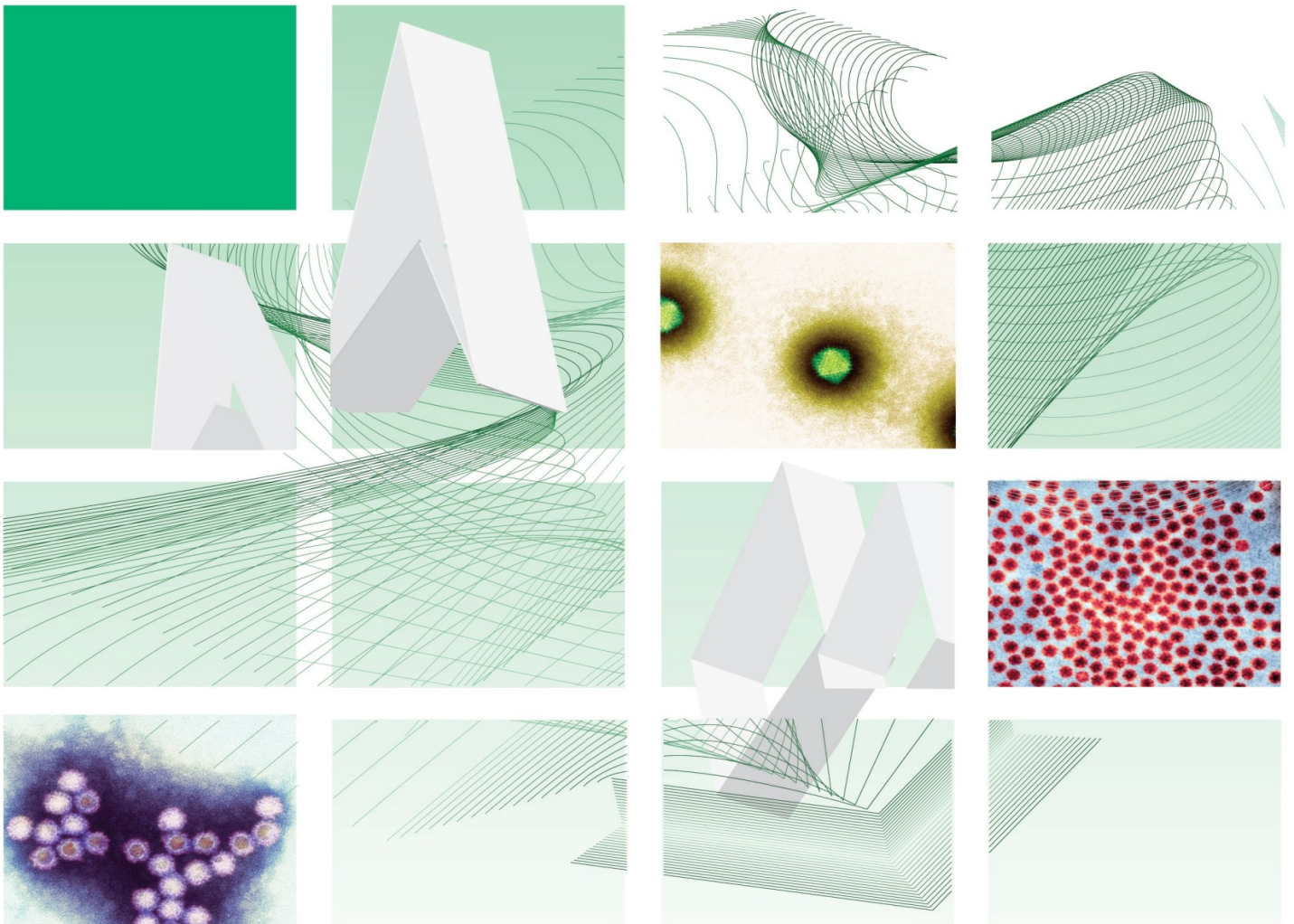




Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Procedura per Trattamento e Propagazione delle Colture Cellulari per Isolamento Virale



Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) 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 <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

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.

Per ulteriori informazioni contattare:

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

E-mail: standards@phe.gov.uk

Website: <http://www.hpa.org.uk/SMI>

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



Contenuti

RINGRAZIAMENTI	2
TABELLA MODIFICHE	4
RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO	5
SCOPO DEL DOCUMENTO	8
INTRODUZIONE	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI	9
1 CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA	10
2 PRELIEVO DEL CAMPIONE	11
3 TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	11
4 STRUMENTAZIONE E REAGENTI	11
5 PROCESSO/PROCEDURA SUL CAMPIONE	14
6 ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'	18
7 LIMITAZIONI	20
8 PROCEDURA DI REFERTAZIONE	20
9 NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE	20
APPENDICE CONSERVAZIONE DELLE CELLULE IN AZOTO LIQUIDO	21
BIBLIOGRAFIA	23



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: www.nice.org.uk/accreditation.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : www.nice.org.uk/accreditation

Tabella delle modifiche

Ciascun documento controllato 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.	4/14.10.13
Emissione eliminata. no	2.2
Emissione inserita no.	2.3
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di “Stato come Scopo” e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>La bibliografia degli standard di sicurezza è stata revisionata ed aggiornata.</p> <p>Il contenuto scientifico rimane invariato.</p>

Modifica No/Data.	3/20.04.12
Emissione eliminata. no	2.1
Emissione inserita no.	2.2
Sezione(i) interessate/Pagina no.	Modifica.
Documento intero .	Documento presentato in nuovo formato

Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito[#]: Scopo e Obiettivo

Utilizzatori delle SMI

Sono stati identificati tre gruppi di utenti per i quali le SMI sono particolarmente utili:

- 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 tests appropriati da parte dei reparti ospedalieri.
- Le SMI 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 della prova, la garanzia della qualità, la definizione dell'incertezza della determinazione.

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. Nel Regno Unito le SMI rappresentano strategie omogenee per le prove diagnostiche e la programmazione degli interventi di sanità pubblica

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.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>

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 consultazione.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

[#] 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.

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 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 addizionali 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 assogGETTO agli obiettivi PHE di Uguaglianza http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317133470313. 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.

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 quando appropriato.

Citazione Suggestita per questo Documento

Public Health England. (2013). Procedure for the Care and Propagation of Cell Cultures for Virus Isolation. UK Standards for Microbiology Investigations. V 39 Emissione 2.3.

<http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

Scopo del Documento

Questa SMI descrive la produzione delle colture cellulari per isolamento/ricerca dei virus.

Le linee cellulari incluse in questa SMI non sono in alcun modo uniche od esaustive, ma sono quelle più comunemente utilizzate per l'isolamento/ricerca dei virus. La più importante caratteristica nella selezione delle linee cellulari per queste finalità è rappresentata dalla loro sensibilità per il/(i) virus da ricercare.

Linee cellulari più comunemente utilizzate per l'isolamento dei virus e per le loro specifiche richieste ¹		
Linea cellulare	Agenti Dissocianti	Sensibilità virale*
RhMK Cellule primarie o secondarie indifferenziate Origine: rene di scimmia Rhesus Presenti tipi di cellule diverse. Per motivi etici non disponibili nel Regno Unito dopo il mese di Aprile 2006	Tripsina/Versene	Virus Influenzali Virus parainfluenzali Enterovirus Poliovirus Adenovirus Virus della parotite Virus del morbillo
MRC-5 Linea cellulare semi-continua ben differenziata Origine polmone fetale umano Tipologia fibroblastica	Tripsina/Versene	Virus herpes simplex Adenovirus Virus respiratorio sinciziale Virus varicella zoster Citomegalovirus Enterovirus Poliovirus Rinovirus
HEP-2 Linea cellulare continua ben differenziata Origine: carcinoma laringeo umano Tipologia epiteliale	Versene	Adenovirus Virus respiratorio sinciziale Virus herpes simplex Enterovirus Poliovirus
VERO Linea cellulare continua ben differenziata Origine:olmone di scimmia verde africana Tipologia epiteliale	Tripsina/Versene	Virus herpes simplex Enterovirus Poliovirus Adenovirus Virus del morbillo
PLC-PRF5 Linea cellulare continua ben differenziata Origine epatoma umano Esprime l'antigene di superficie del virus dell'epatite B	Tripsina/Versene	Virus influenzali Virus parainfluenzali Adenovirus Enterovirus Virus respiratorio sinciziale

<p>MDCK Linea cellulare continua ben caratterizzata Origine - Rene di cane Tipologia epiteliale</p>	<p>Tripsina/Versene NB La disaggregazione cellulare può richiedere trattamento prolungato</p>	<p>Virus influenzali Virus parainfluenzali</p>
--	--	---

*La linea cellulare ha dimostrato di consentire la crescita dei virus elencati ma potrebbe non essere quella di scelta per questi virus.

Questa SMI deve essere usata congiuntamente alle altre SMI.

Introduzione

Generalità

Il procedimento con cui le cellule dei mammiferi sono prelevate dai tessuti e sono poste in condizioni controllate di crescita in laboratorio è definito coltura cellulare. Dopo la stabilizzazione la cellula in coltura è in grado di mantenere la crescita e la replicazione; queste condizioni sono limitate dall'esaurimento dei componenti nutrienti. Tutte le colture pertanto richiederanno un cambiamento periodico del terreno ("nutrimento") seguito eventualmente dalla sottocoltura se le cellule sono in fase proliferativa. Gli intervalli fra le sottocolture variano da una linea cellulare all'altra in funzione del grado di sviluppo e del loro metabolismo. Quando sono state utilizzate tutte le componenti del terreno o nel caso in cui la concentrazione cellulare supera la capacità nutrizionale si deve aumentare la frequenza del cambiamento del terreno o della suddivisione della coltura.

L'esecuzione della sottocoltura da una linea cellulare che cresce in modo aderente presuppone la rimozione del terreno e la disaggregazione del monostrato con enzima proteolitico quale la tripsina, con agente chelante-versene (EDTA) o con miscela di brodo².

Eccezionalmente, alcuni monostrati cellulari non sono dissociati con la tripsina e richiedono l'azione di proteasi alternative quali acutasi, pronasi, dispasi o collagenasi³⁻⁵.

Il principale problema durante la produzione di una coltura cellulare è rappresentato dal mantenimento della sterilità dei componenti e la prevenzione della contaminazione delle linee cellulari. I batteri, ed in particolare, micoplasmi, virus, funghi o altri tipi di cellule possono contaminare le linee cellulari. La contaminazione può svilupparsi dal tessuto utilizzato per la produzione della linea cellulare, da componenti del terreno, dall'operatore o dall'ambiente.

Informazione Tecnica/Limitazioni

N/D

1 Considerazioni sulla Sicurezza⁶⁻²²

1.1 Prelievo del Campione

N/D

1.2 Trasporto e Conservazione del Campione⁶⁻¹¹

N/D

1.3 Procedura sul campione⁶⁻²²

Devono essere rispettate le valutazioni di rischio generale (GRA – general risk assessment) e locale del COSHH.

Alcune linee cellulari ed i composti chimici utilizzati per le loro colture sono potenzialmente pericolosi e devono essere manipolati con attenzione. In caso di dubbio per le eventuali implicazioni di rischio nella manipolazione di un reagente o di una linea cellulare, fare riferimento alla valutazione del COSHH locale per informazioni successive. Tutto il personale coinvolto nella manipolazione delle colture cellulari deve essere consapevole dei pericoli e dei rischi connessi.

Sebbene gli animali utilizzati siano attentamente selezionati, controllati e monitorati, le linee cellulari da questi derivate possono contenere virus patogeni per l'uomo. Per isolamenti virali non devono essere usate cellule provenienti da animali di origine ignota od incerta.

Le linee cellulari continue possono derivare da carcinomi o da modificazioni ottenute con agenti virali. Sebbene il rischio per il personale di laboratorio sia statisticamente moderato, esse devono essere manipolate con le stesse precauzioni applicate alle cellule di derivazione animale.

Le linee cellulari che presentano potenziali rischi (consultare le opportune raccomandazioni del COSHH) devono essere processate in cappa di sicurezza di classe II e l'operatore deve calzare i guanti ed un grembiule per tutto il tempo richiesto.

Le linee cellulari non possono essere eliminate con i rifiuti generali ma sottoposte alle stesse procedure adottate per i microrganismi patogeni. Ciò comporta sia l'utilizzo dell'autoclave e/o dell'inceneritore per tutti i contenitori e la strumentazione utilizzata. Tutti i rifiuti liquidi devono essere raccolti in soluzione d'ipoclorito (2,500 ppm Cloro) o in altre appropriate soluzioni disinfettanti.

Se dopo più di tre giorni d'incubazione si isolano virus, quali l'herpes simplex, da pazienti HIV positivi utilizzando cellule MRC 5 dotate di recettori CD4, si incorre nel rischio di replicazione dell'HIV. Pertanto ogni manipolazione deve essere eseguita in ambiente di Contenimento di Livello 3, oppure le provette non devono essere aperte dopo l'incubazione.

2 Prelievo del Campione

2.1 Tipo di Campioni

N/D

2.2 Tempo Ottimale di Prelievo del Campione

N/D

2.3 Tipo di Campione Appropriato e Metodo di Prelievo

N/D

2.4 Quantita' Adeguata ed Appropriato Numero di Campioni

N/D

3 Trasporto e Conservazione del Campione^{6,7}

3.1 Tempo fra Prelievo del Campione e Procedura

N/D

3.2 Accorgimenti Particolari per Ridurre il Deterioramento

E' essenziale l'adeguamento alle regolamentazioni della posta e del trasporto.

Per il trasporto su strada o ferrovia, le colture cellulari devono essere imballate in materiali protettivi assorbenti e confezionate in robusti contenitori riempiti con patatine di polistirene od altri materiali idonei all'assorbimento degli urti. Per il trasporto aereo, consultare le regolamentazioni vigenti.

Particolare attenzione deve essere intrapresa per ridurre al minimo il deterioramento. Devono essere evitate esposizioni prolungate a temperature inferiori a 10°C e superiori a 35°C. Il sistema di trasporto utilizzato deve garantire la consegna del materiale entro 24 ore.

4 Strumentazione e Reagenti

4.1 Strumentazione

4.1.1 Termostati

L'incubazione deve essere eseguita in fiasche sigillate in un normale termostato asciutto o in cabina termica in grado di mantenere la temperatura fra i 30 e i 37°C; alcuni contenitori, quali capsule o piastre multipozzetto richiedono un'atmosfera controllata con elevato grado di umidità e concentrazioni di CO₂ aumentate.

La concentrazione di CO₂ deve essere verificata ogni giorno ed il termostato calibrato ogni sei mesi. La temperatura deve essere verificata ogni giorno con un termometro calibrato o con termocoppia.

Per prevenire lo sviluppo dei microrganismi le parti interne dei termostati devono essere pulite ad intervalli regolari usando prima alcool o disinfettanti fenolici a moderata attività, poi una soluzione detergente a bassa forza.

4.1.2 Cappe

Per la manipolazione di linee cellulari pericolose devono essere usate cabine di sicurezza di classe Le cabine a flusso laminare (flusso verticale) possono essere utilizzare per la manipolazione dei reagenti e dei terreni. solo dopo la valutazione locale del rischio. Tutte le cappe devono rispettare i principali standard vigenti.

Per prevenire la contaminazione crociata delle linee cellulari e lo sviluppo di microrganismi le cappe devono essere pulite prima della manipolazione delle colture ed al termine di ogni periodo di lavoro. Devono essere usati alcool (alcool denaturato industriale) oppure un disinfettante fenolico.

Il flusso d'aria deve essere verificato settimanalmente utilizzando un anemometro calibrato. Le letture devono essere eseguite in ciascun angolo ed al centro dell'apertura anteriore; le caratteristiche dei flussi d'aria devono soddisfare le raccomandazioni di sicurezza fornite dal produttore e quelle nazionali.

La verifica delle prestazioni dei filtri richiede controlli biologici mensili. Per il rilievo della contaminazione batterica o fungina, causata dal malfunzionamento dei filtri, si espongono le piastre di coltura in posizioni diverse sulla superficie di lavoro della cappa per almeno un'ora durante il suo funzionamento.

Le cappe devono essere verificate ad intervalli semestrali da un ingegnere specializzato e deve essere emesso un certificato di prestazioni soddisfacenti. Registrare ogni malfunzionamento della cappa e conservare le motivazioni.

4.1.3 Contenitori per colture

Sono preferibili contenitori monouso di plastica di buona qualità ma possono anche essere usati quelli appropriati di vetro neutro.

I contenitori di vetro devono essere puliti con composti compatibili con la coltura cellulare e successivo vigoroso risciacquo in acqua di rubinetto (x6) ed acqua deionizzata (x3). Può anche essere utilizzata una lavatrice automatica con programma di lavaggio idoneo alle caratteristiche della coltura cellulare e un composto chimico compatibile.

4.1.4 Altri Strumenti

Pipette –

Per prevenire la contaminazione, utilizzare solo quelle con membrana filtrante incorporata.

Centrifughe

Devono soddisfare i principali standard di sicurezza vigenti.

Microscopi

Sono richiesti microscopi standard ed invertiti.

Provetteri per colture cellulari

Per colture cellulari in provetta; questi devono essere modellati per sostenere le provette in posizione lievemente inclinata, in modo da permettere l'adesione della crescita cellulare verso il fondo e consentire l'immersione del monostrato nel terreno nutriente. E' opportuno che siano in grado di resistere alla sterilizzazione in autoclave.

4.2 Reagenti

Se non altrimenti specificato, tutti i reagenti devono essere sterili e tutte le procedure/manipolazioni devono essere eseguite in modo asettico.

I reagenti e i terreni devono essere acquistati da sorgenti affidabili

I campioni di ogni lotto di reagenti, le soluzioni ed i terreni prodotti "in loco" ed i reagenti commerciali aliquotati prima dell'uso devono essere verificati per la sterilità dopo la distribuzione nei contenitori.

4.2.1 Terreni di base

Sono disponibili numerosi terreni, ma quelli specificati di seguito in questo Metodo Nazionale Standard del RU sono ritenuti fornire crescite soddisfacenti delle linee cellulari.

Per garantire una maggiore qualità, devono essere utilizzati terreni di base controllati, acquistati da un fornitore accreditato (ISO o simili). I lotti devono essere saggiati per l'idoneità prima dell'utilizzo e si devono predisporre opportune scorte dei lotti approvati.

Terreno essenziale minimo – tampone salino di Earles (EMEM – minimal essential medium-Earles salt buffered)

Si consiglia di acquistare il terreno pronto all'uso per riduzione del numero di reagenti da aggiungere; e quindi il rischio di contaminazione. Nel terreno acquistato devono essere contenuti bicarbonato di sodio, L-glutamina, ed indicatore del pH.

4.2.2 Terreni completi

Per la propagazione ed il mantenimento delle cellule si possono produrre i seguenti terreni completi aggiungendo in modo asettico al terreno di base i componenti aggiuntivi di seguito segnalati:

Terreno di crescita EMEM All'EMEM aggiungere		
Penicillina	concentrazione finale	50 UI/mL
Streptomicina		100 µg/mL
Amfotericina B		2.5 µg/mL
Siero fetale di vitello ³		10%
Terreno di mantenimento EMEM All'EMEM aggiungere		
Penicillina	Concentrazione finale	50 ui/mL
Streptomicina		100 µg/mL
Amfotericina B		2,5 µg/mL
Siero fetale di vitello ²		2%

4.2.3 Sieri

Per la coltivazione delle cellule specificate in questa SMI il siero fetale o di neonato bovino si sono dimostrati idonei. Presso i fornitori sono tuttavia disponibili sieri ottimizzati, con ridotte variazioni fra

i diversi lotti ed equivalenti o migliori nelle prestazioni. Prima di confermare un acquisto, saggiarne l'idoneità di tutti i sieri utilizzati. Si consiglia la disponibilità di un lotto di scorta appropriato e di confermare la sua idoneità prima dell'acquisto. Se il siero è ricevuto parzialmente congelato, si consiglia di lasciarlo scongelare completamente prima di congelarlo di nuovo.

Non utilizzare siero inattivato al calore perché non idoneo alla coltivazione di alcune linee cellulari.

4.2.4 Reagenti supplementari

Antibiotici

Le concentrazioni degli antibiotici riferiti sono quelle presentate nel manuale³.

Nota: Gli antibiotici possono provocare reazioni allergiche.

Tampone fosfato salino (PBS).

Soluzione A di Dulbecco

(priva di calcio e magnesio) pH 7.3.

Versene

Sciogliere 10 grammi di sale disodico dell'acido etilendiaminotetra-acetico (qualità Analitica) in 1000 mL di acqua distillata. Distribuire in piccole boccette e sterilizzare in autoclave a 115°C per 10 minuti. Conservare a 2-8°C. Per l'uso, aggiungere 0.4 mL a 20 mL di PBS..

5 Processo/procedura sul campione^{6,7}

5.1 Selezione della Prova

Per differenziare le linee cellulari presenti nei contenitori di coltura si deve utilizzare un sistema d'identificazione efficiente ed attendibile, quale il riconoscimento con i colori. I contenitori devono riportare la data di semina.

Le cellule devono essere acquistate da un fornitore di fiducia che sia in grado di fornire informazioni complete e la certificazione dell'assenza di contaminanti; ECACC (European Collection of Cell Cultures) o simili. Le cellule possono essere acquistate in sospensione o in fiasche di coltura monostrato.

Evitare il versamento di liquidi da o nei contenitori, i pipettaggi devono essere eseguiti quando praticabili.

5.1.1 Fiasche

Per il trattamento delle colture seguire le indicazioni del produttore. Altrimenti, può essere utilizzato il metodo seguente.

All'arrivo, esaminare le fiasche per verificare la crescita e la condizione cellulare. Alla ricezione, registrare secondo le procedure locali.

Se le cellule sono in condizioni soddisfacenti, aggiungere un'opportuna quantità di terreno di crescita ed incubare a 37°C.

Quando le cellule confluiscono la fiasca è pronta per l'utilizzo o per passaggi successivi.

A questo punto, il terreno può essere cambiato con quello di mantenimento fino a quando le fiasche sono richieste. Diversamente, eseguire direttamente da queste le sottocolture in provette (consultare di seguito), trasferire (se compatibile con la linea cellulare) o dissociare e congelare in azoto liquido. (consultare Appendice)

5.1.2 Sospensione

1. Diluire la sospensione secondo le indicazioni del fornitore o diluire ad un'appropriata concentrazione
2. Aggiungere la sospensione diluita alle fiasche di coltura cellulare o, se richiesto, direttamente nelle provette. La quantità aggiunta a ciascuna fiasca dipende dalle dimensioni della stessa, ma deve essere sufficiente a ricoprire l'intera area di crescita con un'altezza di circa 3-5 mm
3. Incubare a 37°C
4. Quando la crescita cellulare è confluyente le fiasche sono pronte all'uso

A questo punto, il terreno può essere sostituito con quello di mantenimento fino a quando le fiasche sono utilizzate. Diversamente, eseguire sottocolture direttamente in provette (consultare di seguito), trasferire (se compatibile con la linea cellulare) o dissociare e congelare in azoto liquido.

5.2 Coltura e Ricerca

Queste indicazioni sono valide per fiasche da 75 cm², i volumi devono essere in ogni caso adattati alle dimensioni dei diversi contenitori.

1. Selezionare una fiasca che ha sviluppato una crescita confluyente.
2. Rimuovere il terreno e lavare con due volumi di PBS di circa 35 mL. Rimuovere in modo completo il secondo volume inserito
3. Aggiungere gentilmente 15 mL di miscela disaggregante su tutta la superficie interna della fiasca, rimuoverla poi ma non scolare in modo completo.
4. Incubare la fiasca a 37°C fino allo scollamento delle cellule, il tempo richiesto varia in funzione del tipo cellulare
5. Sospendere di nuovo le cellule scollate in 18 mL di terreno di crescita
6. Definire la concentrazione cellulare usando una camera di conta (Fuchs-Rosenthal modificata o simile).
7. Diluire le cellule nel brodo di crescita per produrre la quantità di sospensione richiesta alla concentrazione di circa 10⁵/mL, (usufruendo dell'esperienza, questa concentrazione può essere adattata al fine di ottenere il miglior risultato per ogni linea cellulare). Le sospensioni non diluite delle linee cellulari continue possono essere reinserite nel contenitore originale, dove è presente terreno di crescita in quantità sufficiente a garantire il futuro sviluppo della coltura.
8. Contrassegnare con una linea di riferimento e/o con la data il lato delle provette; ciò rappresenterà un riconoscimento perché questa sia sempre posta nel termostato con il segnale rivolto verso l'alto
9. Seminare nelle provette di coltura volumi appropriati di cellule diluite
10. Incubare a 37°C con una lieve angolazione sul piano orizzontale (circa 5°)
11. Quando le provette sviluppano un monostrato con confluenza di circa l'80% sono pronte per essere utilizzate e il terreno di mantenimento deve essere sostituito.

5.2.1 Disaggregazione²³

Rimuovere il terreno di coltura cellulare dal contenitore con aspirazione e scartare, lavare il monostrato con soluzione priva di Ca⁺⁺ ed Mg⁺⁺ (ad esempio PBS 0.1M pH 7.2) per rimuovere tutte le tracce di siero. Asportare la soluzione salina per aspirazione.

Ripetere la procedura precedente (fasi importanti per allontanare tracce di siero che altrimenti potrebbero inibire l'azione della Tripsina).

Distribuire una soluzione pre-riscaldata (a 37°C) di Tripsina o Tripsina/Versene 0.25% nel contenitore della coltura cellulare per sommergere completamente il monostrato cellulare (5mL/75 cm² di fiasca) ed incubare a 37°C per 1 o 2 minuti.

Rimuovere con aspirazione la soluzione di Tripsina o Tripsina/Versene ed inserire in termostato il contenitore chiuso della coltura.

Le cellule stratificate sono lasciate ad incubare finché non assumono forma tondeggiante e si staccano dalla superficie. La progressione può essere controllata con l'osservazione al microscopio invertito. Il tempo richiesto per rimuovere le cellule dalla superficie dipende dalla loro tipologia, densità, concentrazione della Tripsina e tempo intercorso dall'ultima sottocoltura. La tripsina provoca danneggiamenti cellulari e il periodo di esposizione deve essere mantenuto al minimo.

Quando l'esposizione alla proceure di esposizione alla tripsina è completata, le cellule in sospensione appaiono tondeggianti.

Per inibire l'attività enzimatica residua, che potrebbe danneggiare le cellule, si consiglia d'aggiungere il più presto possibile alla sospensione cellulare un terreno contenente siero.

Le cellule possono essere di nuovo sospese con un delicato pipettaggio della sospensione cellulare. Possono essere eseguite successive diluizioni, se richieste, con conteggi (vitali) o sottocolture.

Se in questa fase si utilizza terreno privo di siero, sarà richiesto l'uso di un inibitore della tripsina.

Per garantire un accurato conteggio cellulare ed una crescita uniforme della risemina è richiesta la sottocoltura di una sospensione di cellule isolate (non aggregate).

5.2.2 Dopo trattamento

Le provette devono essere conservate a 37°C per il tempo richiesto.

Se necessario, incubare le provette per più di 4-5 giorni; se opportuno, le linee cellulari continue e semi-continue possono essere trasferite a 33°C. Le cellule primarie possono non tollerare il trasferimento a 33°C; questa procedura si avvale dell'esperienza maturata per ciascun tipo cellulare.

Trasferire le cellule nel nuovo terreno di mantenimento ogni 3-4 giorni. Dopo il loro trasferimento registrare sull'apposito modulo.

5.2.3 Prevenzione della contaminazione

Planimetria del Laboratorio

Le disponibilità possono dipendere dagli spazi e dall'impatto economico del sistema della coltura cellulare.

Aree da considerare

Spazio progettato per la produzione della coltura cellulare.

Spazio progettato per un'agevole pulizia.

Utilizzo di cabina a flusso laminare.

Uso di raggi UV per la sterilizzazione della cabina.

Inibizione d'accesso a questa area ad un numero eccessivo di persone del gruppo di lavoro.

Riduzione del rischio con smaltimento ad intervalli regolari delle colture cellulari continue ed acquisizione di nuove colture cellulari da una sorgente garantita.

Tecnica asettica

Tutti i componenti del gruppo di lavoro devono essere addestrati sulle nozioni di base dell'asepsi

Utilizzo di disinfettanti quali cloro ed alcool 70%

Buona tecnica di lavaggio delle mani

Uso di guanti monouso quando appropriato

Uso di bruciatore Bunsen per flambare le superfici

Disinfezione delle superfici di lavoro quando si cambia il numero di lotto delle linee cellulari utilizzate

Uso degli antibiotici

E' preferibile, ed in alcuni casi indispensabile che, per le colture dei virus, i laboratori utilizzino terreni privi di antibiotici. Tuttavia, a causa dei rischi di possibile contaminazione, la maggior parte dei laboratori utilizza alcuni antibiotici. Gli antibiotici di prima scelta includono Penicillina 100 UI/mL, Streptomina 100 µg/mL. L'uso addizionale di altri antibiotici dipende dall'isolamento del microrganismo contaminante e dalla prova di sensibilità da eseguire per la ricerca dell'antibiotico più appropriato.

5.2.4 Ricerca della Contaminazione

Ricerca di contaminazione batterica o fungina nel terreno

Devono essere approntati controlli di sterilità dei singoli componenti del terreno e di quelli di crescita e di mantenimento. Devono essere seminate un numero ridotto di aliquote delle componenti o del terreno completo in terreni che consentono la crescita di batteri e funghi, poi incubati e controllati ogni giorno per un periodo definito. Per la ricerca della contaminazione batterica è opportuno l'utilizzo del brodo nutriente. L'agar Sabouraud è indicato per la ricerca della contaminazione fungina. Tutte le colture devono essere incubate a 37°C ed a temperatura ambiente.

Devono essere scartati tutti i componenti che risultano contaminati. (In circostanze eccezionali possono essere filtrati/sterilizzati di nuovo e ricontrollati)²⁴.

Ricerca di contaminazione batterica e fungina nella coltura cellulare

La contaminazione batterica nei flaconi di coltura cellulare (diversa da micoplasma) e fungina è di solito visibile. La contaminazione di grado lieve può essere rilevata seminando la sospensione cellulare in un terreno di crescita per batteri o funghi.

Se le cellule contaminate non sono particolarmente pregiate devono essere eliminate. Può essere tentato un trattamento della coltura cellulare con antibiotici ma l'esito può non essere favorevole.

Ricerca del micoplasma nella coltura cellulare

Nelle colture cellulari le specie Micoplasma sono difficilmente rilevabili visivamente ed il primo segnale dell'infezione è spesso rappresentato da scarsa crescita cellulare e dal loro aspetto scadente.

I Micoplasmi possono essere rilevati con la crescita su specifici terreni di coltura o con tecniche di colorazione specifiche. (Il controllo per la ricerca dei micoplasmi nel terreno di coltura prima del suo utilizzo è difficoltoso ed i componenti devono essere acquistati con la garanzia che non contengono Micoplasmi).

Ricerca di contaminazione virale

I componenti dei terreni della coltura cellulare non sono saggiati di routine per la ricerca dei virus, tranne che da alcune fonti commerciali.

Le colture cellulari possono contenere virus latenti, alcuni dei quali possono essere rilevati al microscopio a luce normale, al microscopio elettronico o con emoadsorbimento. Alcune linee cellulari ottenute da fonti commerciali devono essere garantite per assenza di alcuni virus latenti.

Ricerca della contaminazione delle cellule con altre linee cellulari

La contaminazione si può realizzare prima del ricevimento in laboratorio o durante la manipolazione cellulare. La prova della purezza delle linee cellulari non è eseguita di routine e può essere fondamentale solo nell'ambito della ricerca. Questa può essere eseguita con microscopia normale. I metodi più complessi utilizzati nella ricerca di cellule estranee comprendono l'analisi genetica, l'elettroforesi degli isoenzimi e l'immunofluorescenza²⁵.

5.3 Identificazione

N/D

6 Assicurazione della Qualità'

6.1 Valutazione della Preparazione

Deve essere istituito un sistema di qualità per garantire una valutazione della qualità interna ed esterna e che le procedure del controllo di qualità sono mantenute ([Q 2 – Quality assurance in the diagnostic virology and serology laboratory](#))²⁶.

E' essenziale che i laboratori siano dotati di un'adeguata validazione dei metodi, della strumentazione e delle procedure analitiche commerciali e proprie, che evidenzino in modo adeguato la loro idoneità allo scopo²⁷.

Quando si riceve un nuovo approvvigionamento tutte le linee cellulari devono essere verificate per la sensibilità al virus; questa procedura deve essere ripetuta periodicamente, come di seguito specificato. La nuova fornitura deve essere certificata per assenza di batteri, micoplasmi, funghi e lieviti.

Per rimuovere la contaminazione da micoplasmi le linee cellulari continue devono essere trattate per 4 settimane in un terreno contenente Kanamicina (100 µg/mL)². Le colture che si ritiene possano essere contaminate da micoplasma devono essere controllate con microscopia a fluorescenza.

Le provette di ogni lotto di produzione devono essere sottoposte a controlli per:-

- Esame microscopico per verifica di morfologia soddisfacente, sviluppo e longevità.
- Assenza di contaminazione da virus, batteri, lieviti e/o funghi.

6.1.1 Crescita

La crescita deve essere verificata con l'esame microscopico. Le cellule devono raggiungere la crescita semiconfluente entro 48 ore in funzione della tipologia cellulare.

La morfologia deve essere compatibile con il tipo cellulare; ogni variazione deve essere registrata. Le cellule che manifestano variazioni morfologiche di ampio grado od incompatibili devono essere scartate e sostituite con quelle di un nuovo lotto.

6.1.2 Sterilità

Tutti i reagenti prodotti “in laboratorio” devono essere verificati per la sterilità con la coltura in terreno liquido per batteri (brodo di LabLemco o simili).

6.1.3 Sensibilità

- Adenovirus
- Herpes virus simplex
- Virus respiratorio sinciziale
- Rinovirus
- Virus influenza A (ceppo recente ottenuto dal Respiratory virus reference Laboratory)

Preparazione e conservazione del pannello di controllo dei virus Prova di sensibilità

Linea Cellulare	Frequenza	Virus in prova	Commenti
MRC-5	Al ricevimento e dopo scongelamento dall'azoto Liquido	VHS, VRS	
RhMk	Coltura primaria e dopo scongelamento dall'azoto Liquido	Polio Influenza A	Verificare con emoassorbimento
MDCK	Al ricevimento e dopo scongelamento dall'azoto Liquido	Influenza A	Verificare con emoassorbimento
HEP-2	Al ricevimento e dopo scongelamento dall'azoto liquido	Adenovirus VRS	
VERO	Al ricevimento e dopo scongelamento dall'azoto Liquido	VHS	
PLC-PRF5	Al ricevimento e dopo scongelamento dall'azoto Liquido	Adenovirus Polio	

- 1) I controlli virali devono essere inoculati in due provette di appropriate linee cellulari in modo analogo ai campioni ed incubati alla temperatura richiesta.
- 2) Includere sempre i controlli negativi.
- 3) Le linee cellulari devono essere controllate ogni giorno per l'ECP ed i risultati devono essere registrati.
- 4) Se un virus controllo/linea cellulare non fornisce il risultato atteso e la causa non può essere accertata o corretta, la linea cellulare deve essere scartata.

6.2 Assicurazione della Qualità Interna ed Esterna

N/D

7 Limitazioni

L'esito favorevole dell'isolamento dei microrganismi dipende da: corretto prelievo, trasporto, conservazione e procedura analitica del campione; dalla qualità, numero delle linee cellulari utilizzate, adeguate condizioni per le colture e dalla disponibilità di sufficiente/appropriata documentazione clinica.

La sensibilità deve essere verificata all'arrivo della fornitura ed ad intervalli regolari durante l'utilizzazione.

Prima del loro utilizzo le cellule rimosse dall'azoto liquido devono essere controllate per la loro sensibilità.

8 Procedure di Refertazione

N/D

9 Notifica alla HPE^{28,29} o Equivalente³⁰⁻³³

Le Norme di Denuncia della Health Protection Agency del 2010 richiedono ai laboratori diagnostici di comunicare alla Public Health England (PHE) l'identificazione degli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva. Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica, entro sette giorni. I casi urgenti possono essere notificati il più presto possibile oralmente, si raccomanda entro 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni. Secondo la Notification Regulations il laboratorio ricevente la notifica è il locale PHE Health Protection Team.. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori NHS segnala spontaneamente alla PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da agenti causali e molti PHE Health Protection Team hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

(Nota: La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per HIV & STIs, HCAIs e CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non nel 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories')

In Scozia^{30,31} e Galles³² e Irlanda del Nord³³ sono vigenti altre disposizioni.

Appendice Conservazione Delle Cellule in Azoto Liquido

Salute & Sicurezza

Nota: Per questa procedura deve essere eseguita la verifica del rischio locale.

Queste procedure devono essere eseguite da personale addestrato o da un gruppo ristretto di supervisori.

La temperatura dell'azoto liquido è di -196°C e nella fase di vapore del congelatore è compresa fra -120 e -170°C . Pertanto la manipolazione criogenica deve essere eseguita con estrema cautela, utilizzando equipaggiamento di protezione, in modo particolare guanti ed occhiali protettivi. In fase di evaporazione, il liquido produce un volume di gas 682 volte superiore a quello originale; il vapore è più pesante dell'aria. Pertanto, l'azoto liquido deve essere conservato e manipolato in una zona ben ventilata ove sia disponibile un dispositivo di controllo continuo per l'ossigeno associato ad un sistema di allarme.

Procedure di Routine & Manutenzione

La fase gassosa dei contenitori deve essere verificata ogni giorno.

I refrigeratori non devono *mai* essere lasciati vuoti, in caso contrario andranno perse preziose ed insostituibili risorse.

Materiale e Strumentazione

- 1) Solfossido dimetilico (SODM)

Nota Il SODM è tossico e deve essere manipolato con cautela. Può essere assorbito attraverso la cute e può causare irritazione e/o ustioni. E' teratogeno ed allergizzante. Calzare i guanti e se non si lavora con una cappa, indossare protezione per gli occhi

- 2) Terreno di crescita MEM come da richiesta della singola linea cellulare.
- 3) Provette criogeniche (plastica).
- 4) Strumentazione per refrigerazione che consente il raffreddamento controllato di 1°C al minuto.

Metodi

Per la conservazione in azoto liquido possono essere utilizzate colture cellulari in fase di attiva crescita. Compilare il "modulo di conservazione" quando le cellule sono state congelate ed inserite nell'azoto liquido. Registrare su un apposito modulo l'identificativo del bidone, il numero e posizione del porta provette e quella di ciascuna fiala posizionata sullo stesso.

- 1) Raccogliere le cellule utilizzando il reagente(i) specifico. In ogni caso, quando si raccolgono le cellule, lasciarle a contatto con il volume complessivo del reagente(i) e seguire il seguente metodo.
- 2) Quando tutte le cellule si sono staccate, pipettare la sospensione in modo asettico in un contenitore comune e centrifugare per 5 minuti a 1500-2000g.
- 3) Mentre le cellule sono nella centrifuga, preparare una soluzione al 10% di SODM nello specifico terreno di crescita cellulare.
- 4) Rimuovere il liquido soprannatante dalle cellule centrifugate e sospendere di nuovo in miscela SODM/mistura di terreno di crescita. Utilizzare circa 1.8 mL di terreno per provetta. Il loro numero è definito da quello delle fiasche spogliate dalle cellule e dalla loro densità di crescita.

- 5) Distribuire la sospensione in provette criostatiche. Contrassegnarle per tipo cellulare, No. di passaggio (se richiesto), numero della provetta e data.
- 6) Posizionare le provette nello strumento di congelamento per consentire il raffreddamento controllato di 1°C al minuto.
- 7) Quando si raggiunge la temperatura di -60°C od inferiore rimuovere le provette dallo strumento di congelamento.
- 8) Inserire le specifiche di ciascun lotto nell'apposito modulo di registrazione.

Rimozione dalla Conservazione

- 1). Individuare le provette necessarie e rimuoverle con attenzione dal porta provette. Quando queste sono rimosse dall'azoto liquido, trasferirle su un supporto in posizione predefinita e registrare la data di rimozione su un apposito modulo
- 2) Scongela rapidamente le provette in bagno termostatico a 37°C, evitando la loro immersione completa
- 3) Dopo scongelamento, centrifugare le provette a 1500-2000g per 5 minuti
- 4) Rimuovere il sopranatante e sospendere di nuovo le cellule nell'appropriato terreno di crescita
- 5) Contare le cellule, diluirle alla concentrazione richiesta e seminarle in fiasche o provette come richiesto
- 6) Registrare la data di rimozione sull'apposito modulo

Bibliografia

1. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:49-78.
2. Waymouth C. To disaggregate or not to disaggregate injury and cell disaggregation, transient or permanent? *In Vitro* 1974;10:97-111.
3. Lasfargues EY. Human Mammary Tumours. In: Kruse P, Patterson MK, editors. *Tissue Culture Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1973. p. 45-50.
4. Gwatkin RBL. Pronase. In: Kruse P, Patterson MK, editors. *Tissue Culture Methods and Applications*. New York: Academic Press; 1973. p. 3-5.
5. Wiepjes GJ, Prop FJ. Improved method for preparation of single-cell suspensions from mammary glands of adult virgin mouse. *Exp Cell Res* 1970;61:451-4.
6. 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 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".
7. 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. 7-12-1998. p. 1-37.
8. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
9. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
10. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
11. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
13. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
14. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

Procedura per Trattamento e Propagazione delle Colture Cellulari per Isolamento Virale

18. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
19. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
20. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
21. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
22. 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. 24-3-2005. p. 1-14
23. Freshney RI. Tumour cells disaggregated in collagenase. Lancet 1972;2:488-9.
24. McGarrity GJ. Detection of contamination. Methods Enzymol 1979;58:18-29.
25. Nelson-Rees WA, Daniels DW, Flandermeyer RR. Cross-contamination of cells in culture. Science 1981;212:446-52.
26. Snell JJS, Brown DFJ, Roberts C, editors. Quality Assurance Principles and Practice in the Microbiology Laboratory. London: Public Health Laboratory Service; 1999. p. 147-8
27. Clinical Pathology Accreditation (UK) Ltd. Standards for the Medical Laboratory v1.03 Section H6. Sheffield 2004. p. 56
28. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37
29. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
30. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
31. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
32. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
33. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).