro al microscopio ottico.



**Figura 1.** Tessuto Adiposo Bianco

(*Adamo et al., Istologia di V. Monesi, Piccin Editore, 5° edizione 2005*)

Le cellule adipose multiloculari, o multivacuate, sono più piccole delle uniloculari e presentano numerose piccole goccioline lipidiche all'interno del citoplasma, che è più

abbondante. In queste cellule, il nucleo è centrale e sono ricche di mitocondri. Queste cellule costituiscono il tessuto adiposo bruno (BAT, *Brown Adipose Tissue*, Fig. 2), che appare brunastro al microscopio ottico a causa della presenza di numerosi mitocondri e di una maggiore vascolarizzazione.



**Figura 2.** Tessuto Adiposo Bruno

(Adamo et al., *Istologia di V. Monesi*, Piccin Editore, 5° edizione 2005)

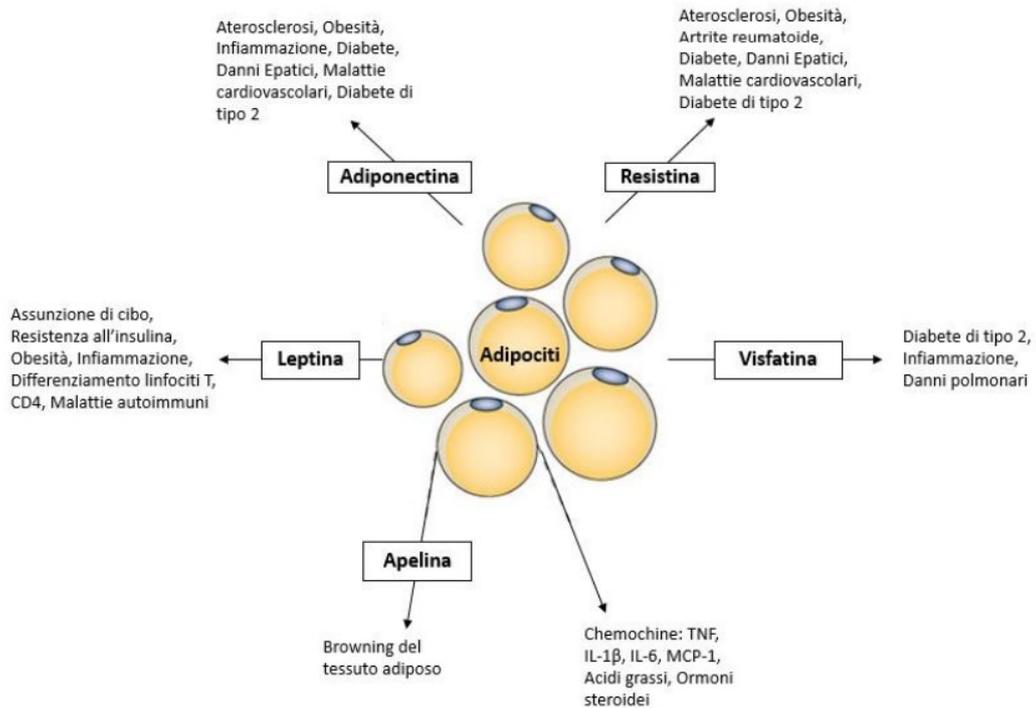
Questo tipo di tessuto adiposo è presente nell'uomo quasi esclusivamente durante la vita fetale e ha una funzione di termoregolazione (McGraw-Hill et al., 2005). Il tessuto adiposo bianco svolge una vasta gamma di funzioni, tra cui la sua notevole attività metabolica. L'adipocita, infatti, partecipa attivamente ai processi di lipogenesi e lipolisi. In altre parole, è in grado di accumulare lipidi quando l'apporto calorico supera il consumo energetico e, al contrario, di rilasciarli quando il bilancio energetico diventa negativo (McGraw-Hill et al., 2005). Nel tessuto adiposo bianco, i lipidi esogeni (di origine alimentare) ed endogeni (derivati dalla neosintesi epatica) raggiungono i capillari periadipocitari sotto forma di *Chilomicroni* e *VLDL* (*Very Low Density Lipoproteins*), rispettivamente. Qui, vengono idrolizzati dalla lipoprotein-lipasi, rilasciata dagli adipociti stessi, producendo acidi grassi. Questi acidi grassi attraversano la membrana cellulare dell'adipocita e vengono riconvertiti in trigliceridi, immagazzinati nella goccia lipidica centrale. In aggiunta alla sintesi dei trigliceridi, la cellula adiposa è in grado di sintetizzare acidi grassi utilizzando aminoacidi e glucosio come substrati. La lipolisi, invece, è il processo mediante il quale la lipasi adipocitaria scinde i trigliceridi immagazzinati, producendo glicerolo e acidi grassi. Questi acidi grassi attraversano la membrana cellulare per entrare nel flusso sanguigno, dove si legano all'albumina plasmatica

e vengono trasportati ai tessuti che li utilizzano come fonte di energia. Entrambi questi processi sono regolati da stimoli ormonali. L'insulina, ad esempio, è un ormone anabolico che promuove l'assunzione di acidi grassi, aminoacidi e glucosio da parte delle cellule adipose, favorendo la sintesi e inibendo la degradazione di questi substrati. L'attivazione del recettore dell'insulina attiva la cascata di trasduzione del segnale attraverso la fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K), che porta ad aumentare l'espressione di GLUT4 sulla membrana plasmatica, facilitando l'ingresso del glucosio all'interno della cellula e inducendo processi di glicogenosintesi, proteosintesi e lipogenesi, mentre inibisce la lipolisi (*Ganong et al., 2008*). Gli ormoni lipolitici agiscono attivando la lipasi adipocitaria. Questi ormoni si legano ai loro recettori specifici, attivando l'adenilato-ciclastasi che produce cAMP (adenosina monofosfato ciclico). Il cAMP attiva quindi la PKA (protein chinasi cAMP-dipendente), che, a sua volta, fosforila la lipasi adipocitaria, attivandola. Oltre alla liberazione di acidi grassi, il tessuto adiposo rilascia altri composti lipidici come colesterolo, retinolo, ormoni steroidei e prostaglandine. Mentre il colesterolo, il retinolo e alcuni prostanoidi non sono sintetizzati dal tessuto adiposo bianco (WAT), ma solo immagazzinati al suo interno, alcune tappe del metabolismo degli ormoni steroidei possono effettivamente avvenire nell'adipocita. Ad esempio, l'attivazione dell'11deidrocorticosterone in cortisolo può essere catalizzata dall'enzima 11 $\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi tipo 1 all'interno dell'adipocita (*Robbins et al., 2006*).

Il tessuto adiposo bianco svolge anche funzioni endocrine (*Fig. 3*), poiché è in grado di secernere ormoni peptidici con azione autocrina, paracrina ed endocrina, noti come adipochine. Queste adipochine svolgono un ruolo cruciale nella regolazione di vari processi fisiologici nel corpo, inclusi il metabolismo, l'appetito, l'infiammazione e la sensibilità insulinica. Tra le adipochine più studiate vi sono l'adiponectina, la leptina, l'ormone resistina, l'ormone di rilascio dell'ormone della crescita (GH) e molti altri. La loro secrezione e regolazione sono influenzate da diversi fattori, tra cui lo stato nutrizionale, l'obesità, l'attività fisica e lo stato infiammatorio

(*Trayhurn et al., 2005*). Il tessuto adiposo bruno è specializzato nella termogenesi, un processo metabolico unico che comporta la produzione di calore nell'organismo. Le cellule adipose multiloculari del tessuto adiposo bruno sono dotate di una proteina canale chiamata *Termogenina*, anche nota come proteina disaccoppiante 1 (UCP1), che gioca un ruolo chiave in questo processo. La termogenina converte l'energia derivante dalla  $\beta$ -ossidazione degli acidi

grassi, normalmente utilizzata per produrre ATP, direttamente in calore anziché in energia chimica, come avviene nei processi metabolici tradizionali. Questo meccanismo consente al tessuto adiposo bruno di generare calore in modo efficiente, contribuendo alla termoregolazione corporea e alla difesa dalla ipotermia.



**Figura 3.** Funzioni Endocrine del Tessuto Adiposo

## LE CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO

L'Adipocita origina da una cellula staminale pluripotente presente nel tessuto connettivo embrionale, conosciuta come *Cellula Mesenchimale*. Queste cellule mesenchimali, che hanno un aspetto simile ai fibroblasti, persistono anche nel tessuto connettivo adulto mantenendo la loro pluripotenzialità (Fig. 4). Ciò significa che possono differenziarsi in varie tipologie cellulari, tra cui fibroblasti, osteoblasti, condroblasti, lipoblasti, mioblasti, emocitoblasti e neuroblasti. Questa capacità di differenziazione è essenziale per il processo di rigenerazione e riparazione dei tessuti nel corpo umano (Monesi et al.,2018).

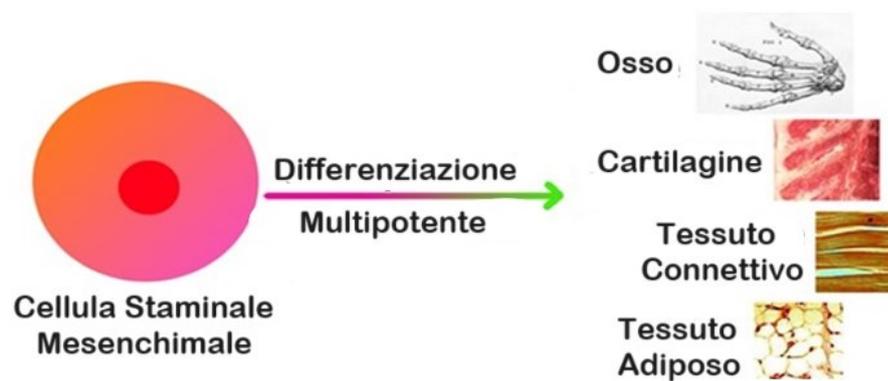
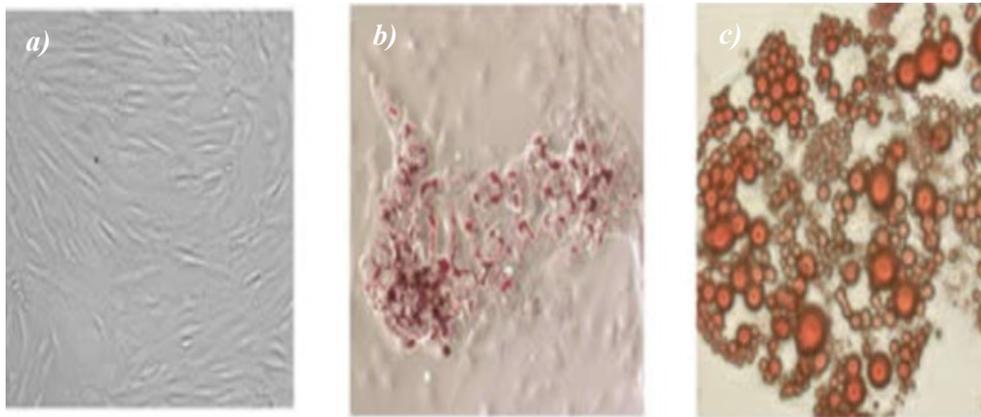


Figura 4. Pluripotenzialità delle Cellule Staminali Mesenchimali

Nel processo di differenziazione della cellula adiposa si possono distinguere vari stadi evolutivi. Il primo stadio è rappresentato dal *Lipoblasto*, una cellula unipotente che ha il potenziale per diventare un adipocita. Segue il *Preadipocita*, una cellula *Preadiposa Committed*, ossia destinata a subire una differenziazione terminale. Dopo il *Preadipocita*, si forma la *Cellula Adiposa Immatura* che, infine, si sviluppa nella *Cellula Adiposa Matura*, conosciuta come *Adipocita*. Questo processo sequenziale garantisce lo sviluppo funzionale delle cellule adipose necessarie per l'accumulo e la gestione dei lipidi nel tessuto adiposo.

L'*Adipogenesi* è un processo che ha origine con la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali. In seguito, alcune di queste cellule vengono indirizzate verso la differenziazione adipocitaria, formando i lipoblasti, che a loro volta danno origine ai preadipociti (Fig. 5). Questi preadipociti continuano a proliferare, aumentando la popolazione delle cellule precursori. Una volta che la fase di proliferazione si interrompe, i preadipociti iniziano la differenziazione in cellule adipose immature. Queste nuove cellule adipose immature cominciano ad accumulare lipidi, che si raggruppano in numerose piccole gocce lipidiche all'interno delle cellule. Queste gocce lipidiche si fondono gradualmente per formare una grande goccia lipidica centrale, conosciuta come liposoma. Questo processo, che avviene in modo sequenziale e coordinato, porta alla formazione delle cellule adipose mature, o adipociti.



**Figura 5.** Adipogenesi: a) ADSC (Adipose-Derived Stem Cells) indifferenziate; b) ADSC in via di differenziazione in senso adipocitario; c) Preadipociti e Adipociti maturi. (Adamo et al., *Istologia di V. Monesi*, Piccin Editore, 5° edizione 2005).

La regolazione dell'adipogenesi è un processo complesso che coinvolge una serie di stimoli sia positivi che negativi, sia di natura nutrizionale che ormonale. Tra i fattori chiave che modulano questo processo, emerge il *Perossisoma proliferatore-attivato recettore gamma (PPAR $\gamma$ )*, un recettore nucleare steroideo che svolge un ruolo fondamentale nella differenziazione e nella maturazione degli adipociti. Il PPAR $\gamma$  è coinvolto nell'attivazione di geni che regolano la sintesi e l'accumulo di lipidi, promuovendo l'espressione di fattori trascrizionali coinvolti nell'adipogenesi, come ad esempio *C/EBP $\alpha$*  (fattore di trascrizione *CCAAT/enhancer-binding protein alfa*) e *SREBP1* (*sterol regulatory element-binding protein 1*). Questi fattori trascrizionali orchestrano una cascata di eventi molecolari che guidano le cellule precursori

lungo il percorso della differenziazione adipocitaria, culminando nella formazione di adipociti maturi. È importante sottolineare che la regolazione dell'adipogenesi non dipende esclusivamente dal PPAR $\gamma$ , ma è influenzata anche da una vasta gamma di altri fattori, tra cui ormoni, citochine, fattori di crescita e segnali provenienti dall'ambiente cellulare circostante. Questi fattori interagiscono in modo complesso per modulare l'equilibrio tra proliferazione e differenziazione delle cellule precursori, garantendo così il mantenimento dell'omeostasi del tessuto adiposo (*Koutnikova et al., 2001*).

Diversi studi hanno messo in evidenza che il tessuto adiposo umano dell'adulto rappresenta un'abbondante risorsa di cellule staminali mesenchimali. (*Zuk et al. 2002*).

Le cellule mesenchimali ottenute dal tessuto adiposo sono comunemente conosciute nella letteratura anglosassone come *Adipose-Derived Stem Cells (ADSC)*, ovvero *cellule staminali derivate dal tessuto adiposo*. (*Zuk et al., 2001*). Queste cellule sono particolarmente interessanti per la ricerca e le applicazioni cliniche poiché sono facilmente accessibili tramite procedure di liposuzione o liposuzione assistita. Le ADSC hanno dimostrato un potenziale significativo in una vasta gamma di applicazioni, inclusa la rigenerazione tissutale, l'ingegneria dei tessuti, la terapia cellulare e molte altre. Grazie alla loro capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari e al loro ruolo nel supportare la rigenerazione tissutale, le ADSC rappresentano una risorsa preziosa per la medicina rigenerativa e la ricerca biomedica. (*Gimble et al., 2007*).

## SCOPO DEL TRAPIANTO DI TESSUTO ADIPOSO

Il trapianto di tessuto adiposo è una procedura versatile che trova applicazione in vari ambiti medici, sia estetici che terapeutici. L'obiettivo principale del trapianto di tessuto adiposo varia in base alla specifica applicazione clinica e può includere la rigenerazione tissutale, il riempimento volumetrico, e la modulazione delle risposte immunitarie. Di seguito sono riportati gli scopi principali di tale procedura:

### 1. *Medicina rigenerativa:*

Le MSCs derivate dal tessuto adiposo hanno mostrato un notevole potenziale nella rigenerazione tissutale, grazie alla loro capacità di differenziarsi in vari tipi cellulari e promuovere la riparazione dei tessuti danneggiati (*Gimble & Guilak, 2003; Zuk et al., 2001*).

### 2. Riempimento volumetrico:

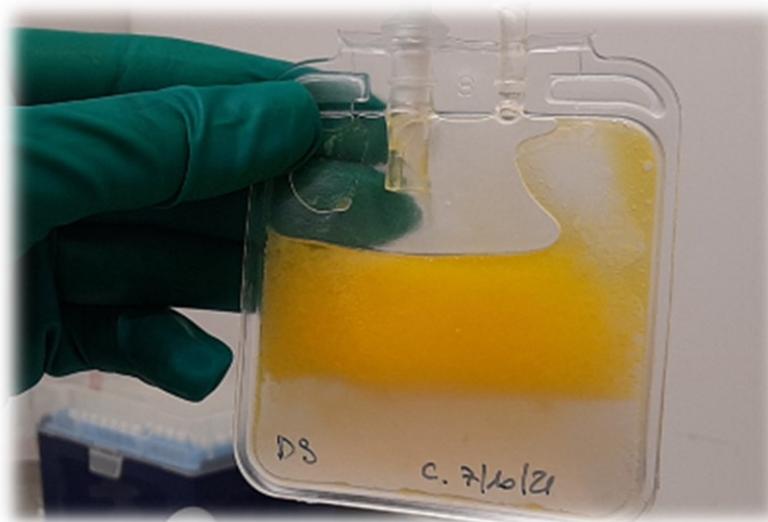
Il tessuto adiposo trapiantato viene ampiamente utilizzato per il riempimento volumetrico e la ricostruzione estetica, migliorando significativamente l'estetica e la simmetria dei tessuti (*Coleman, 2006; Yoshimura et al., 2008*).

### 3. Promozione della vascolarizzazione:

Le MSCs del tessuto adiposo sono in grado di stimolare l'angiogenesi, migliorando la circolazione nei tessuti danneggiati e accelerando i processi di guarigione (*Rehman et al., 2004; Cao et al., 2005*).

Il trapianto di tessuto adiposo rappresenta quindi una procedura multifunzionale con applicazioni che spaziano dalla medicina rigenerativa alla chirurgia estetica. Sebbene non tutte le applicazioni del trapianto di tessuto adiposo possano essere classificate come terapia cellulare, il potenziale rigenerativo e immunomodulante delle MSCs ne fa uno strumento prezioso in diversi contesti clinici. La comprensione approfondita degli scopi specifici del trapianto di tessuto adiposo è fondamentale per ottimizzare i risultati clinici e sviluppare nuove applicazioni terapeutiche.

Nella pratica che riguarda la produzione e l'impiego clinico attuale presso la *Ausl Romagna*, la quantità di tessuto adiposo stoccato presso la Banca Cute RER va dalle 5 alle 8 sacche da 5-7 mL ciascuna a paziente (*Fig. 6*). L'utilizzo del tessuto adiposo distribuito dalla Banca Cute RER è ad esclusivo uso autologo. Per le sue proprietà rigenerative, il tessuto adiposo trova ampia applicazione clinica nell'ambito della medicina rigenerativa e ricostruttiva quali ortopedia, chirurgia senologica, chirurgia plastica, dermatologia, chirurgia generale, vulnologia e otorinolaringoiatria. La Banca Cute RER processa, criocongela ed effettua attività di bancaggio del tessuto adiposo ad uso autologo con tecnologia brevettata *Lipobank*<sup>®</sup>. (<https://bancadellacute.auslromagna.it/it/tessuto-adiposo/il-tessuto-adiposo>).



**Figura 6.** Sacca di Tessuto Adiposo da circa 5 mL.

## BANCA CUTE REGIONALE EMILIA ROMAGNA (RER)

Una Banca dei Tessuti è un'unità operativa all'interno di ospedali pubblici o strutture sanitarie senza scopo di lucro, dove si eseguono processi di lavorazione, conservazione, stoccaggio e distribuzione di tessuti umani. Queste attività sono finalizzate a certificare che i tessuti siano idonei e sicuri per l'uso clinico nei trapianti (*Linee Guida CNT, 2016*).

Per garantire la qualità e la sicurezza delle attività svolte, le Banche dei Tessuti in Italia sono coordinate sia a livello regionale, tramite il *Centro Regionale Trapianti (CRT)* di riferimento, sia a livello nazionale, tramite il *Centro Nazionale Trapianti (CNT)*. Il CNT svolge ispezioni periodiche su ogni tipo di tessuto processato, conservato e distribuito dalle Banche dei Tessuti, per assicurare il rispetto dei criteri di qualità e sicurezza stabiliti dalle direttive europee e dalle normative nazionali. Inoltre, il CNT monitora trimestralmente le donazioni di ogni tipo di tessuto attraverso relazioni trimestrali fornite dalle Banche dei Tessuti. Queste relazioni devono includere informazioni dettagliate sulla quantità di tessuto processato e distribuito su scala nazionale, espressa in centimetri quadrati. I tessuti attualmente prelevati da donatori viventi o deceduti, che vengono poi processati, conservati e distribuiti dalle Banche dei Tessuti italiane includono: Tessuto muscolo-scheletrico, come cartilagini, tendini ed elementi ossei; Tessuto cardiovascolare, comprese arterie, vasi e valvole cardiache; Tessuto oculare, in particolare la cornea; Tessuto cutaneo; Tessuto placentare, come la membrana amniotica; Tessuto adiposo. Questi tessuti sono raccolti e trattati per garantire la loro idoneità e sicurezza per l'uso clinico e trapiantologico, seguendo rigorosi protocolli e regolamentazioni per assicurare la qualità dei materiali destinati ai pazienti. Ogni banca dei tessuti ha la flessibilità di sviluppare il proprio percorso per l'attività di approvvigionamento, lavorazione, conservazione e distribuzione dei tessuti trapiantabili, purché rispetti i requisiti e gli standard stabiliti dalle linee guida redatte dal *Centro Nazionale Trapianti (CNT)*. Queste linee guida forniscono un quadro normativo e regolatorio che le banche dei tessuti devono seguire per garantire la qualità e la sicurezza dei tessuti destinati ai pazienti. Pur avendo una certa autonomia nel definire i propri processi interni, le banche dei tessuti devono assicurarsi di conformarsi scrupolosamente alle disposizioni stabilite dal CNT al fine di garantire la

conformità normativa e la qualità dei servizi offerti. La Banca dei Tessuti deve stabilire chiaramente il proprio scopo e tenere un registro dettagliato delle attività svolte. Questo registro include informazioni sul tipo, sulla quantità e sulla qualità dei tessuti ricevuti, lavorati, stoccati e distribuiti, nonché sull'origine e sulla destinazione dei tessuti trapiantati. Tali dati sono essenziali per garantire la tracciabilità, la conformità normativa e la gestione efficace del processo di trapianto tessutale. La Banca dei Tessuti inoltre deve fornire al Centro di Trapianto la documentazione relativa al tessuto fornito. Tale documentazione è essenziale perché certifica la sicurezza e la qualità del tessuto e ne garantisce la rintracciabilità. Senza questa documentazione, non è consentito il trapianto del tessuto. (*DIRETTIVA 2004/23/CE; DIRETTIVA 2006/17/CE; D.Lgs. 6/11/07 n. 191; D.Lgs. 25/01/10 n.16; D.Lgs. 30/05/12 n.85; Linee Guida CNT, 2016*).

La Banca Cute RER, fondata con Decreto Ministeriale nel 1998, opera come una delle cinque Banche del tessuto cutaneo autorizzate dal Centro Nazionale Trapianti (CNT) e dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS). Affiliata alla U.O. Centro Grandi Ustionati dell'Ospedale "M. Bufalini" di Cesena – Azienda USL della Romagna –, la Banca Cute RER rappresenta il centro di eccellenza per la regione Emilia-Romagna (RER) nel reperimento, processazione e distribuzione di tessuto cutaneo. Attualmente, fornisce servizi a una popolazione di circa cinque milioni di abitanti e ha recentemente ampliato il suo ambito operativo introducendo nuovi percorsi relativi alla membrana amniotica e al tessuto adiposo. Inoltre, dal 2006, la Banca Cute RER è impegnata nella promozione dell'innovazione clinica nell'ambito della Medicina Rigenerativa e della Bioingegneria Tissutale. La Banca Cute RER conduce le sue attività di processazione dei tessuti all'interno della struttura altamente specializzata della *Cell Factory*. Quest'ultima è progettata e costruita secondo le normative delle *Good Manufacturing Practices (GMP)*, un insieme di linee guida rigorose che regolano la produzione e la manipolazione dei prodotti farmaceutici e biologici. I locali in cui avviene la lavorazione sono certificati secondo le norme GMP e le disposizioni delle norme ISO 14644-1 per le camere bianche, comunemente note come *Clean Rooms*. Dal punto di vista strutturale la Cell Factory è dotata al suo interno di 8 laboratori certificati secondo normativa Nazionale, Europea e GMP, suddivisi in :

5 laboratori GMP- classe D: per la lavorazione minima di cellule e tessuti

3 laboratori GMP- classe B: per la manipolazione estensiva di cellule e tessuti bioingegnerizzati

In Cell Factory si eseguono:

- Attività di lavorazione, conservazione, validazione e distribuzione a fine di trapianto di cellule staminali per autotrapianto in pazienti oncoematologici.
- Attività di lavorazione, conservazione, validazione e distribuzione, a fine di trapianto di Tessuto Cutaneo di donatore e Attività di Bioingegneria Tessutale e Cellulare.
- Attività di Ricerca clinica per la produzione di innovativi Tessuti Bioingegnerizzati e Terapie Cellulari salvavita per i pazienti del Centro Grandi Ustionati di Cesena.

( <https://bancadellacute.auslromagna.it/it/cell-factory> )

Questi ambienti sono dotati di cappe di grado A (*Fig. 7*), che consentono la manipolazione minima di cellule e tessuti in un ambiente controllato e sterile. Un elemento chiave per garantire l'assoluta sterilità è la presenza di filtri HEPA di alta qualità nel controsoffitto, che eliminano particelle e impurità dall'aria circolante. Inoltre, l'accesso a questi ambienti è rigidamente limitato al personale autorizzato e qualificato, che segue un rigoroso protocollo di vestizione conforme alle disposizioni del *D.Lgs 81 del 2008*. Questo protocollo prevede l'utilizzo di indumenti protettivi come camici, guanti, cuffie, mascherine e copri-scarpe. Tali misure di sicurezza e controllo garantiscono che le attività di processazione dei tessuti siano condotte in un ambiente controllato e sterile, riducendo al minimo il rischio di contaminazione e garantendo la sicurezza e la qualità dei tessuti destinati al trapianto.



**Figura 7.** Cappa di Grado A nella Clean Room.

Al fine di garantire la conservazione ottimale dei tessuti fino al momento della loro distribuzione per uso clinico, la Banca Cute RER dispone di locali dedicati al congelamento e allo stoccaggio dei tessuti. Accanto alla Cell Factory, è presente il settore di Criobiologia, un laboratorio dotato di avanzati sistemi tecnologici per il criocongelamento a discesa programmata di ogni singolo prodotto confezionato e sigillato in camera bianca. Nel laboratorio di Criobiologia, ogni tessuto è sottoposto a un processo di criocongelamento controllato, che consente di preservare la sua integrità strutturale e funzionale. Dopo il congelamento, i tessuti crioconservati sono sottoposti a rigorosi screening e analisi per garantirne la qualità e la sicurezza. Successivamente, i tessuti vengono trasferiti nella Sala Criogenica di stoccaggio (*Fig. 8*), dove sono conservati in criocontenitori appositamente progettati e riempiti di azoto liquido. Questi contenitori sono programmati per mantenere una temperatura costante di  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , garantendo la conservazione a lungo termine dei tessuti cutanei precedentemente manipolati e criocongelati. Tutte queste procedure sono conformi alla normativa vigente e mirano a garantire che i tessuti conservati mantengano la loro integrità e sicurezza fino al momento del loro utilizzo clinico.



*Figura 8. Sala Criogenica.*

## SISTEMA QUALITÀ ISO-GMP

Il Sistema di qualità in uso presso la Banca Cute RER fa riferimento al Manuale Organizzativo dell'Azienda USL di Cesena che descrive il Sistema di Gestione per la Qualità dell'Azienda in relazione alla Norma Internazionale ISO 9001:2000 e alla Delibera di Giunta Regionale di Autorizzazione e Accreditamento n.327 del 23/02/2004. La gestione della documentazione descrive responsabilità di redazione, verifica, approvazione, aggiornamento e distribuzione. La documentazione interna ed esterna della Banca è parte integrante di quella del Centro Grandi Ustionati, Struttura organizzativa di cui essa stessa fa parte. L'attività di produzione e gli standard attesi sono illustrati nel *documento SPS del Dipartimento di Emergenza*. Procedure e istruzioni operative descrivono tutte le fasi del processo, dell'attività di produzione, di quarantena, di stoccaggio, di distribuzione e di gestione degli eventi avversi. Le procedure operative standard (SOP) di Banca sono realizzate al fine della massima evidenza e rintracciabilità dell'attività svolta, oltre a rispondere alla necessità di documentare quanto richiesto per legge. Per facilitare la raccolta, la catalogazione, l'archiviazione, la conservazione, l'aggiornamento e l'eliminazione di questi documenti, è stata predisposta la tabella "Elenco registrazioni qualità", dove sono riportate tra le altre informazioni anche la sede e il tempo minimo di conservazione. Tali documenti costituiscono la premessa e il supporto per la verifica dell'efficacia del sistema e per la messa in atto di azioni correttive, preventive e di governo clinico. A garanzia degli standard qualitativi applicati, la Banca Cute ha ottenuto le seguenti certificazioni:

- Certificazione ISO 9001/2000 (organismo certificatore Bureu Veritas)
- Certificazione CNT 2005
- Certificazione CNT 2007
- Certificazione CNT 2010
- Certificazione CNT 2014
- Certificazione CNT 2018
- Certificazione CNT 2023

( <https://bancadellacute.auslromagna.it/it/assicurazione-qualita/sistema-qualita-iso-gmp> ).

## LA NORMATIVA DI RIFERIMENTO

La normativa di riferimento contiene direttive decreti e leggi in cui sono definite le Linee Guida per il prelievo e la processazione di tessuti a scopo di trapianto, nello specifico sono elencate:

- *DIRETTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 31 marzo 2004*

Definisce le norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

- *DIRETTIVA 2006/17/CE DELLA COMMISSIONE dell'8 febbraio 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio*

Riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani.

- *DIRETTIVA 2000/86/CE DELLA COMMISSIONE del 24 ottobre 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio*

Riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni avverse ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

- *DIRETTIVA 2012/39/UE DELLA COMMISSIONE del 26 novembre 2012 che modifica la direttiva 2006/17/CE*

Riguarda determinate prescrizioni tecniche relative agli esami effettuati su tessuti e cellule umani.

- *D.Lgs. 6/11/07 n. 191 Attuazione della direttiva 2004/23/CE*

Definisce le norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

- *D.Lgs. 25/01/10 n.16 Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE*

Riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

- *D.Lgs. 30/05/12 n.85 Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 25 gennaio 2010, n.16, recante attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE*

Riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

- *Legge 01/04/99 n.91*

Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti.

(<https://bancadellacute.auslromagna.it/it/assicurazione-qualita/normativa> ).

## IL VALIDATION MASTER PLAN

Come già evidenziato, la lavorazione dei materiali biologici presso la Banca Cute RER richiede una rigorosa conformità a numerosi protocolli legislativi. Questa conformità è supportata da un'analisi dettagliata dei rischi di produzione, documentata nel *Validation Masterplan*. Tale documento è redatto da personale specializzato e funge da piano organizzativo e attuativo, contenente le linee guida e le indicazioni fondamentali. Esso specifica lo scopo, le responsabilità e i contenuti delle operazioni di convalida relative alle apparecchiature, agli impianti, ai processi e alle procedure di pulizia (*EudraLex: Pharmaceutical Legislation. The Rules governing medicinal products in the European Union. Vol. 4: Good Manufacturing Practices for medicinal product for human and veterinary use. Annex 20 GMP: Quality Risk Management 2008:5-24*). La redazione di questo documento consente di effettuare un'analisi dei rischi, volta a identificare i sistemi critici per la qualità del prodotto e i test essenziali da eseguire durante la fase di qualificazione e convalida del laboratorio. Da questa analisi risulta che il principale rischio è rappresentato dalla contaminazione del prodotto, che può avere gravi ripercussioni sia per il paziente sia per l'intero sistema produttivo. Nella migliore delle ipotesi, tale contaminazione può comportare l'eliminazione del prodotto e la revisione del processo di manipolazione; nella peggiore delle ipotesi, può causare complicanze serie se il prodotto è già stato somministrato al paziente. La caratterizzazione dei prodotti biologici lavorati dalla Banca Cute RER, specialmente nel contesto del tessuto adiposo, risulta estremamente cruciale poiché, a differenza dei farmaci tradizionali, il principio attivo dei prodotti che coinvolgono il tessuto adiposo è costituito dalle cellule staminali mesenchimali presenti in tale tessuto, un materiale vivente. Questo implica una gestione dei rischi più complessa, che deve essere attentamente valutata e gestita durante tutto il processo di produzione e utilizzo. La Banca Cute RER ha sviluppato per ogni tipologia di tessuto procedure specifiche e convalidate relative al percorso di prelievo, processazione, conservazione, stoccaggio e distribuzione del tessuto a scopo clinico trapiantologico (*DIRETTIVA 2004/23/CE, DIRETTIVA 2006/17/CE, D.Lgs. 6/11/07 n. 191, D.Lgs. 25/01/10 n.16, D.Lgs. 30/05/12 n.85*).

## LA STERILITÀ

La sicurezza dei prodotti lavorati dalla Banca Cute RER riveste un'importanza fondamentale, con particolare riguardo alla garanzia di sterilità del materiale. Come sottolineato nel Validation Masterplan redatto, la verifica della sterilità rappresenta uno degli aspetti critici del processo di validazione. La sterilità, conformemente alla definizione della *Farmacopea Europea*, si configura come l'assenza di microrganismi vitali all'interno di un prodotto farmaceutico (*European Pharmacopoeia 6th Edition 2009 (online version). Par. 5.1.1. Methods of preparation of sterile products*). Per i prodotti destinati alla terapia cellulare, conformemente alle GMP, è essenziale garantire la sterilità del prodotto finito mediante la produzione in ambienti appositamente progettati per controllare la contaminazione. In ottemperanza a tali normative, la dimostrazione della sterilità del prodotto richiede la documentazione dell'assenza di batteri aerobi, anaerobi, funghi e micoplasma, nonché l'assenza di endotossine batteriche prodotte da batteri gram negativi.

In merito alla sicurezza e sterilità, nelle *Linee Guida per il prelievo, la processazione e la distribuzione dei tessuti a scopo di trapianto* è indicato che durante tutte le fasi di lavorazione e confezionamento si devono usare strumenti sterili, procedure asettiche e condizioni adeguate a evitare la contaminazione e la crescita di microrganismi e a mantenere la vitalità cellulare ove richiesto. Tutte le fasi di lavorazione devono essere effettuate in un ambiente microbiologicamente e climaticamente controllato. Le procedure di lavorazione critiche devono essere convalidate e non devono rendere i tessuti o le cellule clinicamente inefficaci o nocivi per il ricevente. La convalida può basarsi su studi eseguiti dalla Banca stessa, o su dati di studi pubblicati, o — per procedure di lavorazione pienamente consolidate — sulla valutazione retrospettiva dei risultati clinici relativi ai tessuti forniti dalla Banca. È necessario dimostrare che il procedimento di convalida può essere svolto in modo coerente ed efficace nell'ambito della Banca ad opera del suo personale. Qualora ai tessuti venga applicato un procedimento d'inattivazione microbica, questo deve essere specificato, documentato e convalidato (*Linee Guida CNT per i tessuti 2013*).

## IL TESSUTO ADIPOSO COME PRODOTTO TERAPEUTICO “BORDERLINE”

Il trapianto di organi, tessuti e cellule (sostanze biologiche di origine umana - Substances of Human Origin, SoHO) rappresenta una terapia ormai consolidata, che permette di curare efficacemente persone affette da gravi malattie per le quali non sono disponibili altre terapie e la cui qualità di vita può essere fortemente compromessa. Oltre ai trapianti cosiddetti “consolidati”, l’evoluzione tecnologica e le nuove conoscenze scientifiche, al fine di rispondere alla necessità di identificare “nuove” terapie per alcune patologie, hanno portato negli ultimi anni allo sviluppo di procedure trapiantologiche innovative o “sperimentali”. Le norme vigenti in ambito trapiantologico (*art. 16, comma 1, della legge 1° aprile 1999, n. 91, recante "Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e di tessuti"*) consentono questo tipo di attività e prevedono che protocolli sperimentali siano sottoposti all’approvazione del Centro Nazionale Trapianti (CNT), previa acquisizione del parere positivo da parte del Comitato Etico locale e del Consiglio Superiore di Sanità (CSS). Lo sviluppo di questi protocolli di trapianto innovativi, basati soprattutto sull’utilizzo di tessuti e cellule e finalizzati ad indurre la riparazione/sostituzione del tessuto danneggiato o a ripristinare le funzioni perdute, quali ad esempio l’utilizzo di cellule staminali derivate da midollo osseo o da tessuto adiposo per applicazioni in chirurgia ortopedica, vascolare, plastica etc., ha avuto un aumento quasi esponenziale con applicazioni diffuse a livello clinico, talvolta non del tutto in linea con le indicazioni previste dalle buone pratiche cliniche o con l’iter di approvazione sopra descritto, con potenziale impatto sulla sicurezza dei pazienti. La classificazione di nuovi prodotti è, talvolta, molto complessa sia per la tipologia di cellule e tessuti utilizzati sia perché, a volte, la classificazione richiede competenze trasversali ai settori del farmaco e dei dispositivi medici. Altre volte è difficile inquadrare correttamente il meccanismo d’azione del prodotto e la funzione particolare che svolge a causa della presenza di diverse componenti cellulari. Una guida per differenziare un trapianto da una terapia cellulare avanzata è da ricercare nel *Regolamento (CE) n. 1394/2007*, che stabilisce che cellule e tessuti siano considerati prodotti di terapia cellulare avanzata (TA) quando soggetti a rilevante manipolazione o utilizzati con differenti funzioni essenziali nel beneficiario e nel donatore (uso non omologo). Questa

distinzione non pone molti dubbi per quanto riguarda la tipologia di manipolazione (minima o estensiva), ma possono permanere dubbi sulla definizione dell'uso non omologo del prodotto, soprattutto nei casi in cui non è così evidente la differenza di funzione esercitata fisiologicamente nella sede di prelievo rispetto a quella esercitata nella sede di impianto o laddove, in presenza di un prodotto costituito da più di una popolazione cellulare, non sia chiaro quale sia la componente da cui dipende l'azione terapeutica ("prodotti borderline"). Per i motivi sopra riportati, il *Regolamento (CE) 1394/2007* ha previsto l'istituzione a livello europeo di un *Comitato per le Terapie Avanzate (denominato CAT - Comitato per le Terapie Avanzate)*, con competenze multidisciplinari. Obiettivo del CAT è rilasciare pareri non vincolanti per lo Stato membro, in ordine alla qualità, sicurezza, efficacia e alla classificazione del prodotto quale medicinale per terapia avanzata. Il CAT, in qualità di organo consultivo dell'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) nel documento "*Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products*" del 21 maggio 2015, riporta un algoritmo da applicare per definire quali procedure rientrino nell'ambito dei trapianti e quali nell'ambito delle terapie avanzate. La valutazione del livello di innovazione di un protocollo che prevede l'uso di prodotti di origine umana e quindi il suo inquadramento in un ambito sperimentale, si basa, oltre che su una verifica di dati presenti in letteratura, anche su un'analisi dei rischi a cui il ricevente può essere esposto. Infatti, la sperimentazione di un trattamento terapeutico a base di cellule e tessuti può essere dovuta a:

- a) utilizzo di un nuovo prodotto a base di cellule o di tessuti;
- b) nuova procedura di preparazione di un prodotto a base di cellule o di tessuti;
- c) nuova indicazione clinica.

Tutte e tre le condizioni sopra riportate, da sole o in combinazione tra loro, possono comportare rischi per il ricevente e, pertanto, è necessario che questi vengano identificati e che siano eventualmente introdotte misure che ne minimizzino l'impatto/rischio attraverso la definizione e la realizzazione di un protocollo clinico sperimentale. La metodologia e gli strumenti proposti per valutare l'impatto che l'introduzione di uno o più aspetti innovativi possono avere sulla sicurezza, qualità ed efficacia di terapie a base di tessuti e cellule, sono stati definiti nella guida *EUROGTP II (Good Practices for evaluating quality, safety and efficacy of novel tissue and cellular therapies and products* - <http://goodtissuepractices.eu/>), ([https://www.trapianti.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_cntPubblicazioni\\_570\\_allegato.pdf](https://www.trapianti.salute.gov.it/imgs/C_17_cntPubblicazioni_570_allegato.pdf)).

Il trapianto di tessuto adiposo è una procedura ben consolidata nella chirurgia estetica e ricostruttiva, utilizzata per migliorare l'aspetto di aree depresse, ricostruire tessuti danneggiati e migliorare il contorno corporeo (Coleman & Saboeiro, 2007; Rigotti et al., 2007). Tuttavia, quando il tessuto adiposo viene utilizzato per le sue cellule staminali mesenchimali in applicazioni più avanzate, queste pratiche possono essere considerate sperimentali (Gimble & Guilak, 2003; Yoshimura et al., 2008). Il trapianto di tessuto adiposo si colloca dunque in una zona di confine tra procedure consolidate e sperimentali. Sebbene sia ampiamente utilizzato e riconosciuto nel campo della chirurgia estetica, il suo impiego in terapie avanzate richiede ulteriori studi e approvazioni regolatorie. La classificazione e la valutazione di queste terapie sono cruciali per garantire la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti, proteggendo al contempo i pazienti (EMA, 2015; Ministero della Salute, 2019).

## IL PERCORSO DEL TESSUTO ADIPOSO: DAL PRELIEVO ALL'UTILIZZO

Il percorso del tessuto adiposo per il trapianto autologo è caratterizzato da una serie di passaggi critici e protocolli rigorosi, ciascuno dei quali è progettato per garantire la sicurezza e l'efficacia del trattamento (*Fig. 9*).

Il processo inizia con la programmazione dell'intervento di prelievo del tessuto adiposo: in questa fase viene stipulato un accordo tra medico, paziente e Lipobank. Il prelievo del tessuto adiposo avviene in una sala operatoria adeguatamente attrezzata all'interno dell'Ospedale Bufalini (in leggera sedazione e anestesia locale); il tessuto prelevato è raccolto in un sistema sterile e a circuito chiuso per mezzo di tecniche chirurgiche appropriate, come la liposuzione o il lipofilling, con la massima attenzione alla precisione e alla conservazione dell'integrità del tessuto. Ultimato il prelievo, il tessuto viene opportunamente conservato e identificato per essere trasportato in sicurezza presso la Banca Cute al fine di effettuare i successivi trattamenti previsti dalla procedura operativa. Il Tessuto Adiposo viene quindi processato presso la Banca Cute per mezzo di un dispositivo di separazione del tessuto prodotto dalla società Lipobank, Lipogems International SPA, che ne garantisce la preservazione dell'integrità e di tutte le sue caratteristiche morfologiche e vitali. Tale dispositivo è stato oggetto anche di uno studio ministeriale autorizzato dal *Consiglio Superiore di Sanità*, svolto presso l'IRCCS Rizzoli di Bologna, ed è stato valutato positivamente dal *Centro Nazionale Trapianti* per il trattamento dell'artrosi nelle articolazioni (*Ministero della Salute, Consiglio Superiore di Sanità. "Valutazione del dispositivo Lipobank per il trattamento dell'artrosi nelle articolazioni." Studio ministeriale condotto presso IRCCS Rizzoli di Bologna, autorizzato dal Consiglio Superiore di Sanità e valutato dal Centro Nazionale Trapianti, 2021*). Dal 2021, infatti, al termine della sperimentazione condotta presso gli *Istituti Ortopedici Rizzoli*, l'iniezione di tessuto adiposo nel ginocchio, prelevato e utilizzato dallo stesso paziente, è stata evidenziata come autotrapianto efficace per la terapia dell'artrosi riducendo il dolore, incrementando la mobilità dell'articolazione e ritardando o eliminando l'impiego della protesi artificiale. (*Istituti Ortopedici Rizzoli, "Knee Arthritis Treatment With Autologous Fragmented Adipose Tissue and PRP - Comparison of Two Treatment Methods", Clinical Trials.gov, 2021*). Le proprietà

terapeutiche di questo trattamento dipendono dalla capacità di stabilizzazione biologica del tessuto adiposo che, prolungandosi nel tempo, consente di sostituire il tessuto mancante nelle funzioni meccaniche e di riempimento senza indurre alcun effetto cicatriziale. Il tessuto iniettato svolge una funzione riparativa e anti-degenerativa (*De Girolamo et al., 2022*). Il tessuto viene quindi processato e raccolto attraverso un sistema a circuito chiuso, garantendo inoltre la massima sicurezza in termini di sterilità. Nella metodica di processazione è prevista l'aggiunta al tessuto adiposo di una soluzione di antibiotico opportuno e DMSO, prima delle successive fasi di congelamento e stoccaggio, queste sostanze vengono successivamente allontanate dal tessuto tramite ulteriore processazione. Il tessuto adiposo viene quindi ripartito e conservato in singole aliquote attraverso le metodiche di crioconservazione più innovative, consentendo così la conservazione del patrimonio terapeutico nel rispetto di specifici protocolli autorizzati (*Smith et al. 2021*). Prima di procedere con lo step di conservazione, il tessuto adiposo è sottoposto a una serie di test approfonditi per garantire la sterilità e la qualità del prodotto. I test di sterilità nello specifico sono eseguiti utilizzando metodologie avanzate, come i test *Biomérieux*, per identificare eventuali contaminazioni microbiologiche con elevata sensibilità e specificità. Parallelamente, vengono condotti controlli di qualità per valutare la vitalità, l'integrità e la purezza del tessuto, garantendo che questo soddisfi gli standard richiesti per l'autotrapianto (*Adams et al. 2019*). Attualmente, prima e dopo l'aggiunta delle soluzioni di antibiotico e liquido di congelamento vengono campionate aliquote di tessuto (prima e dopo la manipolazione, opportunamente identificate da un codice univoco di richiesta di esame specifico per microrganismi aerobi e anaerobi), al fine di condurre test di sterilità per il monitoraggio dell'intero processo. Il tessuto è suddiviso in singole aliquote e conservato in contenitori appositamente progettati, che consentono di mantenere l'integrità del tessuto durante lo stoccaggio. Dopo il campionamento ai fini dei test di sterilità e controllo di qualità, il tessuto adiposo processato viene quindi sottoposto a una discesa programmata della temperatura e infine trasportato presso la *Criobanca* per essere stoccato a mezzo di crioconservazione. Questa fase prevede la conservazione del tessuto a temperature estremamente basse, di circa -180 °C, garantendo la preservazione delle sue proprietà biologiche nel lungo termine. Al momento della richiesta, il tessuto adiposo viene sottoposto alla procedura di scongelamento e vengono condotti su questo gli esami di laboratorio necessari al fine di controlli di vitalità e sterilità. Tali test sono fondamentali per garantire l'efficacia e la sicurezza del trapianto di tessuto adiposo, il quale, dopo valutazione

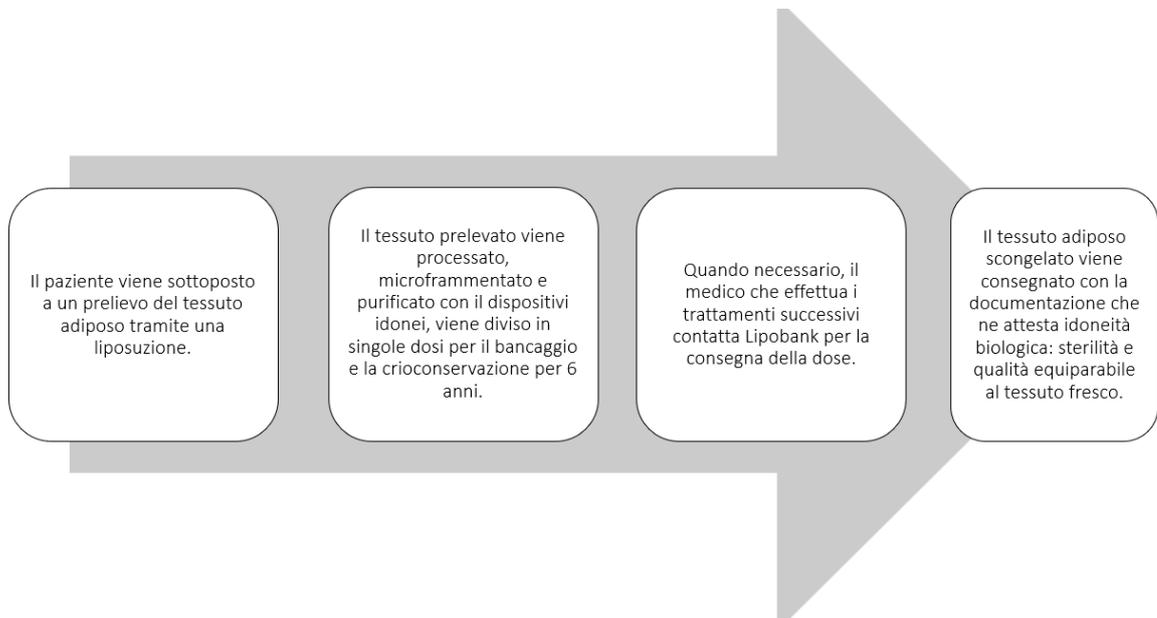
e validazione di tutti gli esami sarà pronto per essere inviato, corredato dalle opportune documentazioni, alla sede di destinazione prevista per scopo trapiantologico.

Il paziente viene sottoposto a un prelievo del tessuto adiposo tramite una liposuzione.

Il tessuto prelevato viene processato, microframmentato e purificato con il dispositivi idonei, viene diviso in singole dosi per il bancaggio e la crioconservazione per 6 anni.

Quando necessario, il medico che effettua i trattamenti successivi contatta Lipobank per la consegna della dose.

Il tessuto adiposo scongelato viene consegnato unitamente a tutta la documentazione che ne attesta idoneità biologica, e ciò in termini di qualità del tessuto e delle cellule ivi residenti a garanzia della totale sterilità cellulare e del mantenimento della architettura del microambiente tissutale equiparabile in tutte le sue caratteristiche al tessuto fresco.



**Figura 9.** Schema del Percorso dal prelievo all'utilizzo del Tessuto Adiposo.

## MATERIALI E METODI

### SISTEMA BACT/ALERT® 3D (Biomérieux)

Al fine di apportare un contributo all'implementazione dei protocolli di sterilità relativi alla gestione pratica del Tessuto Adiposo sono stati prodotti dati di confronto tecnico-pratico tra le differenti tipologie di flaconi offerti con il Sistema BACT/ALERT® 3D (Biomérieux) per il rilevamento microbico in terreno liquido arricchito.

### FLACONI BACTALERT BIOMÉRIEUX



Figura 10A

BPA (AEROBIC PLATELET CULTURE BOTTLES, tappo blu),

BPN (ANAEROBIC PLATELET, CULTURE BOTTLES, tappo rosa)



Figura 10B

SA (STANDARD AEROBIC, tappo blu),

SN (STANDARD ANAEROBIC, tappo rosa)



Figura 10C

FN (ANAEROBIC, tappo arancio)

FA (AEROBIC, tappo verde)

I flaconi BactAlert di Biomérieux sono costruiti in materiale plastico, dotati di un tappo di sicurezza e distinti da vari colori a seconda della loro tipologia (Fig. 10 A-C). L'utilizzo della plastica per la realizzazione di questi flaconi è significativo per la rilevazione dei contaminanti microbici, poiché diversi studi hanno dimostrato una maggiore efficacia dei flaconi in plastica rispetto a quelli in vetro nel recupero e nell'analisi dei contaminanti microbici presenti nei campioni inoculati (Riley *et al.*, 2005; Brecher *et al.*, 2004).

Ogni flacone contiene una quantità standard di terreno di coltura ed un dischetto di rilevazione gas-sensibile di colore blu-grigio posto sul fondo. Tale dischetto è sensibile alle

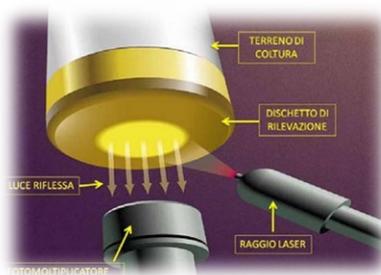
variazioni di pH che vengono generate quando i microrganismi presenti all' interno di un flacone consumano i substrati producendo anidride carbonica. L'anidride carbonica, in soluzione acquosa, forma acido carbonico ( $H_2CO_3$ ) che, dissociandosi in bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) e ioni idrogeno ( $H^+$ ), causa un abbassamento del pH in soluzione e il viraggio del colore del dischetto verso il giallo (*Thorpe et al., 1990*). I flaconi per la rilevazione di microrganismi aerobi (*BPA* e *SA*) contengono 40 mL di terreno standard la cui formulazione consiste in: digerito pancreatico di caseina (noto anche come triptone ovvero catene amminoacidiche unite a lipidi), digerito papaiico di farina di soia (o fitone), vitamina B6, substrati di carboidrati ed aminoacidi complessi disciolti in acqua e l'anticoagulante sodio polianetolsulfonato (SPS). Questa tipologia di flaconi viene preparata con un'atmosfera di  $CO_2$  ed ossigeno in modo tale da riprodurre le condizioni migliori per la crescita microbica aerobia. I flaconi per la rilevazione di microrganismi aerobi ed anaerobi in campioni di aferesi piastrinica o concentrati piastrinici (rispettivamente *BPA* e *BPN*, *Fig. 10A*) presentano la stessa composizione dei flaconi *SA* ed *SN* (*Fig. 10B*) con l'aggiunta di un composto lisante i leucociti. I Leucociti sono cellule del sistema immunitario che possono permanere all'interno dei campioni di aferesi piastrinica, pool piastrinici o piastrine da singola unità dopo la procedura di separazione e che possono falsare la rilevazione dei microrganismi. I flaconi per la rilevazione di microrganismi anaerobi (*BPN* ed *SN*) contengono sempre 40 mL di terreno di analoga composizione dei flaconi aerobi con un'aggiunta di estratto di lievito, menadione (precursore della vitamina K), acido piruvico ed agar sangue liquido. Rispetto ai flaconi aerobi, vengono preparati con un'atmosfera di  $CO_2$  in azoto sottovuoto al fine di riprodurre le condizioni di anaerobiosi ottimali. Infine, i flaconi per la rilevazione di microrganismi aerobi ed anaerobi in campioni liquidi contenenti antibiotici (*FA* ed *FN*, *Fig. 10C*) contengono 32 mL di terreno con composizione analoga agli altri flaconi con arricchimento di infuso cuore-cervello BHI + 8 mL di carbone attivato disciolto, con la funzione di neutralizzare gli antibiotici presenti nel campione. Tali flaconi, rispetto ai corrispondenti *SA* ed *SN*, risultano più efficaci nel rilevare la contaminazione microbica in campioni contenenti antibiotici, ad esempio campioni provenienti da pazienti con batteremia o fungemia e sottoposti a trattamento antibiotico (*Mirrett et al., 2004*).

## IL SISTEMA BACTALERT 3D ®



**Figura 11.** Sistema BactAlert 3D.

Il sistema strumentale (Fig. 11) è composto da un modulo di gestione video, un software di elaborazione dati e da un modulo di incubazione, ovvero un vero e proprio incubatore capace di contenere fino a 60 flaconi alla temperatura di circa 36 °C (+/-1). Il funzionamento del sistema *BactAlert* (Fig. 12) si basa su una tecnologia colorimetrica: i dischetti posti sul fondo di ogni flacone vengono illuminati da un apposito laser, a questo punto la luce riflessa viene inoltrata ad un fotomoltiplicatore, che infine trasmette il segnale al software centrale. Il *BactAlert 3D*® misura costantemente la luce riflessa ogni 10 min, rilevando e registrando i cambiamenti di colore del dischetto.



**Figura 12.** Schema del funzionamento del sistema BactAlert (<https://www.biomerieux.it>).

In caso di rilevamento di crescita microbica, lo strumento notifica immediatamente la presenza di crescita microbica attraverso allarmi visivi e sonori (Fig. 13).



Figura 13. Allarme visivo di flaconi positivi: i numeri corrispondenti ai flaconi positizzati sono illuminati in verde.

Una peculiarità addizionale dello strumento è rappresentata dalla possibilità di visualizzare in tempo reale la curva di crescita microbica e dalla possibilità di stampare sottoforma di referti, i dati ottenuti (Fig. 14A , 14B).

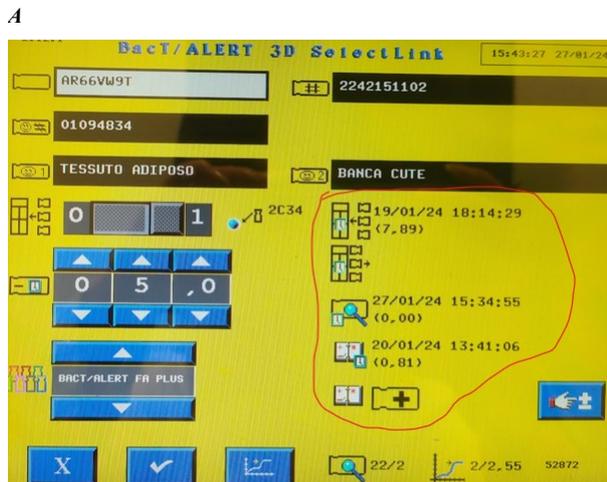


Figura 14A. Schermata video BactAlert 3D: vengono illustrati i dati del campione e del flacone in analisi, data e ora di caricamento, consultazione e positivizzazione.

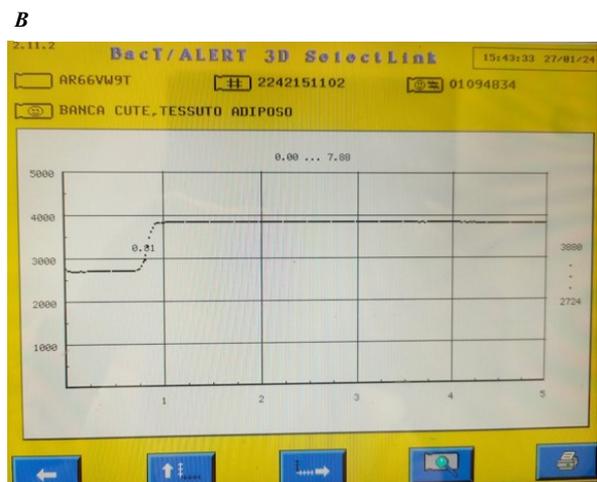


Figura 10B. Schermata video BactAlert 3D: è illustrata in tempo reale la curva di crescita microbica.

## TEST DI FERTILITA'

Il primo obiettivo di questo studio con l'utilizzo dello strumento *BactAlert 3D*<sup>®</sup> è stato quello di verificare la crescita microbica di vari ceppi batterici e fungini e in questo contesto operare un confronto tra i flaconi di diversa tipologia, con particolare attenzione alle tempistiche di rilevazione, dimostrando inoltre l'attendibilità delle rilevazioni per il lotto in analisi. Per questo scopo, sono stati utilizzati flaconi del medesimo lotto e campioni con una concentrazione nota compresa tra 10 e 100 *Unità Formanti Colonia (UFC)*. (*European Pharmacopoeia 6<sup>th</sup> Edition 2009. Par. 2.6 Biological tests: 145-149*). Ogni microrganismo disponibile sottoforma di ceppo liofilizzato è stato reidratato all'interno dell'apposito terreno di coltura liquido e successivamente seminato sul terreno di coltura solido appropriato.

Nello specifico a tale scopo sono state utilizzate:

- Piastre Petri Columbia Agar Sangue (COS) (*Fig. 15A*) per microrganismi aerobi (*Biomérieux*)
- Piastre Petri Sabouraud Agar Dextrose (SDA) (*Fig. 15B*) per i lieviti ed i miceti (*Biomérieux*)



**Figura 15A.** Piastre Petri Columbia Agar Sangue (COS).



**Figura 15B.** Piastre Petri Sabouraud Agar Dextrose (SDA).

I microrganismi testati, sulla base della disponibilità e delle indicazioni fornite dalla Farmacopea sono:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) (*Biomérieux- Biogenetics- Biolife*)

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Biomèrieux- Biogenetics- Biolife)
- *Candida albicans* (ATCC 14053) (Biomèrieux- Biogenetics- Biolife)
- *Aspergillus Niger* (ATCC® 6275™) (Biomèrieux- Biogenetics- Biolife)

I flaconi BactAlert utilizzati nello specifico per i test di rilevazione dei contaminanti microbici a concentrazione nota sono stati:

- *BPA* (Aerobic Platelet culture Bottles) (Biomèrieux)
- *BPN* (Anaerobic Platelet culture bottles) (Biomèrieux)
- *SA* (Standard Aerobic) (Biomèrieux)
- *FA Plus*
- *FN Plus*

Le caratteristiche di contenuto e utilizzo dei flaconi in elenco sono state esposte nel dettaglio nel primo paragrafo (*FLACONI BACTALERT BIOMÉRIEUX*) di questo capitolo.

Le piastre seminate con i microrganismi batterici sono state incubate a  $35 \pm 2.5$  °C per 24 ore, mentre le piastre seminate con i lieviti ed i miceti sono state incubate a  $30 \pm 2.5$  °C per 48 ore. Alla fine del periodo di incubazione, per ogni microrganismo è stata allestita una sospensione microbica in 3 mL di soluzione fisiologica al fine di misurare la torbidità in scala *McFarland*.

**Tabella 1 Standard McFarland e densità cellulare per mL**

| McFarland Standard | Densità (cellule/ml) / Density (cells/ml) |
|--------------------|-------------------------------------------|
| 0.5                | $1.5 \times 10^8$                         |
| 1.0                | $3.0 \times 10^8$                         |
| 2.0                | $6.0 \times 10^8$                         |
| 3.0                | $9.0 \times 10^8$                         |
| 4.0                | $12.0 \times 10^8$                        |

([http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/McFARLAND\\_STANDARD.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/McFARLAND_STANDARD.pdf)).

**Tabella 2 Standard McFarland e conta batterica approssimativa**

| Standard McFarland                                    | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 4.0 |
|-------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Conta batterica approssimativa ( $\times 10^8$ cell.) | 1.5 | 3.0 | 6   | 9   | 12  |

(<https://gest.joyadv.it/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche/italiano/ST-17SD2303.pdf>)

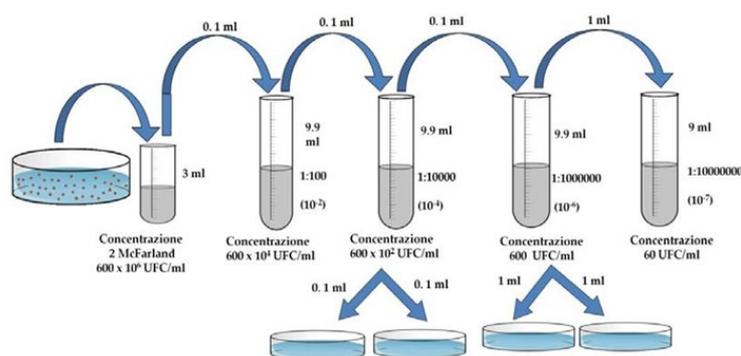
Per ottenere la concentrazione desiderata, 2 *McFarland*, corrispondente a  $6.0 \times 10^8$  UFC per millilitro sono state prelevate singole colonie dalla piastra di coltura utilizzando un tampone monouso sterile. La torbidità della soluzione è stata misurata con il rilevatore di densità Vitek DensiCHEK (Biomérieux). Dalla sospensione corrispondente a  $6.0 \times 10^8$  UFC per millilitro sono state poi allestite diluizioni scalari su base dieci (*Fig. 16*) per ottenere le concentrazioni microbiche volute, il procedimento è stato il seguente:

- A. Prima diluizione effettuata. È stato aliquotato un volume di 0.1 mL della soluzione madre  $600 \times 10^6$  UFC/ml, in 9.9 mL di Acqua Peptonata Sterile. La diluizione finale ottenuta era quindi pari a 1:100 ( $10^{-2}$ ), la cui concentrazione microbica stimata era di  $600 \times 10^4$  UFC/mL.
- B. Seconda diluizione effettuata. Un volume di 0.1 mL della diluizione al punto A ( $10^{-2}$ ) è stato aggiunto in 9.9 mL di Acqua Peptonata sterile. A questo punto la diluizione finale aveva un coefficiente di 1:10.000 ( $10^{-4}$ ) e la concentrazione microbica media era di  $600 \times 10^2$  UFC/mL.
- C. Dalla soluzione al punto B è stata eseguita un'ulteriore diluizione 1:100, aliquotando un volume di 0.1 mL di questa diluizione ( $10^{-4}$ ), in 9.9 mL di Acqua Peptonata Sterile. Il coefficiente di diluizione finale era di 1:1.000.000 ( $10^{-6}$ ) e la concentrazione microbica stimata era di 600 UFC/mL.
- D. L'ultima diluizione con coefficiente 1:10 è stata realizzata addizionando un volume di 1 mL della soluzione al punto C ( $10^{-6}$ ), in 9 mL di Acqua Peptonata Sterile. Quindi, il coefficiente di diluizione ottenuto era di 1: 10.000.000 ( $10^{-7}$ ), corrispondente ad una concentrazione microbica media pari a 60 UFC.

In ogni step di diluizione, la soluzione è stata agitata con vigore per 2 min con il Vortex per garantirne una corretta omogeneizzazione.

Compiuti gli allestimenti delle diluizioni, sono stati seminati in doppio, sui terreni di coltura più idonei, 0.1 mL della diluizione 1:10.000 ( $10^{-4}$ ) e 1 mL della diluizione 1:1.000.000 ( $10^{-6}$ ), allo scopo di saggiare la concentrazione microbica effettiva presente all'interno delle stesse. Le piastre seminate in questo modo sono state incubate nelle condizioni precedentemente descritte, mentre le diluizioni dei microrganismi sono state conservate in frigorifero a +4 °C in modo da rendere statica la presenza batterica. Terminato il periodo di incubazione, è stata verificata la concentrazione di ogni diluizione grazie alla conta delle colonie cresciute su ciascuna piastra seminata.

È stato svolto il calcolo della media delle *Unità Formanti Colonia (UFC)*, per ogni coppia di piastre seminate con lo stesso microrganismo e alla stessa diluizione. A partire da questo risultato, è stato calcolato il volume da prelevare per ottenere una concentrazione nota di circa  $1(+/-10)$  UFC e  $50(+/-10)$  UFC per i test di sensibilità, specificità, riproducibilità e fertilità. Per svolgere questo calcolo è stata utilizzata la seguente proporzione: “*numero colonie medie : volume (mL) seminato = concentrazione desiderata (1 o 50 UFC) : X*”. Occasionalmente, si è reso necessario procedere con la preparazione di un’ulteriore diluizione ( $10^{-8}$ ), effettuando una diluizione 1:100 dalla soluzione  $10^{-6}$ , oppure una diluizione 1:10 dalla soluzione  $10^{-7}$  secondo le metodiche precedentemente illustrate.



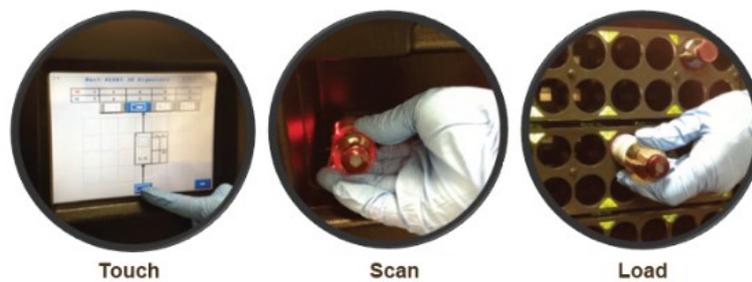
**Figura 16.** Rappresentazione schematica delle diluizioni.

L’inoculo delle sospensioni microbiche all’interno dei flaconi *BactAlert* è avvenuto per mezzo di una siringa sterile da 1 mL, bucando con l’ago il tappo sigillato. Per garantire la qualità degli inoculi un elemento essenziale è operare in condizioni di massima sterilità, ovvero utilizzando guanti sterili ed effettuando gli inoculi sotto cappa a flusso laminare (Fig. 17).



**Figura 17.** Allestimento del materiale sotto cappa a flusso laminare, usando guanti sterili.

I flaconi inoculati sono stati identificati da un'apposita etichettatura e inseriti all'interno del BactAlert 3D<sup>®</sup> grazie ad un sistema di riconoscimento basato sulla presenza di un codice a barre specifico per ciascuna tipologia di flacone (Fig. 18).



**Figura 18.** Schema del caricamento dei flaconi nel sistema BactAlert.  
(<https://www.biomerieux.it/prodotto/sistemi-bactalertr-3d-il-rilevamento-microbico>)

#### ANALISI DEI FLACONI POSITIVI MEDIANTE VITEK<sup>®</sup> MS PRIME

Ogni flacone risultato positivo, dopo coltura batterica, è stato sottoposto all'identificazione del contaminante microbico inoculato mediante lo strumento VITEK<sup>®</sup> MS PRIME (Fig. 19) (Biomérieux).



**Figura 19.** VITEK MS PRIME.



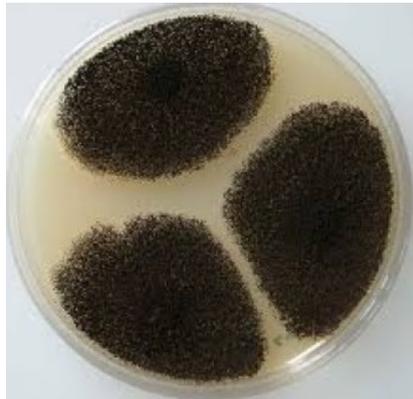
**Figura 20.** Ingresso della Piastra MALDI-TOF contenente all'interno dei pozzetti per le colonie da analizzare.

Questa tecnologia rappresenta un sistema avanzato di identificazione microbica che utilizza la tecnologia MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) per fornire identificazioni rapide e precise dei microrganismi. Per l'identificazione dei campioni, una singola colonia di microrganismo viene prelevata dalla piastra di coltura, precedentemente opportunamente allestita e incubata a partire dal flacone positivo, utilizzando un'ansa sterile monouso. La colonia a questo punto viene applicata su una piastra target MALDI-TOF specifica (Fig. 20). Sulla colonia viene applicata una matrice chimica, la quale aiuta a ionizzare le proteine durante l'analisi. Una volta inserita nel sistema, un laser colpisce il campione causando desorbimento e ionizzazione delle proteine. Gli ioni vengono accelerati e viaggiano attraverso un tubo di volo. Il tempo impiegato dagli ioni per raggiungere il rivelatore (tempo di volo) dipende dalla loro massa e carica, generando uno spettro di massa unico per il campione. Il sistema identifica il microrganismo confrontando il profilo proteico del campione con quelli presenti nel database.

#### IDENTIFICAZIONE DI *ASPERGILLUS NIGER*

I flaconi contenenti *Aspergillus niger*, una volta rilevata la positività tramite tecnologia *BactAlert*, sono stati riseminati nelle condizioni descritte in precedenza e le piastre di semina sono state incubate per 48-72 ore a  $30 \pm 2.5$  °C. Al termine del periodo di incubazione, quando

le colonie hanno raggiunto una dimensione significativa per l'identificazione (Fig. 21), è stata fatta una prima valutazione basata sull'osservazione macroscopica delle colonie cresciute, dato il loro tipico aspetto, successivamente è stato allestito il vetrino per l'identificazione al microscopio ottico e l'osservazione del vetrino è avvenuta con ingrandimento a 40x.



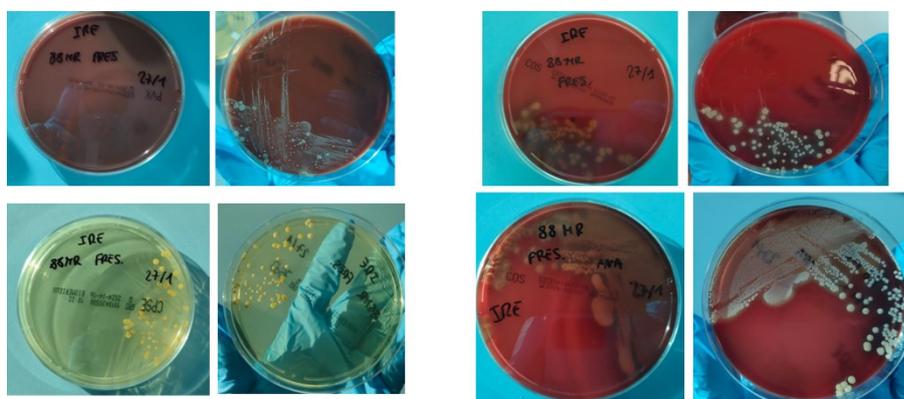
**Figura 21.** Colonie di *Aspergillus niger* su Piastra Petri Agar Sabouraud.

#### UTILIZZO PRATICO DEL SISTEMA *BACTALERT3D*® PER L'ANALISI SU TESSUTO ADIPOSO

Il BactAlert 3D permette di svolgere il test di sterilità su Tessuto Adiposo in conformità alle normative vigenti in materia di prodotti cellulari ed emocomponenti (*European Pharmacopoeia 6th Edition 2009. Par. 2.6.27 Microbiological Control of Cellular Products: 4414-4415*). Il prelievo dei campioni da inoculare nei flaconi BactAlert viene effettuato sotto cappa a flusso laminare, adottando tutti i criteri di manipolazione asettica per evitare la contaminazione. I campioni di tessuto adiposo sottoposti al controllo microbiologico presi in considerazione in questo lavoro sono stati:

- *Tessuto "fresco"*: un'aliquota di tessuto viene campionata appena dopo la procedura di prelievo avvenuta in sede chirurgica, prima dell'esecuzione di ogni procedura di manipolazione.
- *Tessuto "post lavorazione"*: tale tessuto viene campionato al termine della manipolazione asettica da parte degli operatori. Questa manipolazione include l'aggiunta di soluzioni specifiche di antibiotico e liquido di congelamento in accordo con i protocolli di riferimento, per mezzo di specifici kit e reattivi (forniti da *Lipobank*).
- *Tessuto scongelato*: al termine delle procedure di stoccaggio, prima del rilascio.

Al termine del periodo di incubazione all'interno dello strumento *BactAlert3D*, in base all'esito del test di sterilità, si procede secondo due modalità differenti: se il test risulta *NEGATIVO* per entrambi i flaconi inoculati si referta il risultato in accordo con l'apposito protocollo; nel caso in cui il test risulti *POSITIVO* (si considera positivo l'intero test anche se un solo flacone del set aerobio anaerobio risulta positivo) si procede con l'applicazione del protocollo di laboratorio che prevede l'identificazione dei germi attraverso semina su "batteria di piastre" opportuna (Fig. 22). Tale batteria di piastre è composta nello specifico di terreni quali *Agar cioccolato (PVX)*, *Agar Sangue (COS)*, *Agar CPSE Cromogeno*, se il flacone positivizzato nel sistema *BactAlert* è *BPA, SA o FA* (sospetto di microrganismi aerobi), se il flacone positivizzato è invece *BPN, SN o FN* (si sospettano microrganismi anaerobi) è prevista la semina di un'ulteriore Piastra *Agar Sangue (COS)* destinata all'incubazione in condizioni di anaerobiosi. Nello specifico, per l'incubazione delle Piastre in condizioni di anaerobiosi, le piastre vengono riposte all'interno di giare con apposite buste dette "GENBox Anaer" che garantiscono condizioni ottimali per la crescita di microrganismi anaerobi all'interno dell'incubatore, alla temperatura di 37 °C.



**Figura 22.** È illustrato un esempio di batteria di piastre Petri utilizzate per la semina di flaconi anaerobi risultati positivi alla rilevazione con sistema *BactAlert*: osserviamo in alto a sinistra *Agar Cioccolato (PVX)*, a destra un terreno *Agar Sangue* seminato in condizioni di aerobiosi; in basso sono rappresentati *CPSE* (terreno *Agarizzato Cromogeno*) e si ripete il tipo *Agar Sangue*, che in tale ultimo caso è stato però sottoposto a incubazione in condizioni di *Anaerobiosi*.

Successivamente al periodo di incubazione (24 h) si procede all'identificazione per mezzo del sistema *VITEK® MS PRIME* con le metodiche descritte in precedenza nel paragrafo dedicato.

Al fine di produrre dati di confronto per le analisi di sterilità sui differenti campioni di Tessuto adiposo, sono state inoculate diverse tipologie di set di flaconi, in parallelo, in base alla disponibilità: *BPA e BPN, FA e FN, SA* (descritti in dettaglio nei paragrafi precedenti di questo capitolo). Tali set di flaconi sono stati inoculati con lo stesso campione, nello stesso arco temporale, incubati nello stesso momento e sullo stesso strumento (*BactAlert 3D*). I risultati delle prove sono stati razionalizzati e i tempi di relativa crescita di microrganismi per i flaconi positivizzati sono stati comparati. Per le prove di questo studio sono stati analizzati un totale di 20 campioni di Tessuto Adiposo, ciascuno analizzato in due diversi momenti e condizioni: prima *a fresco* e successivamente *dopo lavorazione*, step descritto nella sezione dedicata "*il percorso del tessuto adiposo: dal prelievo all'utilizzo*" che ricordiamo essere caratterizzato da un passaggio che include l'esposizione ad antibiotici. Per questo test sono stati impiegati un totale di 200 flaconi: 40 *BPA*, 40 *BPN*, 40 *FA*, 40 *FN*, 40 *SA*.

## RISULTATI

### TEST DI FERTILITA'

La verifica di crescita microbica dei vari ceppi batterici e fungini, attraverso l'utilizzo dello strumento BactAlert 3D®, ha permesso di dimostrare l'attendibilità delle rilevazioni eseguite per tutti i lotti dei flaconi impiegati nelle analisi condotte.

Tutti i dati ottenuti per i 40 flaconi esaminati per il Test di Fertilità rientrano infatti negli standard di performance indicati dalla ditta produttrice (<https://www.biomerieux.it/prodotto/brodi-di-coltura-bactalert>) e sono inoltre conformi ai risultati attesi sulla base delle caratteristiche note di crescita e aerotolleranza delle specie in esame.

È stato imbastito inoltre un controllo negativo, costituito da un flacone vergine rappresentativo per ciascun singolo lotto utilizzato (*SA, BPA, BPN, FA, FN*), incubato per la durata di 7 giorni all'interno del BactAlert. Tutti i flaconi sottoposti a tale controllo sono risultati sterili, dato che dimostra una corretta modalità di conservazione e stoccaggio dei lotti in uso durante le prove a garanzia della sterilità.

Come riportato nel paragrafo *Sistema BACT/ALERT® 3D (Biomérieux)*, i flaconi sono stati sottoposti a lettura automatizzata della positività mediante il sistema *BACT/ALERT® 3D (Biomérieux)*. Al termine del periodo di incubazione di 7 giorni, i flaconi sono stati rimossi dall'incubatore e la positività è stata osservata ad occhio nudo nei giorni successivi (fino a 10 giorni), tramite il cambiamento di colore del dischetto di rilevazione posto sul fondo del flacone (da grigio a giallo).

I risultati delle prove di fertilità sono riassunti nelle tabelle seguenti (*Tab. 3,4,5,6,7*), nelle quali sono in particolare indicati:

- Microrganismo ATCC impiegato per il saggio (*Staphylococcus aureus ATCC 29213, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Candida albicans ATCC 14053, Aspergillus niger ATCC 6275*).
- Diluizione finale del microrganismo nell'inoculo ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ )
- Tipologia di flacone sottoposto al test (*FA, FN, BPA, BPN, SA*)

- L'eventuale crescita microbica rilevata nel campione, espressa come "POS" ("Positivo" entro 7 giorni di incubazione) oppure "NEG" ("Negativo" fino al 7° giorno di incubazione nel BactAlert).
- Tempi di rilevazione strumentale di positività, espressi in ore: nel caso di flaconi non positivizzati entro i 7 giorni si è scelto di esprimere un valore temporale > 168 ore. La tempistica dei 7 giorni è stabilita dal protocollo di validazione in accordo con la Farmacopea (*European Pharmacopoeia, 6th Edition 2009. Par. 2.6.27 Microbiological Control of Cellular Products: 4414-441*).

**Tabella 3: Test di fertilità su flaconi SA (flacone che favorisce la crescita di microorganismi aerobi, non presenti inibitori di farmaci).**

| Microrganismo<br>ATCC                | Diluizione finale | Crescita (POS/NEG)        | Tempo impiegato per la<br>rilevazione di positività<br>(ore) |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                      |                   | Tipologia flacone :<br>SA |                                                              |
| Staphylococcus aureus<br>ATCC 29213  | 10 <sup>-6</sup>  | POS                       | 24                                                           |
|                                      | 10 <sup>-7</sup>  | POS                       | 24                                                           |
| Pseudomonas aeruginosa<br>ATCC 27853 | 10 <sup>-6</sup>  | POS                       | 24                                                           |
|                                      | 10 <sup>-7</sup>  | POS                       | 36                                                           |
| Candida albicans<br>ATCC 14053       | 10 <sup>-4</sup>  | POS                       | 24                                                           |
|                                      | 10 <sup>-5</sup>  | POS                       | 24                                                           |
| Aspergillus niger<br>ATCC 6275       | 10 <sup>-4</sup>  | POS                       | 48                                                           |
|                                      | 10 <sup>-6</sup>  | POS                       | 52                                                           |

**Tabella 4. Test di fertilità su flacone FA (Flacone che favorisce la crescita di microorganismi aerobi, presenti inibitori di farmaci).**

| Microrganismo<br>ATCC                       | Diluizione finale | Crescita (POS/NEG)     | Tempo impiegato per la<br>rilevazione di positività<br>(ore) |
|---------------------------------------------|-------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                             |                   | Tipologia flacone : FA |                                                              |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 29213  | 10 <sup>-6</sup>  | POS                    | 24                                                           |
|                                             | 10 <sup>-7</sup>  | POS                    | 24                                                           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 10 <sup>-6</sup>  | POS                    | 36                                                           |
|                                             | 10 <sup>-7</sup>  | POS                    | 48                                                           |
| <i>Candida albicans</i><br>ATCC 14053       | 10 <sup>-4</sup>  | POS                    | 72                                                           |
|                                             | 10 <sup>-5</sup>  | POS                    | 84                                                           |
| <i>Aspergillus niger</i><br>ATCC 6275       | 10 <sup>-4</sup>  | POS                    | 48                                                           |
|                                             | 10 <sup>-6</sup>  | POS                    | 56                                                           |

**Tabella 5. Test di fertilità su flacone BPA (Flacone che favorisce la crescita di microorganismi aerobi, non presenti inibitori di farmaci).**

| Microrganismo<br>ATCC                       | Diluizione finale | Crescita (POS/NEG)         | Tempo impiegato per la<br>rilevazione di positività<br>(ore) |
|---------------------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                             |                   | Tipologia flacone :<br>BPA |                                                              |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 29213  | 10 <sup>-6</sup>  | POS                        | 24                                                           |
|                                             | 10 <sup>-7</sup>  | POS                        | 24                                                           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | 10 <sup>-6</sup>  | POS                        | 30                                                           |
|                                             | 10 <sup>-7</sup>  | POS                        | 36                                                           |
| <i>Candida albicans</i><br>ATCC 14053       | 10 <sup>-4</sup>  | POS                        | 48                                                           |
|                                             | 10 <sup>-5</sup>  | POS                        | 54                                                           |
| <i>Aspergillus niger</i><br>ATCC 6275       | 10 <sup>-4</sup>  | POS                        | 56                                                           |
|                                             | 10 <sup>-6</sup>  | POS                        | 72                                                           |

**Tabella 6. Test di fertilità su flacone FN (Flacone che favorisce la crescita di microorganismi anaerobi, presenti inibitori di farmaci).**

| Microorganismo<br>ATCC               | Diluizione finale | Crescita (POS/NEG)       | Tempo per la rilevazione<br>di positività<br>(ore) |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
|                                      |                   | Tipologia flacone:<br>FN |                                                    |
| Staphylococcus aureus<br>ATCC 29213  | 10 <sup>-6</sup>  | POS                      | 24                                                 |
|                                      | 10 <sup>-7</sup>  | NEG                      | >168                                               |
| Pseudomonas aeruginosa<br>ATCC 27853 | 10 <sup>-6</sup>  | POS                      | 48                                                 |
|                                      | 10 <sup>-7</sup>  | NEG                      | >168                                               |
| Candida albicans<br>ATCC 14053       | 10 <sup>-4</sup>  | NEG                      | >168                                               |
|                                      | 10 <sup>-5</sup>  | NEG                      | >168                                               |
| Aspergillus niger<br>ATCC 6275       | 10 <sup>-4</sup>  | NEG                      | >168                                               |
|                                      | 10 <sup>-6</sup>  | NEG                      | >168                                               |

**Tabella 7. Test di fertilità su flacone BPN (Flacone che favorisce la crescita di microorganismi anaerobi, non presenti inibitori di farmaci).**

| Microorganismo<br>ATCC               | Diluizione finale | Crescita (POS/NEG)         | Tempo impiegato per la<br>rilevazione di positività<br>(ore) |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                                      |                   | Tipologia flacone :<br>BPN |                                                              |
| Staphylococcus aureus<br>ATCC 29213  | 10 <sup>-6</sup>  | POS                        | 24                                                           |
|                                      | 10 <sup>-7</sup>  | NEG                        | >168                                                         |
| Pseudomonas aeruginosa<br>ATCC 27853 | 10 <sup>-6</sup>  | POS                        | 30                                                           |
|                                      | 10 <sup>-7</sup>  | NEG                        | >168                                                         |
| Candida albicans<br>ATCC 14053       | 10 <sup>-4</sup>  | NEG                        | >168                                                         |
|                                      | 10 <sup>-5</sup>  | NEG                        | >168                                                         |
| Aspergillus niger<br>ATCC 6275       | 10 <sup>-4</sup>  | NEG                        | >168                                                         |
|                                      | 10 <sup>-6</sup>  | NEG                        | >168                                                         |

## PROVE DI STERILITA' SUI CAMPIONI DI TESSUTO ADIPOSO

I risultati delle prove di sterilità sui campioni di Tessuto Adiposo sono riassunti nelle tabelle seguenti (Tab. 8,9). I flaconi per la crescita di batteri aerobi e lieviti sono: FA, BPA e SA e quelli per la crescita di batteri anaerobi sono: FN e BPN. Di solito vengono utilizzati in coppia.

Nello specifico, i risultati dei test condotti sui 20 campioni di *Tessuto Adiposo Fresco* (Tab. 8) mostrano 6 positività per i seguenti campioni: *T.AD.F.1*, *T.AD.F.5*, *T.AD.F.6*, *T.AD.F.9*, *T.AD.F.17*, *T.AD.F.19*. Per 4 campioni su 6, *T.AD.F.5*, *T.AD.F.9*, *T.AD.F.17*, *T.AD.F.19*, tutti i flaconi impiegati sono risultati positivi. Per 2 campioni su 6 solo alcuni flaconi sono risultati positivi all'inoculo, in particolare il campione *T.AD.F.1* risulta positivo con tutti i flaconi utilizzati ad eccezione di *BPA*. Mentre il campione *T.AD.F.6* positivo con tutti i flaconi utilizzati ad eccezione di *FN*.

Il flacone con i tempi di positivizzazione più corti è il flacone *FA*, un flacone che consente la crescita di batteri aerobi e lieviti, quindi idoneo alla rilevazione dei batteri rilevati: *S. lugdunensis*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, che sono tutti aerobi/anaerobi facoltativi.

I microrganismi rivelati attraverso le semine dei flaconi risultati positivi sono stati sottoposti a identificazione con VITEK® MS PRIME, attraverso le modalità ampiamente descritte nel capitolo *Materiali e Metodi*, e sono elencati in Tab. 9.

I test condotti sugli stessi campioni di Tessuto Adiposo dopo processazione sono stati condotti come previsto dal protocollo di lavorazione (*Tessuto Adiposo Post Lavorazione*), ampiamente descritto nel capitolo *Percorso del Tessuto Adiposo: dal prelievo all'utilizzo*, e nella sezione di *Materiali e Metodi: Utilizzo pratico del Sistema BactAlert3D per l'analisi del Tessuto Adiposo*.

I risultati delle analisi sul *Tessuto Adiposo Post-Lavorazione* (*T.AD.P.L.*) mostrano un minor tasso di positività per la crescita dei microrganismi. Nel dettaglio, per il *Tessuto Adiposo n.9 Fresco* (*T.AD.F.9*) e per il *Tessuto Adiposo n.19 Fresco* (*T.AD.F.19*), tutte le tipologie di flaconi inoculati hanno mostrato positività alla crescita microbica e i microrganismi rilevati, per ciascun tipo di flacone, sono stati rispettivamente *S. capitis ss.capitis*, e *S. lugdunensis*; i flaconi inoculati con il *Tessuto Adiposo n.9 Post-Lavorazione* (*T.AD.P.L.9*) e con il *Tessuto Adiposo n.19 Post-Lavorazione* (*T.AD.P.L.19*) sono risultati tutti negativi. Per il *Tessuto Adiposo n.1 Fresco* (*T.AD.F.1*) tutte le tipologie di flaconi inoculati, ad eccezione di *BPA*, sono risultati positivi e il microrganismo identificato è stato per tutti *S. lugdunensis*; i flaconi inoculati con il *Tessuto Adiposo n.1 Post-Lavorazione* (*T.AD.P.L.1*) mostra invece una discordanza tra i set di flaconi impiegati: *FA* e *FN* sono positivi e si rileva ancora la crescita di *S. lugdunensis*, mentre *BPA*,

BPN, e SA sono negativi. Tutti i flaconi inoculati con il *Tessuto Adiposo n.5 Fresco (T.AD.F.5)* risultano positivi e il microrganismo rilevato è *S. epidermidis*; i flaconi inoculati con *Tessuto Adiposo n.5 Post-Lavorazione (T.AD.P.L.5)* sono tutti negativi, ad eccezione di FN, rilevato positivo alla 32° ora di incubazione, e il microrganismo identificato si riconferma *S. epidermidis*. Tutti i flaconi, ad eccezione di FN, inoculati con il *Tessuto Adiposo n.6 Fresco (T.AD.F.6)* sono positivi, e la loro analisi rivela di nuovo la presenza di *S. Epidermidis*; i flaconi inoculati con il *Tessuto Adiposo n.6 Post-Lavorazione* hanno tutti un risultato negativo al termine del tempo massimo di incubazione, fatta eccezione per il flacone FA, che risulta positivo alla 28° ora di incubazione e dall'analisi del quale viene identificato ancora *S. epidermidis*. Infine, per tutte le tipologie di flacone inoculate con il *Tessuto Adiposo n.17 Fresco (T.AD.F.17)* si è rilevata positività, con identificazione di *S. hominis*; tutti i flaconi inoculati con *Tessuto Adiposo n.17 Post-Lavorazione (T.AD.P.L.17)* sono negativi, tranne FA, che risulta positivo per la crescita microbica alla 29°ora di incubazione, con rivelazione di *S. hominis*.

**Tabella 8. Risultati dei test di sterilità sul Tessuto Adiposo Fresco**

| TIPOLOGIA CAMPIONE : TESSUTO ADIPOSO FRESCO (T.AD.F.)<br>(N. CAMPIONE) | TIPOLOGIA DI FLACONE; CRESCITA (Pos / neg);TEMPO DI POSITIVIZZAZIONE (h) |          |          |          |          | MICRORGANISMO CRESCIUTO                   |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------------------|
|                                                                        | FA                                                                       | FN       | BPA      | BPN      | SA       |                                           |
| T.AD.F.1                                                               | Pos; 23h                                                                 | Pos; 18h | neg      | Pos; 52h | Pos; 32h | <i>Staphylococcus Lugdunensis</i>         |
| T.AD.F.2                                                               | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.3                                                               | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.4                                                               | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.5                                                               | Pos; 20h                                                                 | Pos; 23h | Pos; 21h | Pos; 18h | Pos; 24h | <i>Staphylococcus Epidermidis</i>         |
| T.AD.F.6                                                               | Pos; 24h                                                                 | neg      | Pos; 28h | Pos; 54h | Pos; 23h | <i>Staphylococcus Epidermidis</i>         |
| T.AD.F.7                                                               | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.8                                                               | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.9                                                               | Pos; 24h                                                                 | Pos; 28h | Pos; 32h | Pos; 36h | Pos; 24h | <i>Staphylococcus Capitis ss. Capitis</i> |
| T.AD.F.10                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.11                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.12                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.13                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.14                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.15                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.16                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.17                                                              | Pos; 24h                                                                 | Pos; 26h | Pos; 35h | Pos; 30h | Pos; 26h | <i>Staphylococcus Hominis</i>             |
| T.AD.F.18                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |
| T.AD.F.19                                                              | Pos; 19h                                                                 | Pos; 27h | Pos; 21h | Pos; 18h | Pos; 20h | <i>Staphylococcus Lugdunensis</i>         |
| T.AD.F.20                                                              | neg                                                                      | neg      | neg      | neg      | neg      | -                                         |

**Tabella 9. Risultati dei test di sterilità su Tessuto Adiposo Post- Lavorazione**

| TIPOLOGIA CAMPIONE : TESSUTO ADIPOSO POST LAVORAZIONE<br>(T.AD.P.L.)<br>(N. CAMPIONE) | TIPOLOGIA DI FLACONE; CRESCITA (Pos / neg);TEMPO DI POSITIVIZZAZIONE (h) |                  |            |            |            | MICRORGANISMO CRESCIUTO           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------|------------|------------|------------|-----------------------------------|
|                                                                                       | FA                                                                       | FN               | BPA        | BPN        | SA         |                                   |
| T.AD.P.L.1                                                                            | <b>Pos; 22h</b>                                                          | <b>Pos ; 16h</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <i>Staphylococcus Lugdunensis</i> |
| T.AD.P.L.2                                                                            | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.3                                                                            | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.4                                                                            | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.5                                                                            | <b>neg</b>                                                               | <b>Pos; 32h</b>  | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <i>Staphylococcus Epidermidis</i> |
| T.AD.P.L.6                                                                            | <b>Pos; 28h</b>                                                          | <b>neg</b>       | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <i>Staphylococcus Epidermidis</i> |
| T.AD.P.L.7                                                                            | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.8                                                                            | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.9                                                                            | <b>neg</b>                                                               | <b>neg</b>       | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | -                                 |
| T.AD.P.L.10                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.11                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.12                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.13                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.14                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.15                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.16                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.17                                                                           | <b>Pos; 29h</b>                                                          | <b>neg</b>       | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <i>Staphylococcus Hominis</i>     |
| T.AD.P.L.18                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |
| T.AD.P.L.19                                                                           | <b>neg</b>                                                               | <b>neg</b>       | <b>neg</b> | <b>neg</b> | <b>neg</b> | -                                 |
| T.AD.P.L.20                                                                           | neg                                                                      | neg              | neg        | neg        | neg        | -                                 |

## DISCUSSIONE

Al fine di produrre dati significativi, che rappresentassero concretamente l'opportunità di detenere un confronto attendibile tra diverse tipologie di set di flaconi da impiegare per i test relativi al monitoraggio di sterilità del Tessuto Adiposo, in questo lavoro si è scelto di condurre, in prima istanza, i Test di Fertilità per ogni lotto di flaconi a disposizione. Data la coerenza dei risultati agli standard della ditta produttrice (menzionati nel capitolo *Risultati*) e la linearità dei dati osservati rispetto alle aspettative, legate alle già note caratteristiche biologiche dei microrganismi testati, per le condizioni analitiche impostate, è stato ragionevolmente ritenuto che i singoli lotti di flaconi fossero adatti per l'impiego nei saggi successivi ed è stata confermata, sulla base dei dati ottenuti, la robustezza delle modalità di conservazione di tali lotti, la quale ha permesso di preservarne in modo ottimale l'integrità biologica.

A partire da queste condizioni, è stato sviluppato il cuore del lavoro, rappresentato dalle prove di sterilità sui campioni di *Tessuto Adiposo* (nelle modalità esaustivamente descritte nel capitolo *Materiali e Metodi*) e contestualmente, sono stati confrontati i risultati derivati dall'analisi condotta in parallelo con i differenti set di flaconi a disposizione. Dall'analisi di questi risultati si evince in primo luogo che per ogni linea analitica di Tessuto Adiposo, tutte le tipologie di flaconi inoculati e incubati all'interno dello strumento BactAlert, per i quali è stata segnalata, entro il tempo massimo specifico (descritto in *Materiali e Metodi* e in *Risultati*), la positività alla crescita microbica, le corrispondenti identificazioni, basate su spettrometria di massa (VITEK-PRIME MS), hanno rivelato lo stesso microrganismo (si può osservare ad esempio che tutti i flaconi inoculati con *T.AD.F5* sono risultati positivi e l'identificazione corrispondente, a mezzo di spettrometria di massa, ha rivelato omogeneamente per ciascuno *S. epidermidis*; *Tab. 8 e Tab. 9*). Dai risultati riportati nelle Tabelle (*Tab. 8, Tab. 9*) è possibile operare un confronto tra i campioni di *Tessuto Adiposo Fresco* (*T.AD.F.*) e i tessuti stessi dopo essere stati sottoposti a trattamento (*T.AD.P.L.*) ed è dunque possibile evincere che, per i campioni di tessuto inoculati successivamente alla fase di processazione, il tasso di positività complessivo dei flaconi analizzati è significativamente sceso rispetto a quello osservato per i campioni freschi, dato il quale potrebbe essere riconducibile alla presenza di antibiotico nella

soluzione aggiunta al tessuto, prevista dai protocolli di trattamento dei campioni (descritti nell'apposito paragrafo dedicato: *Il percorso del Tessuto Adiposo: dal Prelievo all'utilizzo*). A partire dai risultati illustrati nelle tabelle (*Tab. 8, Tab. 9*), è possibile inoltre osservare che, per i flaconi dei quali si è registrato un risultato positivo alla crescita microbica nel BactAlert, entro il tempo massimo di incubazione, la contestuale identificazione, a mezzo di spettrometria di massa, ha indicato la presenza dello stesso microrganismo per il medesimo tessuto, sia che fosse stato esso *Fresco* oppure che fosse *Post-Lavoro* (un esempio è il flacone *FN* inoculato con *T.AD.P.L.5*, che è positivo, con contestuale rilevazione di *S. epidermidis*, ovvero lo stesso microrganismo rilevato a partire dai flaconi inoculati con il corrispondente *Tessuto Fresco* (*T.AD.F.5*), quest'ultimo il quale, come già ampiamente chiarito nei vari capitoli di questa tesi, era lo stesso tessuto che però non aveva subito trattamento alcuno). È opportuno inoltre considerare i risultati relativi ai flaconi inoculati con il *Tessuto Adiposo Post-Lavorazione* (*Tab. 9*): nello specifico è possibile osservare che tutti i Flaconi *BPA, BPN, SA* sono negativi, mentre le positività alla crescita microbica si è registrata solo per alcuni flaconi del set *FA* ed *FN* (i positivi osservati sono: *FA* e *FN* inoculati con *T.AD.P.L.1*, *FN* inoculato con *T.AD.P.L.5*, *FA* inoculato con *T.AD.P.L.6*, *FA* inoculato con *T.AD.P.L.17*); la discrepanza dei risultati tra i diversi set di flaconi potrebbe essere ricondotta alle diverse composizioni del loro contenuto, ricordiamo infatti che (come descritto nel paragrafo dedicato *FLACONI BACTALERT BIOMÉRIEUX* nel capitolo *Materiali e Metodi*), i flaconi *FA* e *FN* contengono in 32 mL di terreno tra le altre componenti, anche l'arricchimento di infuso cuore-cervello *BHI* + 8 mL di carbone attivato disciolto, con la funzione di neutralizzare gli antibiotici presenti nel campione.

## CONCLUSIONI

I dati di questo studio sembrerebbero dimostrare che i set di Flacons *BPA* e *BPN* sarebbero più idonei, rispetto al set *FA/FN*, per l'impiego nei test di Sterilità sul Tessuto Adiposo che ha subito la prima fase di lavorazione, proprio in virtù del fatto che i Flacons *FA* ed *FN* neutralizzerebbero, durante il periodo di incubazione nel BactAlert, la funzione dell'antibiotico presente nel campione in questa fase della lavorazione. Tuttavia, questi dati dimostrano che i flacons *FA* ed *FN* sono comunque idonei per l'applicazione nei test di Sterilità sul *Tessuto Adiposo Fresco*. I dati sul set di flacons *SA/SN* non sono sufficienti per dimostrare la potenziale applicazione per il monitoraggio della sterilità sul Tessuto Adiposo, e occorrerebbero ulteriori studi per produrre dati sui i flacons *SN*, di cui manca questo lavoro. Sono infine necessari ulteriori studi, che estendano il range di dati prodotti in questo lavoro, al fine di confermare i risultati ottenuti.

## BIBLIOGRAFIA

- Adamo, M., Smith, J., Brown, A., et al. (2005). Adipocyte differentiation: From fibroblast to endocrine cell. *Experimental Biology and Medicine*, 230(2), 118-127. <https://doi.org/10.1177/153537020523000203>
- Adams, R. H., Alitalo, K., & Mäkinen, T. (2019). Lymphatic endothelial reprogramming in kidney disease and transplantation. *Cell Stem Cell*, 25(3), 377-381. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.014>
- Azienda Unità Sanitaria Locale Romagna. (n.d.-a). Banca Regionale Cute: al via attività di banking di tessuto adiposo autologo e sviluppo attività di ricerca nel campo della bioingegneria tessutale. Recuperato da <https://www.auslromagna.it/notizie/comunicati/item/4203-banca-regionale-cute-al-via-attivita-di-banking-di-tessuto-adiposo-autologo-e-sviluppo-attivita-di-ricerca-nel-campo-della-bioingegneria-tessutale>.
- Azienda Unità Sanitaria Locale Romagna. (n.d.-b). Il tessuto adiposo. Recuperato da <https://bancadellacute.auslromagna.it/it/tessuto-adiposo/il-tessuto-adiposo>
- Azienda Unità Sanitaria Locale Romagna. (n.d.-c). Cell Factory. Recuperato da <https://bancadellacute.auslromagna.it/it/cell-factory>
- Azienda Unità Sanitaria Locale Romagna. (n.d.-d). Sistema di qualità ISO GMP. Recuperato da <https://bancadellacute.auslromagna.it/it/assicurazione-qualita/sistema-qualita-iso-gmp>
- Battaglini, G., Rossi, M., Bianchi, L., et al. (2019). Utilizzo del tessuto adiposo autologo per il trattamento delle ferite cutanee. *Rivista di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva*, 71(3), 195-202. <https://doi.org/10.23736/S0026-4733.19.07910-4>
- Biomérieux. *Product Information - BacT/Alert® Culture Media*. Retrieved from <https://www.biomerieux-usa.com/bactalert-culture-media>
- Brecher, S. M., et al. (2004). Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1469-1472. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1469-1472.2004>
- Centro Nazionale Trapianti. (2016). Linee guida sulla pratica clinica per l'impiego del tessuto adiposo autologo in chirurgia plastica e rigenerativa.

- Coleman, S. R. (2006). Structural fat grafting: More than a permanent filler. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 118(3 Suppl), 108S-120S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000234610.81641.94>
- Coleman, S. R., & Saboeiro, A. P. (2007). Fat grafting to the breast revisited: Safety and efficacy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119(3), 775-785. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000252001.59162.c9>
- Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., et al. (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.135>
- De Girolamo, L., et al. (2021). Therapeutic properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their application in musculoskeletal disorders: a review. *Cells*, 10(5), Article 1204. <https://doi.org/10.3390/cells10051204>
- European Pharmacopoeia 6th Edition 2009. Par. 2.6.27 Microbiological Control of Cellular Products: 4414-4415.
- European Medicines Agency. (2015). Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products. Retrieved from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-classification-advanced-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-classification-advanced-therapy-medicinal-products_en.pdf)
- Ganong, W. F., Barrett, K. E., Boitano, S., et al. (2008). *Review of medical physiology* (23rd ed.). McGraw-Hill Medical.
- Gimble, J. M., & Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5(5), 362-369. <https://doi.org/10.1080/14653240310003026>
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
- IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli. (2021). Studio sperimentale di terapia rigenerativa con lipofilling per il trattamento dell'artrosi ginocchio. Risultati a 12 mesi. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 12(4), 218-223. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2020.08.008>
- Koutnikova, H., Cock, T. A., Watanabe, M., et al. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : a link between systemic inflammation and dysregulated glucose

- metabolism in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 36788-36798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105650200>
- - Lipogems International SPA. *Lipogems® System: una nuova tecnologia per l'estrazione e il trapianto di tessuto adiposo autologo*. Retrieved from <https://www.lipogems.com>
  - Mirrett, S., Reller, L. B., & Weinstein, M. P. (2004). Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated detection methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to vancomycin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 4756-4758. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4756-4758.2004>
  - Monesi, V., Rossi, P., Bianchi, F., et al. (2018). Pluripotential mesenchymal stem cells in adult human adipose tissue. *Journal of Cell Biology*, 217(5), 1567-1580. <https://doi.org/10.1083/jcb.201801044>
  - Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., et al. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109(10), 1292-1298. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>
  - Riley, T. V., et al. (2005). Evaluation of the BacT/Alert system and comparison to conventional media for recovery of organisms from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 839-841. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.839-841.2005>
  - Robbins, S. L., Kumar, V., & Cotran, R. S. (2006). *Robbins basic pathology* (8th ed.). Saunders/Elsevier.
  - Smith, A., et al. (2019). Cryopreservation and banking of adipose tissue for therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 148, 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.07.008>
  - Thorpe, T. C., Wilson, M. L., Turner, J. E., & DiGuseppi, J. L. (1990). BacT/Alert: An automated colorimetric microbial detection system. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1608-1612. <https://doi.org/10.1128/JCM.28.7.1608-1612.1990>
  - Trayhurn, P., Bing, C., & Wood, I. S. (2005). Adipose tissue and adipokines—Energy regulation from the human perspective. *Journal of Nutrition*, 135(5), 1131-1136. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1131>
  - Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., et al. (2008). Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plastic Surgery*, 32(1), 48-55. <https://doi.org/10.1007/s00266-007-9005-5>
  - Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>