



UNIONE EUROPEA
Fondo europeo di sviluppo regionale



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca



Ministero dello
Sviluppo Economico

investiamo nel vostro futuro

P.O.N. Ricerca e Competitività" 2007 - 2013 per le Regioni della Convergenza Codice Progetto PON02_00657_00186_3417512/1 (SIMISA) finanziato a valere sull'ASSE I - Sostegno ai mutamenti strutturali - Obiettivo Operativo: "Reti per il rafforzamento del potenziale scientifico-tecnologico delle Regioni della Convergenza" - Azione I: "Distretti di Alta Tecnologia e relative Reti" - CUP B31C12001210005

ALLEGATO TECNICO PER L'APPALTO DI SERVIZI INERENTI

**"L'allestimento, il mantenimento e la
spedizione di ceppi di protozoi quali: *Giardia
duodenalis, Cryptosporidium parvum e
Toxoplasma gondii*"**

PROGETTO

PON02_00186_3417512 "Strumenti Innovativi per il Miglioramento della
Sicurezza Alimentare: Prevenzione, Controllo, Correzione (S.I.Mi.S.A.)"

Finanziato dal

"MIUR"

PREMESSA

Il presente appalto regola la fornitura di servizi per l'allestimento, il mantenimento, l'imballaggio e la spedizione dei ceppi di protozoi quali, *Giardia duodenalis, Cryptosporidium parvum e Toxoplasma gondii* e qualsiasi onere necessario per fornire il materiale nel miglior modo possibile senza creare danni a cose o persone, il tutto nel rispetto delle leggi vigenti ed a regola d'arte.

CARATTERISTICHE TECNICHE

È necessario che vengano eseguiti i seguenti criteri:

✓ **Colture cellulari**

Per le colture cellulari, dall'allestimento e propagazione fino al controllo della fonte del materiale biologico, dalla loro preparazione, e fino alla conservazione, il Laboratorio esegua le linee guida del *Good Cell Culture Practices* (Coecke et al., 2005, ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 2, ATLA 33, 261-287).

Le caratteristiche fondamentali per lo sviluppo di linee cellulari per produzione o verifica sono:

1. autenticità, inclusa identità, provenienza, caratteristiche genotipiche/fenotipiche;
2. assenza di contaminazioni microbiologiche;
3. stabilità e integrità funzionale su passaggi estesi in vitro. Il ceppo di partenza deve essere libero da contaminanti che potrebbero trasmettere malattie ad incerta eziologia, come Creutzfeldt-Jakob o l'encefalopatia bovina spongiforme (BSE).

Inoltre, tenuto conto che le cellule in coltura possono cambiare le loro caratteristiche in risposta a cambiamenti nelle condizioni di coltura, o dopo un numero alto di passaggi in coltura, è richiesto che vengano controllate le principali variabili che possono avere un impatto significativo sulla coltura cellulare (es., composizione chimica, purezza e attività biologica di additivi specifici, siero, fattori di crescita, amminoacidi e altri composti promotori della crescita).

È richiesto, inoltre che i lotti dei reagenti per colture cellulari siano forniti con certificati di analisi e di origine che consentano loro idoneità che deve essere valutata in base alla specifica stabilità.

È vietato l'uso di siero o altri reagenti mal caratterizzati nella produzione di colture cellulari. Le caratteristiche di crescita devono essere definite sulla base delle variabili vitalità, morfologia, curve di crescita, tempo di duplicazione, clonaggio o efficienza di crescita in piastra, test di omogeneità. È richiesto che, vengano eseguiti periodici saggi di vitalità cellulare per la verifica delle colture cellulari, e per l'assegnazione di indici di pericolosità delle forme cistiche e/o delle forme libere dei parassiti in coltura per spedizione, produzione, stoccaggio e caratterizzazione.

È richiesto che venga valutata la vitalità delle cellule dopo crio-conservazione per il mantenimento di procedure di produzione cellulari efficienti ed affidabili, rispettando i valori di vitalità cellulare nelle scongelate superiori all' 80%. È inoltre richiesto che vengano praticati altri test di vitalità accessori per misurare diversi attributi di funzionalità cellulare (es., integrità della membrana, l'attività metabolica, replicazione del DNA).

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO
Dipartimento di Medicina Veterinaria

Budget spesa: - Terreni di colture cellulari: € 5.000,00
 - Test di vitalità colture: € 6.500,00
 - Kit real-time per verifica colture: € 10.000,00
 - Kit estrazione acidi nucleici: € 7.000,00
 - Materiale di consumo: € 10.000,00

Totale budget: € 38.500,00 I.V.A. esclusa

✓ **Conservazione dei ceppi**

Per la conservazione dei ceppi deve essere attuata la normative del WHO per le colture cellulari: le cellule devono essere conservate mediante crio-trattamento di un pool di cellule preparate in condizioni definite e sottoposte a test cellulari e molecolari di caratterizzazione specifica di pool di riferimento che costituiscono il dataset della bio-banca. Secondo quanto previsto dal Working Cell bank (WCB): è richiesto che una quantità di cellule di composizione uniforme derivata dalla banca di cellule ad uno specifico livello cellulare di passaggio, venga dispensato in aliquote in singoli contenitori adeguatamente crioconservati, di solito con congelamento a -160 °C o inferiore in azoto liquido, uno o più dei quali può poi essere utilizzato per scopi di produzione. Tutti i contenitori devono essere trattati in modo identico e, una volta rimossi dal contenitore di riferimento, non devono essere più riutilizzati in un percorso inverso, permettendo un percorso delle cellule solamente monodirezionale. Il trasferimento di fiale ad un altro sito di stoccaggio deve essere eseguito in condizioni altamente controllate.

Budget spesa: - N₂ liquido per crioconservazione: € 4.500,00
 - Materiale di consumo richiesto per crioconservazione: € 5.500,00

Totale budget: € 10.000,00 I.V.A. esclusa

✓ **Controllo e spedizione dei campioni biologici (stadi vitali: trofozoiti, sporozoit, oocisti/cisti)**

Per la spedizione dei campioni, è richiesto che siano seguiti i seguenti criteri:

1. Stabilità della temperatura;
2. Imballaggio di trasporto;
3. Infettività del materiale di trasporto.

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO
Dipartimento di Medicina Veterinaria

Le spedizioni devono svolgersi rispettando delle norme di merci pericolose previste dal Codice della Strada. Per il materiale infettivo, devono essere rispettate le direttive per il trasporto pericoloso (Circolari n° 16 del 20 luglio 1994 e n° 3 del 8 maggio 2003). Per la spedizione del materiale infettante deve essere utilizzato un triplo imballaggio, dotato di imballo esterno, intermedio o secondario, interno o primario. Il recipiente primario deve essere costituito da un contenitore a tenuta stagna contenente il campione. Il contenitore, se frangibile, deve essere avvolto con sufficiente materiale antiurto e con materiale assorbente in quantità sufficiente deve essere in grado di assorbire tutto il liquido in caso di rottura. Il materiale assorbente deve essere posto fra i recipienti primari ed il secondario. Il recipiente intermedio o secondario deve essere costituito da un secondo contenitore a tenuta stagna che serve a proteggere il contenitore primario. Diversi recipienti primari possono essere posti in un contenitore secondario. Il contenitore primario oppure quello secondario dovrà essere in grado di sopportare, senza perdita, una pressione interna maggiore o uguale a 95 kPa (in caso di trasporto secondo ADR) nell'intervallo di temperatura da - 40 °C a + 55 °C. Per l'imballo esterno il contenitore secondario dovrà essere posto in un ulteriore contenitore che lo protegga da agenti esterni durante il trasporto. Oltre a quanto sopra i contenitori per il trasporto devono avere anche i seguenti requisiti: - tenuta ermetica; - resistenza agli urti, a tutela degli operatori e del contenuto; - trasparenza, per monitorare costantemente l'integrità del contenuto; - autoclavabilità e sterilizzabilità, per evitare contaminazioni crociate; - chiusura rapida.

Per esigenze delle attività di ricerca i campioni devono essere forniti in tempi diversi, ovvero, ogni qualvolta sarà richiesto dal *DIMEV*.

Totale budget: -Costi di spedizione materiale biologico a temperatura controllata: € 8.877,05
I.V.A. esclusa.

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO
Dipartimento di Medicina Veterinaria

QUADRO RIEPILOGATIVO ECONOMICO DI APPALTO

-Terreni di colture cellulari:	€ 5.000,00
-Test di vitalità colture:	€ 6.500,00
-Kit real-time per verifica colture:	€ 10.000,00
-Kit estrazione acidi nucleici:	€ 7.000,00
-Materiale di consumo:	€ 10.000,00
-N ₂ liquido per crioconservazione:	€ 4.500,00
-Materiale di consumo utile per crioconservazione:	€ 5.500,00
-Costi di spedizione materiale biologico a temperatura controllata:	€ 8.877,05
TOTALE GENERALE A BASE D'ASTA	€ 57.377,05
IVA 22%	€ <u>12.622,95</u>
TOTALE COMPLESSIVO	€ 70.000,00

Il Responsabile Scientifico del Progetto
Prof. Domenico Otranto

Il Responsabile Unico del Procedimento
Prof. Canio Buonavoglia