

ALLEGATO A

 Civico Di Cristina Benfratelli Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione	Covid 19 Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali.	Rev.0/0 Data 26/03/2021 Pag. 1 di 9
--	--	---

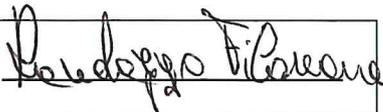
Sommario

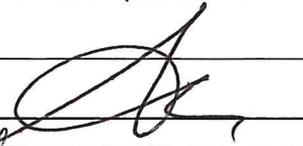
1. Introduzione.....	Pag. 2
2. Scopo/Obiettivi	Pag. 3
2.1. Scopo	000492 Pag. 3
2.2. Obiettivi	Pag. 3
3. Campo di applicazione	Pag. 3
4. Definizioni	Pag. 3
5. Modifiche alle Revisioni precedenti	Pag. 3
6. Descrizione delle attività	Pag. 4-5-6
7. Matrice delle responsabilità	Pag. 7
8. Diagramma di flusso.....	Pag. 8
9. Riferimenti e Allegati	Pag. 9
10.Indicatori/Parametri di controllo.....	Pag. 9
11.Lista di distribuzione.....	Pag. 9

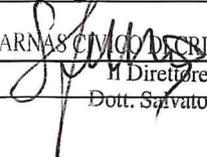
Redazione:
UOSD Laboratorio specialistico di oncologia
Dott. Francesco Gervasi_ Dott.ssa Lucia D'Amelio

UOC Medicina interna ad indirizzo geriatrico-riabilitativo
Direttore Prof. Salvatore Corrao_ Dott.ssa Adele Busardò

UOC Malattie Infettive Dott. Francesco Di Lorenzo

Revisione: U.O.S. Qualità e Rischio Clinico Dr.ssa Filomena Randazzo 

Verifica: Resp. U.O.S Qualità e Rischio Clinico Dott. A. Capodicasa 

Approvazione: Direttore Sanitario: Dr. Salvatore Requirez 
ARNAS CIVICO DI CRISTINA BENFRATELLI
Il Direttore Sanitario
Dott. Salvatore Requirez



Civico Di Cristina Benfratelli
Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione

Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali.

Rev.0/0

Data 26/03/2021

Pag. 2 di 9

1. Introduzione

Tra la fine del 2019 e l'inizio del 2020 è stato identificato un nuovo coronavirus, Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2 (SARS-Cov-2), appartenente al genere beta coronavirus. Questo si è diffuso rapidamente in tutto il mondo causando pandemia (dichiarata dall'OMS l'11 marzo 2020), contagiando milioni di persone in tutto e mettendo a dura prova il sistema sanitario globale.

Principali sintomi della malattia causata da SARS-Cov-2, designata COronaVirus Disease 2019 (Covid-19) dal World Health Organization (WHO) sono: febbre, dispnea, astenia, dolori muscolari, diarrea e polmonite.

Nelle forme più gravi causa la morte dei soggetti interessati.

Sono ormai numerose le evidenze scientifiche che dimostrano come nei pazienti colpiti da Covid-19 siano tanti i parametri di laboratorio alterati e l'assetto dei subset linfocitari, come la conta dei linfociti T CD4 e CD8, può fornire informazioni prognostiche, sia in termini di decorso clinico che di severità della malattia.

La principale via di contagio e trasmissione è stato evidenziato essere quella respiratoria, attraverso droplets e per contatto, diretto o indiretto. La contaminazione ambientale e il contenimento dei processi che producono aerosol sono pertanto un momento fondamentale nella prevenzione della diffusione di SARS-Cov-2 in generale e in particolare negli ambienti ospedalieri. Nondimeno è di grande importanza sapere che il virus viene inattivato da una varietà di soluzioni disinfettanti e detergenti (ipoclorito di sodio 1% di cloro attivo, etanolo 70%, perossido di idrogeno 0.5%, composti fenolici, composti di ammonio quaternario). Questi concetti sono alla base delle raccomandazioni e delle linee guida prodotte da organizzazioni internazionali e nazionali, tra cui principalmente WHO, OSHA (Occupational Safety and Health Administration, United States) Istituto Superiore di Sanità (ISS), per tutelare la biosafety dei laboratori diagnostici e di ricerca, consentire ai governi di tutto il mondo di emanare disposizioni e normative adeguate e permettere lo svolgimento delle attività lavorative e quotidiane contenendo al minimo il rischio di contagio.

Tutte queste indicazioni sottolineano l'importanza di dotazioni di protezione individuale proporzionate al livello di biosicurezza di ciascun laboratorio, la formazione del personale addetto e la disponibilità di strumentazione e apparecchiature adeguate.

Presso l'ARNAS Civico di Palermo, è presente un Servizio di diagnostica citofluorimetrica, sito nel laboratorio specialistico di oncologia, dotato di strumentazione di ultima generazione: due citofluorimetri a tre laser integrati con sistema semi-automatico di preparazione dei campioni.

Una simile organizzazione ha consentito di sostenere in tempo reale una improvvisa ed imprevista esigenza di salute pubblica, come quella dettata dal Covid-19, in totale allineamento con le indicazioni di Biosafety e standardizzazione segnalate dall'OMS e ISS: la lavorazione dei campioni biologici in laboratorio genera in maniera diversa aerosol e in questa emergenza tutte le attività hanno dovuto trovare il modo di contenere tale evenienza per garantire non solo la salute dei lavoratori coinvolti ma anche quella ambientale e quindi pubblica.



Civico Di Cristina Benfratelli
Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione

**Esecuzione test diagnostici
in Citometria a Flusso su
campioni ematici Covid-19 o
potenzialmente tali.**

Rev.0/0

Data 26/03/2021

Pag. 3 di 9

2. Scopo/Obiettivi

2.1. Scopo

Prevenire la diffusione di SARS-Cov2 negli ambienti ospedalieri a seguito di processi di lavorazione dei campioni biologici in laboratorio.

2.2. Obiettivi

Garantire la salute dei lavoratori coinvolti nelle attività di laboratorio, tutelare l'ambiente e quindi l'igiene pubblica.

3. Campo di applicazione

Le soluzioni proposte sono state adottate presso il Laboratorio di Citofluorimetria dell'ARNAS Civico, G. Di Cristina e Benfratelli in relazione a **tutte le procedure di diagnostica citofluorimetrica.**

4. Definizioni

COVID-19	CO rona VI rus D isease causata da SARS-Cov-2
DPI	Dispositivi di protezione Individuale
DM	Dispositivi Medici
ACDB	ARNAS Civico, Di Cristina Benfratelli
UOC	Unità Operativa Complessa
SPP	Servizio di Protezione e Prevenzione
HEPA	High-Efficiency Particulate Air
CE-IVD	Dispositivi Diagnostici in vitro conformi a requisiti direttive UE

5. Modifiche alle Revisioni precedenti

Nessuna versione precedente

 <p>Civico Di Cristina Benfratelli Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione</p>	<p>Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali.</p>	<p>Rev.0/0 Data 26/03/2021 Pag. 4 di 9</p>
---	--	--

6. Descrizione delle attività

Ambiente lavorativo

L'accesso al laboratorio in cui si svolge l'attività di citofluorimetria **non è consentito** a personale non autorizzato e non munito dei dispositivi di protezione previsti secondo (Raccomandazione di sicurezza delle attività di laboratorio D.lgs.81/08).

L'attività sia manuale sia strumentale per la diagnostica **citofluorimetrica** comporta **sviluppo di aerosol e droplets**, pertanto:

- Il personale addetto alla lavorazione dei campioni si attiene alle procedure previste relativamente a DPI da indossare e modalità di vestizione (Racc. ISS Feb 2020).
- Ogni attività manuale viene svolta sotto cappa Biohazard a flusso laminare con filtri HEPA e lampada UV-C per sanificazione.
- Ogni superficie di lavoro viene sanificata con soluzione a base di ipoclorito di sodio 1% di cloro attivo (come da linee guida **WHO-Interim Guidance**) dopo ogni utilizzo.
-

Premesse (attività)

Il Laboratorio Specialistico di Oncologia dell'ARNAS Civico di Palermo dispone di una tecnologia innovativa e standardizzata (sia a livello strumentale che di software analitici), frutto di una progettazione "lean". Alla luce delle nuove condizioni di salute pubblica, delle linee guida e raccomandazioni pubblicate in merito a livello nazionale e internazionale e delle procedure in essere presso il Nostro Centro, è stata fatta una iniziale rivalutazione delle attività per identificare le fasi particolarmente critiche in cui fosse necessario un allineamento delle misure di contenimento dei rischi rilevati.

L'identificazione prima e l'analisi dei rischi poi, hanno consentito, seguendo un approccio Plan-Do-Check-Act (PDCA), di adeguare in tempo reale tutta l'attività di diagnostica citofluorimetrica senza interrompere il Servizio, in totale allineamento con le indicazioni di Biosafety e standardizzazione segnalate dagli organi internazionali. Le attività di citofluorimetria e non, si svolgono attraverso tre fasi ovvero: fase preanalitica, fase analitica, fase post-analitica. Nel dettaglio saranno descritte le attività svolte dai professionisti nelle singole fasi.

Fase preanalitica:

1) I campioni biologici destinati ad analisi citofluorimetriche (sangue venoso periferico, sangue midollare, sospensioni cellulari di tessuti solidi, liquor) sono trasportati dall'OSS in appositi contenitori che ne evitano eventuale spandimento in caso di caduta e siano sanificabili con soluzioni a base di ipoclorito di sodio e/o irradiazione mediante raggi UV-C.

2) Una volta pervenuti in laboratorio i campioni vengono valutati TSLB (Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico) rispetto alla presenza o meno dei requisiti necessari alla lavorazione e accettazione (presenza coaguli, dati anagrafici, accettazione con codice a barre per i campioni provenienti da servizi interni).

In caso tali requisiti non siano soddisfatti si procede come previsto da procedure interne. (I campioni sono restituiti alle UU.OO. che li hanno prodotti a seguito di trascrizione su apposito registro cartaceo delle non conformità a cura del laboratorio).

Se idoneo alla lavorazione il campione viene posto in apposito contenitore (rack porta provette) sotto cappa Biohazard con flusso laminare acceso.

 <p>Civico Di Cristina Benfratelli Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione</p>	<p>Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali.</p>	<p>Rev.0/0 Data 26/03/2021 Pag. 5 di 9</p>
---	--	--

Fase Analitica: lavorazione in sistema chiuso CE IVD

In questa fase tutti gli operatori sono coinvolti ovvero: TSLB, Dirigenti Medici, Dirigenti Biologi.

1) Presso il nostro Centro sono disponibili due citofluorimetri automatici chiusi, tutti CE-IVD con software di analisi CE-IVD.

Il sistema chiuso utilizzato si compone di alloggi (rack) per provette vacutainer di varie dimensioni, alloggi per supporti tubi in polipropilene da 4 ml, alloggi per reagenti, alloggio per tanica di soluzione lisante.

Tutti i suddetti moduli sono in ambiente **unico** chiuso e vengono caricati e/o scaricati tramite appositi sportelli indipendenti tra loro.

Durante l'intero processo di lavorazione all'interno dello strumento le provette in polipropilene, in cui viene dispensato il campione e gli anticorpi monoclonali, sono aperte (senza tappo) e vengono periodicamente vortexate da un sistema automatico come previsto dalle metodiche specifiche (per consentire reazione antigene-anticorpo e poi per la miscelazione della soluzione lisante con il campione).

Questo determina la **formazione di aerosol all'interno del sistema** strumentale.

In caso di blocco di uno qualsiasi dei moduli prima descritti o in caso di necessità, se il sistema deve essere aperto si procede come di seguito:

1) tutto il personale sarà adeguatamente protetto (DPI previsti da procedure aziendali e ISS – Rapp.ISS COVID-19, n.2/2020)

2) sarà garantita **areazione ambientale** al fine di contenere eventuale dispersione causata dalla apertura dei cassette durante la lavorazione.

Per consentire la deposizione sulle superfici interne (poi sanificabili) di droplets ed evitarne la fuoriuscita all'apertura dei moduli, il laboratorio, essendo l'ambiente lavorativo unico si eseguono sedute di lavoro distanziate tra loro temporalmente di almeno un'ora dal termine di ciascuna.

Il sistema prevede tutte le fasi lavorative all'interno dello strumento (dispensazione campione nei tubi in polipropilene, dispensazione anticorpi monoclonali, incubazione al buio, dispensazione soluzione salina contenente fissativo o soluzione lisante per globuli rossi CE IVD inattivante per virus come HIV e SARS-Cov-2, contenente formaldeide).

In conformità con le linee guida cogenti (WHO e ISS) si preferisce ricorrere, laddove possibile, a metodiche di tipo **lyse-no-wash** (in cui la soluzione lisante non viene scartata, garantendo l'**inattivazione** di eventuali virus).

2) Il TSLB una volta conclusa la seduta di lavoro, se non è necessario processare altri campioni (numero di campioni superiore alla capacità massima del rack in dotazione, metodiche diverse come ad esempio lyse-wash) procede a spegnere lo strumento seguendo le operazioni previste come indicate dalla Ditta Produttrice, e a **sanificare superfici esterne ed interne accessibili** all'operatore, con soluzione di **ipoclorito di sodio 1%** (superfici esterne) e soluzione alcoolica a base di **etanolo 80%** (superfici interne). I campioni residui (in tubi opportunamente chiusi) vengono conservati se necessario in frigorifero dedicato ai soli campioni biologici, disposti su porta-provette avvolto da pellicola trasparente da laboratorio per limitare eventuali spandimenti.

Se non più necessari, invece, i campioni vengono **smaltiti** secondo le procedure previste nel contesto aziendale.

Le taniche di scarico vengono chiuse e smaltite a fine seduta di lavoro (C. le Min. Sal. 20 Feb 2020 n.5443).

 <p>Civico Di Cristina Benfratelli Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione</p>	<p>Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali.</p>	<p>Rev.0/0 Data 26/03/2021 Pag. 6 di 9</p>
---	--	---

Fase analitica: lavorazione con sistema aperto CE IVD

Anche in lavorazione con sistema aperto gli operatori coinvolti sono: i TSLB i Dir. Medici e i Dir. Biologi.

Nei casi in cui non è possibile seguire una metodica Lyse-no-wash o comunque non si dispone di un sistema completamente chiuso e automatizzato, si procede a lavorazione manuale sotto cappa Biohazard per tutte le fasi che prevedono concentrazione del campione e pre-lisi dello stesso (**fasi pre-inattivazione**)

I campioni una volta accettati vengono lavorati con materiale dedicato che rimane sotto la cappa di lavoro e verrà poi sanificato con soluzione di ipoclorito di sodio (1% di sodio attivo) e irradiazione con UV-C; si utilizzano **puntali con filtro**, e si scartano eventuali residui di campione in apposito contenitore monouso (provetta Falcon da 50 ml o Flask monouso) contenente ipoclorito di sodio, posto sempre sotto cappa.

Al momento della **centrifugazione** i campioni vengono posti negli alloggi specifici messi sotto cappa e poi chiusi con appositi **coperchi**, quindi inseriti in centrifuga.

Gli alloggi e i coperchi vengono sanificati con UV-C a fine lavorazione, insieme a tutto il materiale utilizzato.

Il campione è messo ad **incubare** con gli anticorpi monoclonali per il tempo richiesto dalla metodica pertinente, in un contenitore o alloggio dedicato, **sotto cappa Biohazard**.

Lo stesso procedimento è valido per l'incubazione con eventuali soluzioni lisanti.

Il trasferimento dei campioni al citofluorimetro, per la fase di acquisizione, avviene ponendo le provette in polipropilene da 4 ml nei carriers dello strumento, chiusi o coperti.

Una volta acquisito il campione si deve **fare attenzione a non far fuoriuscire eventuale aerosol prodotto** durante il vortexing automatico previsto dal citofluorimetro, e sanificare subito con ipoclorito di sodio 1% o etanolo 80% le superfici interne dell'alloggio.

Le taniche di scarico vengono chiuse e smaltite secondo procedure aziendali a fine seduta di lavoro.

Fase post-analitica:

- 1) Il Dir. Medico e/o il Dir. Biologo producono referto finale con conclusioni cliniche
- 2) L'U.O. invia OSS per acquisire i referti stampati

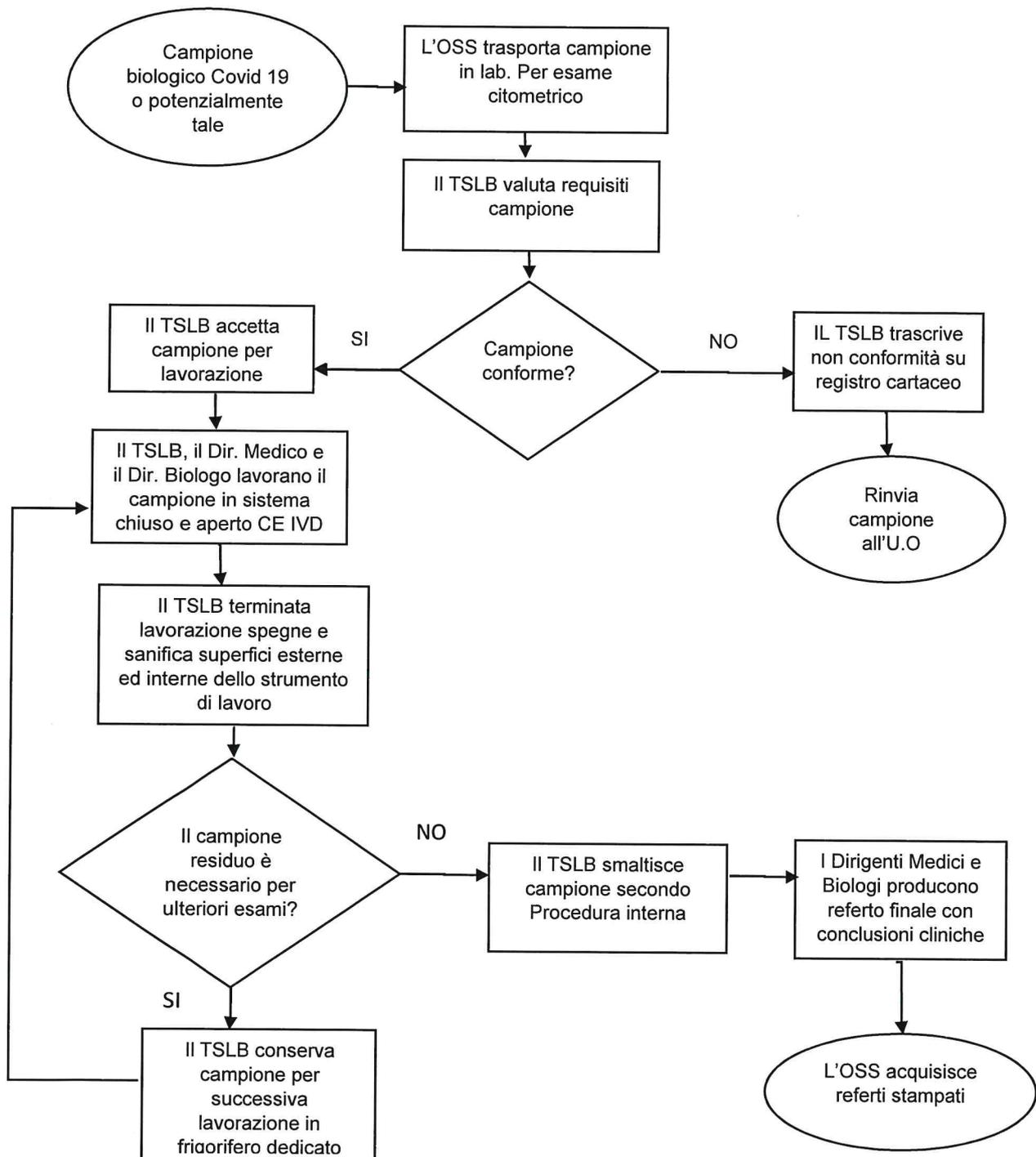
 <p>Civico Di Cristina Benfratelli Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione</p>	<p align="center">Covid 19</p> <p align="center">Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali.</p>	<p align="right">Rev.0/0</p> <p align="right">Data 26/03/2021</p> <p align="right">Pag. 7 di 9</p>
--	---	--

7. Matrice delle responsabilità
--

Attività	Responsabili			
	OSS	TSLB	Dir. Medico	Dir. Biologo
Trasporta campioni biologici destinati ad analisi citofluorimetriche	R			
Valuta requisiti di accettazione dei campioni biologici		R		
Trascrive non conformità su registro cartaceo se campione non accettato		R		
Rinvia campione non conforme all'UO		R		
Lavora in sistema chiuso e aperto CE IVD		R	R	R
Spegne e sanifica superficie esterne ed interne dello strumento di lavoro		R		
Conserva campioni residui in frigorifero dedicato se necessario per successiva lavorazione		R		
Smaltisce campioni se non più necessari		R		
Producono referto finale con conclusioni cliniche			R	R
Acquisisce referti stampati	R			



8. Diagramma di flusso





Civico Di Cristina Benfratelli
Azienda di Rilievo Nazionale ad Alta Specializzazione

Esecuzione test diagnostici in Citometria a Flusso su campioni ematici Covid-19 o potenzialmente tali

Rev.0/0

Data 26/03/2021

Pag. 9 di 9

9. Riferimenti e Allegati

Riferimenti Bibliografici

1. Decreto Legge del 23 febbraio 2020 n.6 - Misure urgenti in materia di contenimento e gestione dell'emergenza epidemiologica da COVID-19
2. GIMBE. Pandemia Coronavirus. <https://coronavirus.gimbe.org/emergenza-coronavirus-italia.it-IT.html>
3. ECDC. Risk assessment on COVID-19
<https://www.ecdc.europa.eu/en/current-risk-assessment-novel-coronavirus-situation>
4. Ministero della Salute. 22/02/2020 COVID-19. Nuove indicazioni e chiarimenti
<http://www.salute.gov.it/portale/nuovocoronavirus/archivioNormativaNuovoCoronavirus.jsp?lingua=italiano&testo=Nuove+indicazioni&tipologia=CIRCOLARE&giorno=22&mese=02&anno=2020&btnCerca=cerca>
5. Indicazioni ad interim per la sanificazione degli ambienti interni nel contesto sanitario e assistenziale per prevenire la trasmissione di SARS-Cov-2 – Rapporto ISS COVID-19 n. 20/2020 Rev. 14 maggio 2020
6. Indicazioni ad interim per un utilizzo razionale della protezioni per infezione da SARS-Cov-2 nelle attività sanitarie e sociosanitarie (assistenza a soggetti affetti da Covid-19) nell'attuale scenario emergenziale Sars-Cov-2 – Rapporto ISS COVID-19. N.2/2020 Rev.28 marzo 2020.
7. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19) – Interim guidance 12 February 2020 – World Health Organization (WHO).
8. World Health Organization. *Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: surveillance and case definitions*
<https://www.who.int/emergencies/disease/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>. Accessed 17 February 2020). 9. *Laboratory biosafety manual, 3rd ed.* Geneva: World Health Organization; 2004
(<https://www.who.int/csr/resurces/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>, accessed 14 February 2020)
10. *Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020.* Geneva: World Health Organization; 2019
(WHO/WHE/CPI/2019.20: <https://www.who.int/ihr/publications/WGO-WHE-CPI-2019.20/en/>. Accessed 14 February 2020)
11. Kampf G, Told D, Pfander S, Steinmann E. – *Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and its inactivation with biocidal agents.* J Hosp Infect. 2020:Feb 6.
12. CDC (Centers for Disease Control and prevention) Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Updated June 5, 2020

10. Indicatori/Parametri di controllo

N° campioni non lavorati in sistema chiuso/N° totale di campioni lavorati = 1%

11. Lista di distribuzione

UOSD Laboratorio specialistico di oncologia, UOC Malattie Infettive.