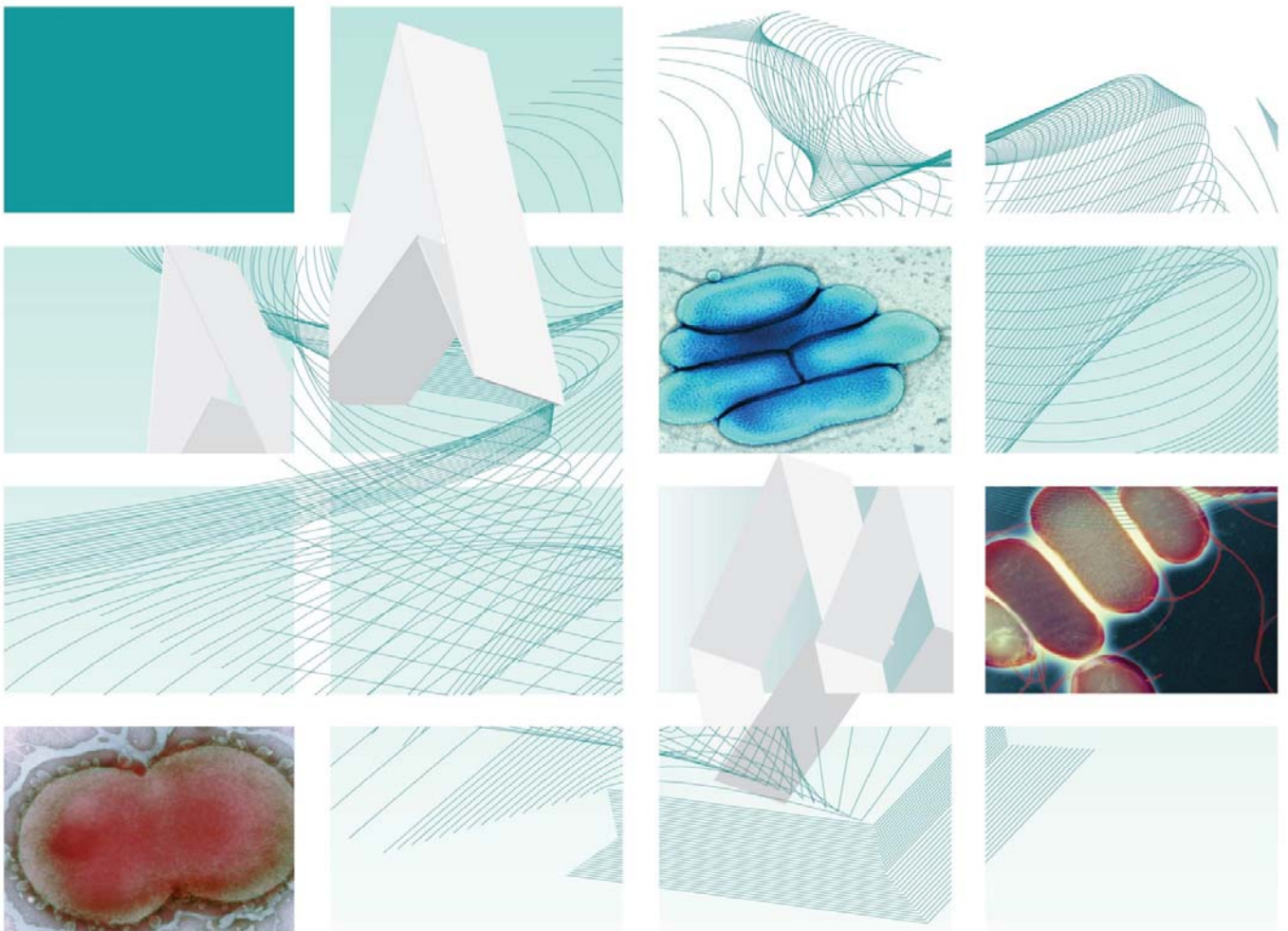




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Procedura del test Matrix-assisted laser desorption/ionisation - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)



Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida dell'Health Protection Agency (HPA) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Si ringrazia inoltre il Professor Neil Woodford per il considerevole contributo specialistico.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Health Protection Agency
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ

E-mail: standards@hpa.org.uk

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Numero di accesso alle pubblicazioni PHE: 2016337

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

Ringraziamenti	2
Tabella modifiche	4
SMI UK scopo e obiettivo	5
Scopo del documento.....	8
Introduzione.....	8
Informazione tecnica/limitazioni	11
1 Considerazioni sulla sicurezza.....	14
2 Reagenti e strumentazione	15
3 Microrganismi controllo qualita'	15
4 Procedure e risultati	16
Appendice 1:Diagramma di flusso di MALDI-TOF MS	17
Appendice 2: Riassunto di esempi per le preparazioni dei campioni da usare con differenti classi di microrganismi	18
BIBLIOGRAFIA	19



NICE has accredited the process used by Public Health England to produce Standards for Microbiology Investigations. Accreditation is valid for 5 years from July 2011. More information on accreditation can be viewed at www.nice.org.uk/accreditation.

For full details on our accreditation visit: www.nice.org.uk/accreditation.

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso la standards@phe.gov.uk.

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica no/data.	-/10/10/16
Emissione eliminata. no	-
Emissione inserita no.	1
Sezione(i) interessate	Modifica

SMI[#]: scopo e obiettivo

Utilizzatori delle SMI

Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive. Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di test appropriati. I documenti forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute sia clinica che pubblica per la propria popolazione.

Informazioni di base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati). Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Collaborazione paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali. L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <http://www.govv.uk-standards-for-microbiology-investigation-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di ampia consultazione.

Assicurazione di qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008. Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica

[#] Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche aggiuntive qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accreditamento con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo. Queste stesse devono essere utilizzate in associazioni con altre SMI. Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del paziente e della comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web.

Informazione della gestione e dei dati sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza. Lo sviluppo di metodi SMI è assoggettato agli obiettivi PHE di Uguaglianza <https://www.gov.uk/government/organisation/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche e avere la consapevolezza che la PHE e le altre organizzazioni non si fanno carico di queste modifiche. Per evitare ulteriori dubbi si precisa che le SMI sono state sviluppate per essere applicate nel RU, e qualsiasi uso al di fuori di questa sede è a rischio dell'utilizzatore.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti ove appropriato

Citazione suggerita per questo documento

Public Health England. (2016). Detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum β -Lactamases. UK Standards for Microbiology Investigations. B 59 Emissione 4.
<https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Questa SMI descrive la procedura di prova MALDI-TOF e il suo utilizzo per l'esame di colture ottenute da campioni clinici come indicato nei documenti UK SMI Identification (ID). Questo documento descrive il meccanismo e le limitazioni della tecnica nel suo utilizzo presso i laboratori diagnostici di microbiologia.

Per informazioni sulla valutazione e validazione di questo metodo per l'utilizzo in laboratorio, fare riferimento a [Q1 - Commercial and In-House Diagnostic Tests: Evaluations and Validations](#).

Fare riferimento a documenti ID specifici per maggiori documentazioni sulle informazioni tecniche/limitazioni d'uso di questa procedura analitica.

Questa SMI dovrebbe essere usata congiuntamente alle altre SMI.

Introduzione

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) è una tecnica di moderata ionizzazione usata in spettrometria di massa, che consente l'analisi di biomolecole (quali DNA, proteine ribosomiali, peptidi e zuccheri) e di grandi molecole organiche (ad esempio polimeri, dendrimeri e altre macromolecole), che tendono ad essere strutturalmente fragili e si frammentano quando ionizzate con i metodi più convenzionali di ionizzazione. La ionizzazione viene attivata da un raggio laser. È uno strumento di analisi rapido ed estremamente affidabile per la caratterizzazione di una serie diversificata di microbi riscontrati nel laboratorio clinico.

Questa tecnica può essere utilizzata per analizzare la composizione proteica di una cellula batterica, ed è emersa come una nuova tecnologia per l'identificazione delle specie¹. Questa ha dimostrato di essere una tecnica particolarmente efficace per la sua riproducibilità, velocità e sensibilità analitica. Il vantaggio di MALDI-TOF MS rispetto ad altri metodi d'identificazione è che i risultati delle analisi sono disponibili entro pochi minuti o alcune ore anziché diversi giorni. La velocità e la semplicità di preparazione del campione e l'acquisizione del risultato, associato a costi di consumo contenuti, rendono questo metodo adatto per elevati volumi di lavoro².

Recentemente, i sistemi di identificazione tipo MALDI possono rivelarsi il mezzo più conveniente di identificazione che dipende solo dalle dimensioni degli archivi dei risultati e dal volume di campioni da giustificare l'investimento iniziale di un impegno economico consistente³. Un'altra limitazione connessa alle piattaforme commerciali disponibili è rappresentato dal fatto che attualmente un certo numero di produttori commerciali affermati utilizzano per l'identificazione microbica propri algoritmi, banche dati, programmi gestionali e criteri interpretativi, fornendo in tal modo risultati numerici (cioè, punteggi spettrali) non direttamente comparabili fra loro^{4,5}. Gli utenti dovrebbero essere avvertiti che alcuni programmi delle piattaforme commerciali MALDI-TOF MS potrebbero non essere in grado di identificare gli agenti patogeni del Gruppo di Rischio 3 se l'utente non richiede la banca dati completa alla società commerciale, che non è di norma fornita per agenti che riguardano il bioterrorismo⁴. Ciò potrebbe potenzialmente portare all'esecuzione di successivi accertamenti per questi isolati, aumentando il rischio del personale di laboratorio all'esposizione di tali isolati.

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

In funzione del cambiamento continuo della tassonomia e della riscoperta di nuove specie e di microrganismi emergenti, sono indispensabili aggiornamenti regolari e continui delle banche dati per assicurare un beneficio clinico. Queste dovrebbero includere la presenza delle principali linee filogenetiche appartenenti a ogni specie. Gli utenti possono aggiungere le proprie registrazioni spettrali di massa per migliorare le banche dati esistenti o creare un proprio archivio includendo ceppi localmente importanti o non ben rappresentati in quelle commerciali soggette a validazione⁴.

Va notato che la sensibilità antimicrobica non è determinata direttamente da questo metodo in quanto le proteine specie-specifiche rilevate dalla spettrografia di MALDI-TOF MS sono in gran parte inalterate dalla sensibilità antimicrobica⁴. Un esempio è la differenziazione diretta tra i ceppi, come *S. aureus* Meticillina resistente e ceppi di *S. aureus* Meticillina sensibili, che rappresenta una grande sfida per le applicazioni MALDI-TOF MS nei laboratori diagnostici⁶. Attualmente non sono disponibili piattaforme universali per la determinazione rapida della resistenza antimicrobica che forniscano uno spettro esteso dei generi batterici che possa essere implementato nel flusso di lavoro del laboratorio clinico. Tuttavia MALDI-TOF MS offre la possibilità di rilevare la produzione di carbapenemasi, ma sono necessari ulteriori miglioramenti e la validazione, prima che i test di sensibilità agli antibiotici diventino disponibili in routine⁵⁻¹².

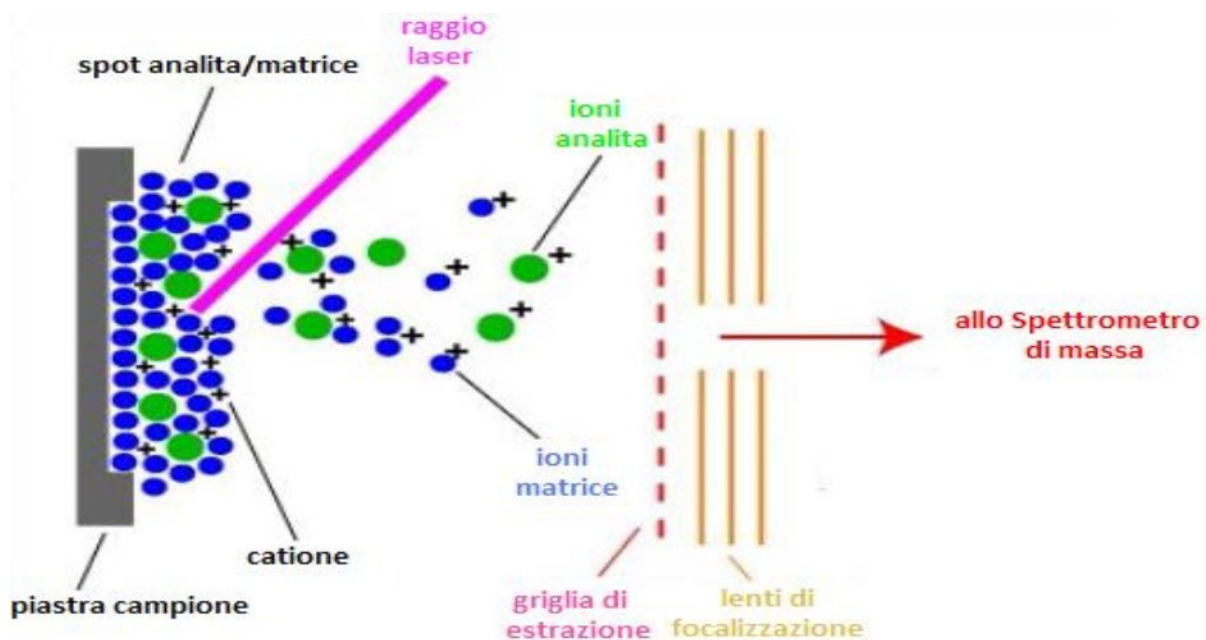
Sebbene questo metodo sia stato utilizzato con successo per l'identificazione di batteri e funghi, è stato anche molto utile per il test diretto su campioni clinici come urine, liquido cerebrospinale e sangue che ha consentito miglioramenti significativi per la cura del paziente e alla riduzione dei tempi di consegna dei risultati^{5,13}. Anche se sono disponibili kit commerciali validati per l'estrazione diretta da questi campioni (ad esempio brodi di emocoltura positivi), prima della loro implementazione saranno necessari ulteriori studi per la processazione dei campioni di emocolture e di urine, così come miglioramenti delle banche dati. I laboratori clinici dovranno anche affrontare la sfida fra la scelta dei metodi MALDI-TOF MS e quelli molecolari emergenti per identificare i batteri da brodo direttamente dai campioni⁵⁻¹².

Altre punti di forza di MALDI-TOF MS

Sono di seguito elencati altri punti di forza: MALDI-TOF MS.

- nella maggior parte dei casi richiede solo una singola colonia ricoperta con una matrice per eseguire il test (ma non per i lieviti o le colonie mucoidi)
- rischio di esposizione è molto ridotto perché i campioni sono spesso inattivati prima dell'uso con metodi di estrazione
- sistema molto adattabile, aperto, e facilmente espandibile da parte degli utenti
- richiesta minima di materiali di consumo
- utile per l'identificazione di batteri difficili da coltivare, quali Micobatteri, specie *Bartonella*, specie *Legionella*, ecc¹⁴
- utili nell'identificazione di anaerobi clinicamente importanti come le specie *Bacteroides*, *Prevotella* e *Actinomyces*, nonché per l'identificazione di aerobi Gram positivi^{15,16}
- utile nella identificazione di lieviti clinicamente rilevanti come le specie *Candida*¹⁷
- non sono richieste competenze tecniche specialistiche

Modalità analitica di MALDI-TOF MS



Desorbimento

⇒ Ionizzazione ⇒ Accelerazione ⇒ Separazione ⇒ Rilevamento

(Per gentile concessione di Paul Gates 2014)¹⁸

La procedura di base di MALDI-TOF MS è così rappresentata:

- la piastra bersaglio è posta nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa. Gli spot da analizzare sono colpiti dai raggi laser N_2 ultravioletti che rimuovono le molecole microbiche e quelle delle matrici dalla piastra bersaglio. La maggior parte dell'energia viene assorbita dalla matrice, convertendola in uno stato ionizzato.
- tramite la collisione casuale nella fase gassosa, la carica viene trasferita dalla matrice alle molecole microbiche.
- la nube di molecole ionizzate viene incanalata mediante un campo elettrostatico positivo verso lo spettrometro di massa, un tubo sotto vuoto.
- gli ioni viaggiano verso un rivelatore ionico con i piccoli analiti che viaggiano più velocemente, seguiti da analiti progressivamente più grandi.
- come gli ioni emergono dallo spettrometro di massa, collidono con un rivelatore di ioni che genera uno spettro di massa che rappresenta il numero di ioni che colpiscono il rivelatore nel tempo. Anche se la separazione è effettuata tramite il rapporto tra massa e carica, in quanto la carica è in genere di un solo tipo per l'applicazione descritta, la separazione è di fatto determinata dal peso molecolare.

Informazione Tecnica/Limitazioni

Questa è la descrizione di alcune limitazioni tecniche/informazioni che potrebbero essere riscontrate dagli utilizzatori quando utilizzano le diverse piattaforme disponibili. Non tutte saranno riscontrate in ciascuna di loro.

Presenza di batteri e endospore

Una limitazione di questa tecnica è l'interferenza spettrale dovuta alla presenza di spore in alcune specie di microrganismi, come ad esempio di specie *Clostridium*. Per ridurre al minimo la loro presenza si utilizzano le colture più recenti^{5,19}.

Differenziazione fra microrganismi

L'Identificazione con il MALDI-TOF MS si basa sul confronto degli spettri del campione/isolato con quelli di dell'archivio di riferimento¹. Tuttavia il limite di questa tecnica è l'incapacità degli spettri della spettrometria di massa di differenziare microrganismi simili o strettamente correlati, come *Escherichia coli* e *Shigella* spp, alcuni streptococchi viridanti e pneumococchi, i membri del complesso *Candida albicans* etc.

MALDI-TOF MS può essere inaffidabile nel differenziare il patogeno *Neisseria meningitidis* e le specie non patogene/opportuniste, come avvenuto in casi di *N.cinerea* e *N. polysaccharea* erroneamente identificate come *N. meningitidis* e viceversa, il che potrebbe avere gravi conseguenze per la salute, o legali e sociali²⁰⁻²². Pertanto, in situazioni particolari o critiche, la conferma dell'identificazione delle specie *Neisseria* deve essere eseguita con metodi fenotipici o molecolari validati.

Altri microrganismi difficili da differenziare a livello di specie usando MALDI-TOF MS comprendono Micobatteri, *Burkholderia* spp., *Acinetobacter* spp., *Corynebacteria* e streptococchi β -emolitici. Ciò è dovuto alla loro elevata similarità genetica^{23,24}.

Banche dati tassonomiche esistenti

Le banche dati MALDI-TOF possono essere migliorate aumentando la loro dimensione esistente o da laboratori che creano un proprio archivio che include i ceppi localmente importanti non ben rappresentati o erroneamente classificati nei database commerciali⁴. Tuttavia, ciò richiede una identificazione certa dei ceppi. Alcuni esempi sono rappresentati dall'errata identificazione di *Propionibacterium acnes* come *Eubacterium brachy*, e streptococchi viridanti come pneumococchi errata interpretazione di *Pantoea agglomerans* come *Enterobacter* spp., e di *Pandora pulmonicola* come *Sphingobacterium spiritivorum*²⁵⁻²⁸.

Un altro problema di riscontro frequente nell'identificazione di routine con MALDI-TOF MS è l'errore dovuto ad un errato spettro di riferimento della banca dati, sebbene ciò non sia frequente per tutti i sistemi.

Difficoltà nella lisi delle strutture della parete cellulare

Alcuni microrganismi sono dotati di capsule che impediscono una efficace lisi delle cellule che determina una ridotta resa di estrazione e, quindi, scarsa qualità dello spettro. Ciò comporta problemi d'identificazione. Esempi di tali microrganismi si riscontrano nella distinzione tra

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Streptococcus pneumoniae e *Streptococcus mitis* così come nella maggior parte dei ceppi di *Haemophilus influenzae* e *Klebsiella pneumoniae*²⁵. La soluzione per superare alcune di queste limitazioni risiede nella quantità dell'inoculo e nel metodo di estrazione utilizzato²⁵.

Gli utenti sono invitati a saggiare sempre tutti gli isolati in duplicato, perché invariabilmente, dei due spot, uno ha un inoculo migliore e fornisce un punteggio logaritmico migliore (probabilità di corretta identificazione)²⁹. Questo ottimizza le probabilità di avere un risultato utilizzabile senza successivi tentativi d'identificazione e potrebbe essere particolarmente utile con le colonie mucoidi³⁰. Se si utilizza il test in duplicato, l'utente deve avere una "strategia di valutazione" che deve essere esplicitata nelle SOP locali^{23,24,31}.

Terreni di Coltura

La mancata identificazione di alcuni microrganismi potrebbe essere causata dall'uso dei terreni di crescita utilizzati. I componenti di alcuni terreni, come quelli dell'agar colistina acido nalidixico o dei terreni liquidi potrebbero provocare potenziali interferenze^{5,25}.

Errata identificazione

Altri esempi che potrebbero portare alla mancata identificazione includono: colonie piccole o mucoidi, accertamento su colonie non pure, sciamatura tra spot, mancata pulizia delle piastre di supporto e colonie inoculate nelle posizioni sbagliate della piastra target^{4,5}.

Il posizionamento dell'inoculo nella sede sbagliata può essere minimizzato con la duplicazione del test (con l'aggiustamento dei risultati discrepanti) e tramite la ripetizione di risultati che non sono congruenti con la morfologia delle colonie o con i dati clinici.

Ricerca della resistenza antimicrobica

Con questo metodo la sensibilità antimicrobica non è determinata direttamente, in quanto le proteine specie-specifiche rilevate dalla spettrografia di MALDI-TOF MS sono in gran parte inalterate dalla sensibilità antimicrobica⁴. E' attualmente disponibile una piattaforma universale per la determinazione rapida della resistenza antimicrobica che copra uno spettro esteso di generi batterici che possa essere implementata nel flusso di lavoro del laboratorio clinico. Anche se MALDI-TOF MS stia diventando sempre più disponibile nei laboratori diagnostici e offra la possibilità di rilevare la produzione di carbapenemasi, sono necessari ulteriori miglioramenti e la loro validazione prima che i test di sensibilità agli antibiotici siano inseriti nella pratica di routine⁵⁻¹².

Metodi di Estrazione

Esistono diversi metodi estrazione impiegati nel MALDI-TOF MS per il pretrattamento dei campioni clini/isolati⁵.

Non esiste un singolo metodo di estrazione generalmente raccomandato. Gli utenti devono assicurarsi di utilizzare un metodo di estrazione appropriato, come raccomandato dal costruttore, in modo da ottenere risultati precisi di identificazione, nonché dimostrare che i profili proteici rimangono coerenti con le immagini della banca dati. Per esempio, per essere correttamente identificati, i lieviti richiedono una procedura per l'estrazione delle proteine²⁵. I funghi filamentosi non hanno ancora protocolli di estrazione standardizzati e le banche dati commercialmente disponibili non raggiungono lo scopo richiesto per un'identificazione fungina. Tuttavia, MALDI-TOF MS è il metodo preferito d'identificazione dei funghi filamentosi se confrontato all'osservazione della loro morfologia in funzione della sua consistenza e precisione. E' necessaria un'estensione continua della banca dati fungina per migliorare la sua futura affidabilità^{32,33}.

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Gli anaerobi possono essere identificati utilizzando l'estrazione chimica o metodi di striscio diretto. In alcuni casi è stato anche sostenuto che l'estrazione delle proteine può essere dannosa per la formazione ottimale dello spettro degli anaerobi³⁴.

Consultare l'appendice 2 per ulteriori informazioni sulle diverse proposte raccomandate per le preparazioni del campione MALDI-TOF MS da utilizzare con le diverse classi di microrganismi⁵.

Controlli di Qualità

Gli utenti dovrebbero garantire che le procedure di estrazione sono condotte correttamente da personale competente specializzato. Inoltre si deve controllare che tutti i reattivi non siano scaduti e conservati correttamente.

Le prestazioni della fase di estrazione e dello spettrometro di massa MALDI-TOF possono essere controllate saggiando di routine alcuni ceppi batterici selezionati i cui spettri sono disponibili nella banca dati. Se si inseriscono modifiche in qualsiasi fase della procedura MALDI-TOF MS, come il cambio di reagenti o di specifici protocolli di estrazione, queste devono essere validate dal laboratorio che le esegue prima che siano utilizzate di routine. Comunque, se sono stati utilizzati metodi di estrazione modificati, gli utenti devono garantire che questi siano compatibili con la banca dati esistente e dove non lo sono, può esserne creata una nuova da utilizzare con i protocolli modificati dopo la loro validazione.

Per ottenere risultati accurati è pure essenziale l'appropriata manutenzione e riparazione delle apparecchiature MALDI-TOFMS. Queste dovrebbero essere eseguite con maggiore frequenza se l'apparecchiatura è molto utilizzata o collocata in un ambiente polveroso o affollato²⁵.

Risultati e interpretazione dei referti

L'errore può verificarsi anche per l'inserimento di un risultato sbagliato nei sistemi informativi del laboratorio e per spettri di riferimento erronei presenti nella banca dati⁴.

I risultati devono essere interpretati con attenzione e cautela. Questi dovrebbero essere interpretati in base alle indicazioni fornite dal costruttore della piattaforma utilizzata. Se il risultato dell'identificazione è ancora dubbio, l'intero processo dovrebbe essere ripetuto.

Teoricamente il MALDI-TOF MS dovrebbe essere interfacciato con i sistemi informatici di gestione di laboratorio (LIMS - laboratory information management systems) in modo che il microbiologo possa consultare quanti tentativi d'identificazione sono stati eseguiti, con o senza estrazione, e il punteggio che definisce la probabilità di una identificazione accurata. Quando non si dispone di alcuna interfaccia, i dettagli del metodo di utilizzo, il numero dei tentativi e i punteggi log devono essere inseriti manualmente almeno per le identificazioni potenzialmente "problematiche" seguendo la procedura locale. Nessun sistema di identificazione raggiunge il 100% di precisione e la tecnica MALDI-TOF MS ha un certo numero di punti deboli noti: i microbiologi medici devono riscontrare la congruenza dell'identificazione di laboratorio con la sintomatologia clinica e disporre di informazioni sulla probabile accuratezza dell'identificazione che può aiutare a decidere quando si dovrebbe ricorrere a una identificazione con metodi alternativi.

1 Considerazioni sulla sicurezza³⁵⁻⁵¹

Tutte le manipolazioni in grado di generare aerosol devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza. Tuttavia, a volte la natura del lavoro può richiedere l'utilizzo di condizioni di completo livello di Contenimento 3, ad esempio per i test su *Brucella* spp., *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium* spp. ecc, al fine di rispettare la COSHH 2004 Schedule 3 (4e). I sospetti microrganismi CL3 devono essere trattati nei laboratori CL3 da personale addestrato. Attenzione supplementare dovrebbe essere messa quando si trasporta una piastra target con un sospetto di microrganismo di categoria 3 da analizzare con MALDI-TOF MS in contenitore sigillato. Ogni piastra target contenente un microrganismo di comprovata categoria 3 deve essere immediatamente pulita e non utilizzata per prove successive.

Le matrici sono composti a basso peso molecolare, acidi e di natura volatile, con forte proprietà di assorbimento nella regione UV/IR. Prima dell'analisi, la matrice è utilizzata per ricoprire lo spot della colonia batterica (o fungina) preparata su un definito supporto del MALDI-TOF MS. In commercio sono disponibili diversi tipi di matrici, con proprietà e applicazioni diverse.

Una semplice estrazione di proteine (utilizzando acido formico o etanolo-acetonitrile) ha dimostrato di essere economico, veloce e di migliorare in modo significativo la capacità del MALDI-TOF MS nell'identificazione corretta dei microrganismi⁵.

La preparazione concentrata di acido formico è molto corrosiva e pertanto è opportuno che siano indossati indumenti protettivi in ogni momento durante l'uso. Le persone che utilizzano questo reagente dovranno porre la massima attenzione. Va notato che l'acido formico ha effetti tossici specifici per l'uomo; danno del nervo ottico, danni renali e allergia cutanea che si manifesta dopo ri-esposizione alla sostanza. Sono stati documentati alcuni effetti cronici da esposizione all'acido formico.

L'etanolo può essere utilizzato per l'estrazione di colonie pure per analisi con MALDI-TOF MS. L'etanolo è un liquido estremamente infiammabile. Il contatto diretto con gli occhi può causare irritazione, arrossamento, dolore, infiammazione della cornea e suo possibile danneggiamento. Il contatto ripetuto o prolungato con la pelle può provocare fissurazione cutanea, e possibile infezione secondaria.

L'acetonitrile può essere utilizzato per l'estrazione di colonie pure per analisi con MALDI-TOF MS. L'acetonitrile è un liquido infiammabile e volatile. E' tossico se inalato o assorbito attraverso la cute. Può causare lesioni ai seguenti organi bersaglio: sangue, reni, polmoni, fegato, membrane mucose, tratto gastrointestinale, sistema cardiovascolare, tratto respiratorio superiore, occhi, cute e sistema nervoso centrale (SNC). Se è ingerito può essere nocivo.

Seguire le istruzioni del produttore su come utilizzare le matrici e le sostanze chimiche sopra menzionate, alcune delle quali sono associate a importanti rischi professionali come per occhi, cute e tossicità respiratoria. In caso si verifichi un'esposizione, dovrebbe essere consultato un medico.

Fare riferimento alla linee guida sulla sicurezza nella manipolazione dei microrganismi descritti nelle altre SMI.

Le seguenti indicazioni devono essere integrate con le valutazioni COSHH e del rischio locale.

E' essenziale il rispetto delle regolamentazioni postali e di trasporto.

2 Reagenti e Attrezzature

Piastre MALDI-TOF MS:

Le piastre target MALDI-TOF MS sono di due tipi: pronte per l'uso e riutilizzabili. Entrambe offrono lo stesso livello di prestazione. La differenza principale è che le riutilizzabili richiedono una pulizia accurata e la verifica dopo ogni loro uso, per evitare la contaminazione da campioni clinici/isolati saggiati.

Bastoncino di legno o plastica per inoculo o

Puntali per pipette o

Anse monouso

Strumentazione MALDI-TOF MS e confezione per estrazione:

Seguire le istruzioni del produttore secondo la tipologia delle attrezzature e delle confezioni di estrazione utilizzate.

Sono possibili due approcci principali;

- colonie pure su agar appropriato o piastra. Si raccomanda di utilizzare colonie coltivate di recente (durante la notte) o in caso di batteri a crescita lenta, usare quelli coltivati per alcuni giorni. Prima dell'uso le piastre non dovrebbero essere conservate a 4° C perché ciò influenza la qualità degli spettri che si deteriora in modo relativamente rapido entro in un paio di giorni. E' consentita la conservazione delle piastre a temperatura ambiente per alcuni giorni.
- possono essere utilizzati campioni clinici (ad esempio materiale direttamente da emocoltura, urine, liquido cerebrospinale (CSF), o estratti di proteine). Sono disponibili confezioni commerciali di estrazione per uso diretto sui flaconi delle emocolture positive. Nella confezione sono forniti tutti i reagenti e materiali di consumo necessari per la processazione dell'emocoltura.

3 Organismi di controllo qualità

Controllo positivo

Test standard batterico - fornito dal produttore, utilizzato per la calibrazione giornaliera, è un controllo per ogni seduta analitica/matrice. Questo può anche essere usato per verificare l'andamento di picchi selezionati e rilevare derive prima che fallisca la calibrazione.

Controllo negativo

Inserire nella serie analitica uno spot vuoto con la matrice fornita dal produttore. Si fa ciò per verificare che la piastra target sia stata pulita correttamente nel caso si usi un tipo di piastra riutilizzabile.

Nota:

La qualità dei microrganismi di controllo utilizzati dipende da ciò che il produttore fornisce. Seguire le istruzioni del produttore. Nell'esecuzione delle sedute analitiche di MALDI-TOF MS, i laboratori dovrebbero includere propri ceppi di controllo positivi e negativi validati.

Si deve notare che è buona regola non utilizzare sempre la stessa posizione target per i controlli positivi o negativi.

4 Procedura e risultati³⁰

Prelevare da una piastra di coltura una colonia batterica pura (tipicamente isolata) con un bastoncino di legno o di plastica, puntale, o ansa e trasferire il materiale in una sede definita su una piastra target MALDI-TOF MS. Questa procedura è nota come applicazione 'diretta'. La maggior parte dei batteri saranno identificati facilmente con un'applicazione diretta (senza ricorrere alla sovrapposizione di acido formico). Prima di essere saggiate, le colonie fungine richiedono l'estrazione, come accennato in precedenza in "Metodi di estrazione" (nella sezione limitazioni tecniche).

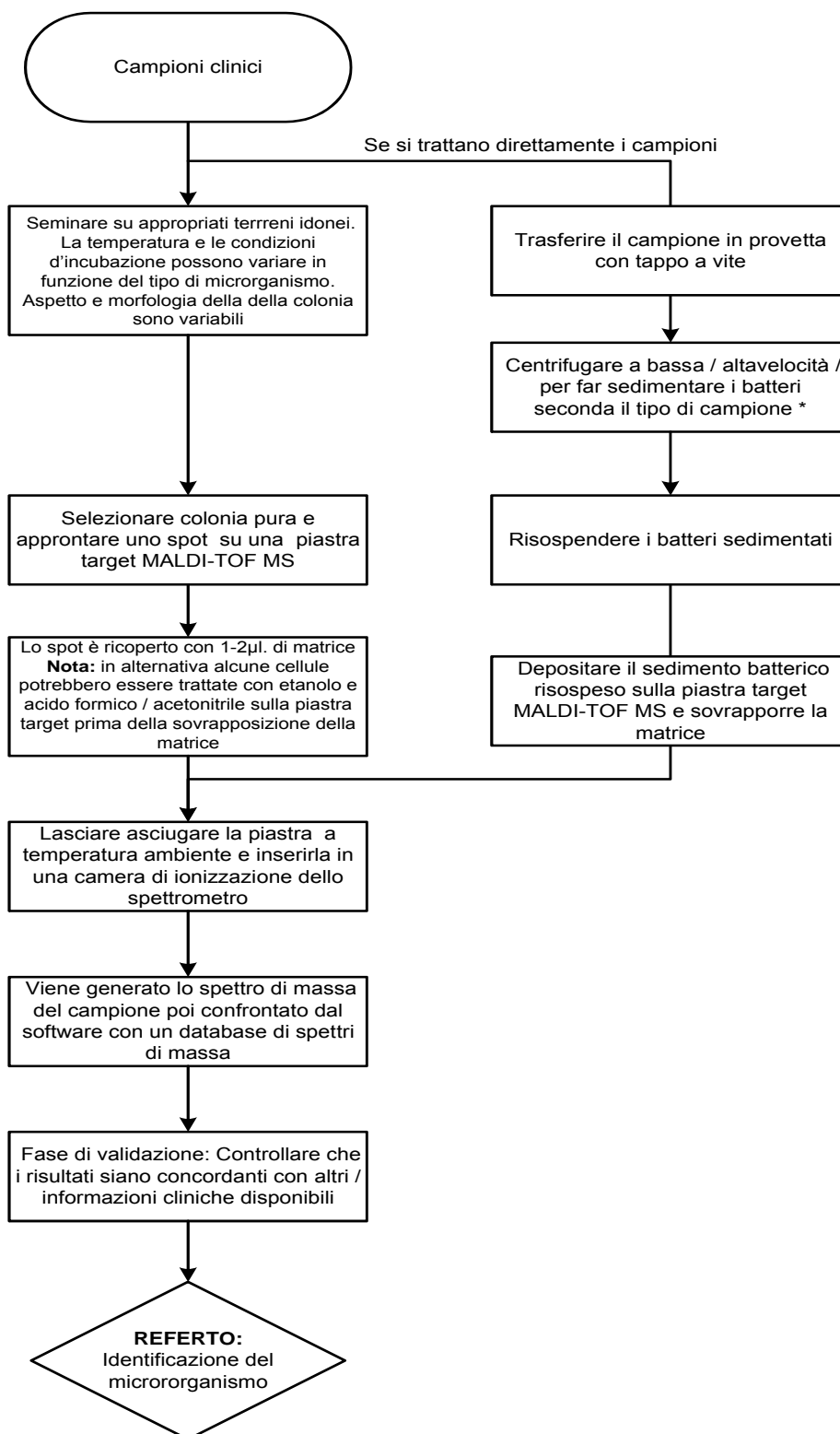
Nota: Il saggio diretto su piastra deve essere evitato con organismi pericolosi per il personale di laboratorio (ad esempio, le specie *Mycobacterium*, specie *Brucella* e *Bacillus anthracis*). I microrganismi del Gruppo di Rischio 3 devono essere neutralizzati e poi trattati con sovrapposizione di acido formico che uccide la maggior parte dei batteri. Prima dell'accertamento, qualsiasi microrganismo ad alto rischio dovrebbero essere sottoposto a estrazione nel livello di contenimento appropriato. Si procede in questo modo per evitare il rischio di causare infezione nel personale che manipola questi organismi¹⁹. Si deve inoltre notare che né terreno di coltura, temperatura e condizioni di incubazione, né durata d'incubazione influenzano la precisione

Lo spot sulla piastra target viene poi ricoperto con 1-2µL di matrice. In alternativa, nel caso in cui il test con spot diretto fallisca, le cellule batteriche possono essere ricoperte con acido formico/ acetonitrile prima di aggiungere la matrice. Le cellule fungine possono essere trattate con etanolo e acido formico/acetonitrile sulla lastra di destinazione prima della sovrapposizione con la matrice. Questa procedura è spesso definita come "On Target Lysis". La matrice deve essere applicata entro breve tempo per evitare l'ossidazione del campione sulla piastra target.

Dopo un breve periodo di essiccazione a temperatura ambiente, la piastra viene inserita nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa per essere analizzata.

Lo spettro di massa generato automaticamente è confrontato con una banca dati di spettri di massa tramite il software, con conseguente identificazione del microrganismo. Gli utenti devono seguire le raccomandazioni fornite dai produttori in merito a quando l'identificazione prevista può essere considerata soddisfacente a livello di specie o genere⁵.

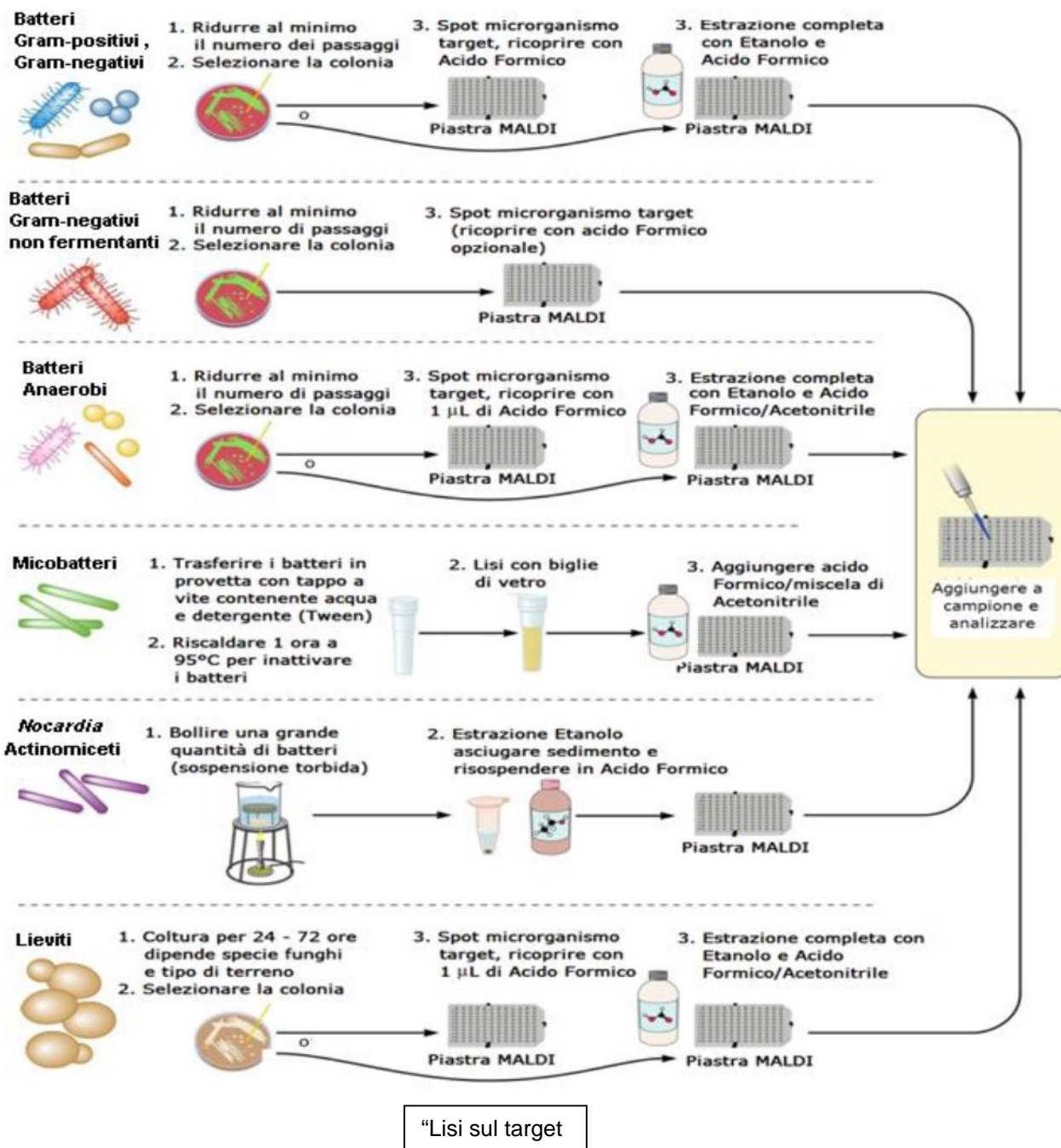
Appendice 1 : Diagramma di Flusso di MALDI-TOF



Se si processa un campione di sangue con MALDI-TOF MS, utilizzare l'apposita confezione e seguire le istruzioni del produttore

Questo diagramma di flusso è solo a carattere indicativo

Appendice 2: Riassunto di esempi per le preparazioni dei campioni MALDI-TOF MS da usare con diverse classi di microrganismi



(Per gentile concessione di Andrew E. Clark et al 2013)⁵

Nota: E' stato accertato che alcuni batteri Gram positivi e Gram negativi possono sia essere trattati direttamente senza richiedere aggiunta di acido formico. Devono essere seguite le dovute precauzioni di sicurezza biologica e più in particolare per quanto riguarda i membri pericolosi di questi gruppi di organismi. I dettagli su come elaborare campioni clinici per l'analisi MALDI-TOF MS possono essere visualizzati nel riferimento di cui sopra.

Bibliografia

Il GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation) è un approccio sistematico alla valutazione della bibliografia. Per le UK SMI si utilizza un metodo GRADE modificato per valutare l'inclusione dei riferimenti bibliografici. Ogni riferimento bibliografico è valutato e assegnato a un grado di consistenza delle raccomandazione (A-D) e alla qualità delle prove soggettive (I-VI). Di seguito è presentata una tabella riassuntiva che definisce il grade e deve essere utilizzato in congiunzione con l'elenco delle voci bibliografiche.

Tabella di GRADE (**Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation**) modificata, utilizzata dalle SMI UK nella valutazione della bibliografia.

Consistenza della raccomandazione	Evidenza della qualità
A Fortemente raccomandata	I Dimostrazione da studi controllati, randomizzati, meta-analisi, e revisionati sistematicamente
B Raccomandata ma possono essere accettabili altre alternative	II Dimostrazione da studi non randomizzati
C Debolmente raccomandata: ricercare alternative	III Studi non-analitici, es. casi riportati, recensioni, serie di casi
D Mai consigliate	IV Opinione degli esperti e ampia accettazione come buona pratica, ma con nessuna prova di studio
	V Richiesto dalla normativa, codice di buona pratica o norma nazionale
	VI Lettera o altro

1. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, Jolley KA, Guerin P, Leto J et al. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J Microbiol Methods* 2013;94:390-6. **B, II**
2. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:5402-7. **A, III**
3. Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:2-11. **A, III**
4. Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis* 2013;57:564-72. **A, III**
5. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:547-603. **A, III**
6. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:103-14. **B, III**

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

7. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011;49:3321-4. **B, III**
8. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:2441-3. **B, II**
9. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012;50:927-37. **B, II**
10. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol* 2015;53:2163-71. **B, II**
11. Johansson A, Ekelof J, Giske CG, Sundqvist M. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol* 2014;14:89. **B, II**
12. Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S, Charrier JP, van Belkum A, Welker M et al. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:2225-34. **B, II**
13. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. *PLoSOne* 2011;6:e23285. **B, II**
14. Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *JMicrobiolMethods* 2013;92:14-24. **B, III**
15. Garner O, Mochon A, Branda J, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro M et al. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK(R) MS system. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:335-9. **B, II**
16. Rychert J, Burnham CA, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 2013;51:2225-31. **B, II**
17. Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 2013;51:2267-72. **B, II**
18. Gates P. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml>. **B, III**
19. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J Clin Microbiol* 2014;52:130-8. **B, II**
20. Cunningham SA, Mainella JM, Patel R. Misidentification of *Neisseria polysaccharea* as *Neisseria meningitidis* with the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014;52:2270-1. **B, III**
21. Deak E, Green N, Humphries RM. Microbiology test reliability in differentiation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria polysaccharea*. *J Clin Microbiol* 2014;52:3496. **B, VI**

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

22. Vironneau PK, R; Herman, P; Cambau, E; Bercot, B;. Mis-identification of *Neisseria cinerea* and *Neisseria polysaccharae* as *Neisseria meningitidis* by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight (MALDI-TOF) analysis 2013. **B, II**
23. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *JClinMicrobiol* 2010;48:900-7. **B, I**
24. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *ClinMicrobiolInfect* 2010;16:1631-8. **B, II**
25. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS MicrobiolRev* 2012;36:380-407. **B, III**
26. Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro MJ et al. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:1571-8. **B, II**
27. Branda JA, Markham RP, Garner CD, Rychert JA, Ferraro MJ. Performance of the Vitek MS v2.0 system in distinguishing *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal species of the *Streptococcus mitis* group. *J Clin Microbiol* 2013;51:3079-82. **B, II**
28. McElvania TeKippe E, Burnham CA. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:2163-71. **B, II**
29. Powell EA, Blecker-Shelly D, Montgomery S, Mortensen JE. Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of the fastidious pediatric pathogens *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Haemophilus*, and *Kingella*. *J Clin Microbiol* 2013;51:3862-4. **B, II**
30. Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S et al. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2012;50:2034-9. **B, II**
31. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J Clin Microbiol* 2012;50:3301-8. **B, II**
32. Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol* 2014;52:826-34. **B, II**
33. Ranque S, Normand AC, Cassagne C, Murat JB, Bourgeois N, Dalle F et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* 2014;57:135-40. **B, II**
34. Fournier R, Wallet F, Grandbastien B, Dubreuil L, Courcol R, Neut C et al. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2012;18:294-7. **B, II**
35. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are

Procedura del Test Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

given in the EU *in vitro* Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes". 1998.

36. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices 1998. 1-37.
37. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 2009.
38. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
39. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
40. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001.
41. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive 2013. 1-32.
42. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office 2003.
43. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive 2005.
44. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive 2008.
45. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
46. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed.: HSE Books; 2002.
47. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
48. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
49. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. Books H 2003.
50. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets 2000.
51. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 2005. 1-14.