



DOCUMENTO SIAPEC-IAP:

**Gestione del rischio biologico
correlato alla epidemia di COVID-19
nella manipolazione dei campioni tissutali e citologici, con
particolare riguardo ai campioni a fresco o non
adeguatamente fissati.**

**24 marzo 2020
Versione 01/2020**

**Mattia Barbareschi 1, Valeria Ascoli 2, Emanuela Bonoldi 3, Alberto Cavazza 4,
Romano Colombari 5, Emanuele Dainese 6, Fabio Facchetti 7, Guido Fadda
8, Gerardo Ferrara 9, Filippo Fraggetta 10, Paolo Graziano 11, Giancarlo Murer 12
Esther Diana Rossi 13, Giulio Rossi 14, Giovanni Negri 15, Anna Sapino 16, per il
Gruppo di Gruppo Italiano di Studio Gestione, Qualità e Sicurezza**

1 U.O. Multizonale di Anatomia Patologica, Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, Trento

2 Dipartimento di Scienze Radiologiche, Oncologiche e Anatomo-Patologiche
Università Sapienza, Roma

3 S.C. Anatomia Istologia Patologica e Citogenetica, Niguarda Cancer Center, Milano

4 U.O. di Anatomia Patologica, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

5 U.O. Anatomia Patologica AULSS 9 Scaligera, Ospedale Fracastoro, San Bonifacio (VR)

6 U.O. di Anatomia Patologica, Ospedale di Lecco

7 U.O. di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Brescia

8 U.O. di Anatomia Patologica, Università Cattolica del sacro Cuore – Fondazione Policlinico Universitario “Agostino Gemelli”
IRCCS - Roma

9 U.O. di Anatomia Patologica, Ospedale di Macerata

10 U.O. di Anatomia Patologica, Ospedale Cannizzaro, Catania

11 U.O. di Anatomia Patologica, Fondazione (IRCCS) "Casa Sollievo della Sofferenza" San Giovanni Rotondo (FG), Italy

12 Servizio Protezione e Prevenzione, Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari, Trento

13 U.O. di Anatomia Patologica, Università Cattolica del sacro Cuore – Fondazione Policlinico Universitario “Agostino Gemelli”
IRCCS - Roma

14 U.O. di Anatomia Patologica, Santa Maria delle Croci, Ravenna

15 U.O. di Anatomia Patologica, Ospedale S. Maurizio di Bolzano

16 Direttrice Dip. di Scienze Mediche - Università degli Studi di Torino



Premesse generali sul rischio biologico in Anatomia Patologica

1. Le Unità Operative (UO) di Anatomia Patologica sono soggette sia a rischio chimico e sia a rischio biologico. Mentre il rischio chimico è stato oggetto negli anni passati di intensa attività di contenimento, meno si è fatto in termini di contenimento del rischio biologico. La attuale situazione epidemiologica relativa alla pandemia di SARS-CoV-2 ha posto in estremo risalto il problema. Si pongono quindi due linee di azione da perseguire: da un lato attivare immediatamente tutte quelle procedure per il contenimento della attuale situazione di rischio e dall'altro lato definire meglio in un prossimo futuro gli aspetti tecnico/organizzativi generali necessari per il contenimento del rischio biologico. Scopo del presente documento è di affrontare le problematiche contingenti, legate alla situazione epidemiologica attuale, al fine di attivare procedure per contenere immediatamente il rischio.
2. La valutazione del rischio biologico è un processo di analisi che deve essere effettuato attraverso le seguenti fasi: a) caratterizzazione del rischio, b) definizione di una strategia di contenimento¹.
3. La **caratterizzazione del rischio** (risk assessment) comprende la identificazione a) delle caratteristiche intrinseche del rischio (cioè dell'agente infettivo), b) delle procedure di laboratorio che verranno effettuate in relazione a tale rischio.
4. La **definizione delle strategie di contenimento del rischio** (risk mitigation) comprendono a) la definizione dell'appropriato livello di biosicurezza dei laboratori, b) la definizione dei dispositivi di protezione individuale che è necessario utilizzare, c) eventuale adeguamento delle infrastrutture e delle attrezzature, e d) la formazione del personale. Si sottolinea che il livello di biosicurezza del laboratorio, le cui caratteristiche sono stabilite dal D. Lgs. 81/2008 e Manuale di Biosicurezza dei Laboratori della WHO², deve derivare dalla caratterizzazione del rischio, piuttosto che automaticamente in base al solo gruppo di rischio a cui l'agente patogeno appartiene.
5. Il livello di biosicurezza 2 come stabilito dal Decreto Legislativo N° 81/08 - Allegato XLVII (Specifiche sulle misure di contenimento e sui livelli di contenimento) è il livello usualmente richiesto per le procedure di anatomia patologica. I criteri per valutare il livello di biosicurezza sono riportati nella tabella allegata. È necessario quindi che ogni singola UO di Anatomia

¹ Centers for Disease Control and Prevention, Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>

² World Health Organization. Laboratory biosafety manual. – 3rd ed, Geneva, 2004, <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>



SIAPEC - IAP

Società Italiana di Anatomia Patologica
e Citologia Diagnostica - Divisione Italiana
della International Academy of Pathology

Patologica verifichi, con il supporto del Servizio Prevenzione e Protezione, i criteri di biosicurezza e bioprotezione (es. facendo riferimento al Manuale di Biosicurezza dei Laboratori, WHO), utilizzando opportune checklist per verificare la aderenza a tali criteri (attenendosi alle indicazioni riportate nel Fascicolo VI ed 2010 dell'INAIL³).

³ Patrizia Anzidei, Maria Ilaria Barra, Roberto Belliato, Stefano Bergamasco, Adelina Brusco, Carlo Capussotto, Pietro De Blasi, Maria Rosaria Fizzano, Paola Freda, Liliana Frusteri, Raffaella Giovinazzo, Claudio Kunkar, Ruggero Maialetti, Salvatore Marcellino, Clara Resconi, Matteo Ritrovato, Federica Venanzetti, LA SICUREZZA IN OSPEDALE Strumenti di valutazione e gestione del rischio, Milano, 2012. <https://www.inail.it/cs/internet/docs/alg-la-sicurezza-in-ospedalefascicolo-6.pdf>



Considerazioni specifiche sulla situazione epidemiologica attuale

1. Il **virus SARS-Cov2** appartiene alla famiglia dei Coronaviridae. L'Allegato XLVI del D. Lgs. 81/08 classifica i virus appartenenti alla famiglia Coronaviridae come agenti biologici del gruppo di rischio 2. Tuttavia tale riferimento normativo non è da ritenersi appropriato per i Coronavirus di tipo SARS-Cov. Il virus **SARS-Cov2** è invece da **inquadarsi come gruppo di rischio 3⁴**, come indicato da Health and Safety Executive Advisory Committee on Dangerous Pathogens ⁵ e dal Royal College of Pathologists britannici ⁶ e dalla comunità scientifica statunitense ⁷ e canadese⁸.
2. Il SARS-Cov2 può essere **patogeno per inalazione di aerosol** (che in laboratorio può essere prodotto da centrifugazione o scuotimento con vortex, per esempio di preparati di biomateriali di origine polmonare) o **contaminazione delle mucose** da biomateriali infetti (es.: liquido di origine polmonare durante la dissezione di un campione a fresco o inadeguatamente fissato) o da superfici infette.
3. Il virus **SARS-Cov19 può persistere e sopravvivere a lungo nell'ambiente**: dati sperimentali dimostrano che il virus sopravvive, oltre le 72 ore su superfici di acciaio e plastica, e, seppur per tempi minori, anche su carta⁹.
4. Le indicazioni della Organizzazione Mondiale della Sanità in relazione alla esecuzione di test di laboratorio su pazienti affetti da COVID-19 indica che in generale le metodiche di laboratorio non propagative, quali sequenziamento e amplificazione di acidi nucleici (cioè dove NON si effettuano culture virali, isolamento di virus e test di neutralizzazione) devono essere effettate in

4

http://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/usmaf/formazione2018/Classificazione_degli_agenti_infettivi_in_r elazione_ alla_sicurezza_biologica.pdf

⁵ Health and Safety Executive Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved list of biological agents. secondary the Approved list of biological agents. Available: www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf

⁶ <https://www.rcpath.org/uploads/assets/d5e28baf-5789-4b0f-acecfe370eee6223/fe8fa85a-f004-4a0c-81ee4b2b9cd12cbf/Briefing-on-COVID-19-autopsy-Feb-2020.pdf> accessed 12th march 2020

⁷ Iwen PC, Stiles KL, Pentella MA. Safety Considerations in the Laboratory Testing of Specimens Suspected or Known to Contain the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Am J Clin Pathol. 2020 Mar 19. pii: aqaa047. doi: 10.1093/ajcp/aqaa047.

⁸ <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/biosafety-directives-advisories-notifications/novel-coronavirus-january-27.html>

⁹ van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. N Engl J Med. 2020 Mar 17. doi: 10.1056/NEJMc2004973.



laboratori con livello di biosicurezza BSL-2¹⁰. Il documento non cita comunque espressamente le attività di anatomia patologica.

5. Il virus SARS-Cov2 è stato identificato in massima parte in tessuti e biomateriali di origine polmonare, mentre più raramente è stato identificato in altri biomateriali, incluso il sangue¹¹ e il materiale fecale¹². Per quanto riguarda le urine i dati disponibili indicano che in tali materiali le indagini hanno dato risultati negativi¹³ o al più con valori di positività al di sotto del livello ritenuto soglia¹⁴. Esiste comunque il controverso problema della trasmissione fecale-orale del virus, che in questo momento impone di considerare cautelativamente come possibili fonti di infezione anche i campioni chirurgici del tratto gastrointestinale¹⁵.
6. Nelle UO di Anatomia Patologica gli agenti infettivi possono essere presenti
 - (i) nei tessuti di salme sottoposte a riscontro diagnostico
 - (ii) nei **materiali chirurgici e citologici a fresco e/o non adeguatamente fissati**, quali:
 - a. Campioni di tessuto pervenuti per qualsiasi motivo “a fresco”, compresi quelli pervenuti sotto-vuoto per problematiche relative alla restrizione dell’uso della formalina.
 - b. Campioni in formalina non adeguatamente fissati (per es.: campioni polmonari che galleggiano, campioni tissutali immersi in formalina per un tempo inferiore rispetto al codificato rapporto volume tissutale/tempo di fissazione).
 - c. Campioni tissutali per esami estemporanei al congelatore.
 - d. Campioni citologici a fresco (per es.: Lavaggio bronchiolo-alveolari, liquidi di versamento).
 - e. Campioni citologici in soluzioni preservanti che non garantiscono la inattivazione dei possibili agenti microbiologici.

¹⁰ World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 12 February 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138>

¹¹ Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, Tai Y, Bai C, Gao T, Song J, Xia P, Dong J, Zhao J, Wang FS. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020 Feb 18:S2213-2600(20)30076-X. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.

¹² Pan Y. et al. 2020. Viral load of SARS CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* DOI:10.1016/S1473-3099(20)30113-4.

¹³ Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020 Mar 11. doi:10.1001/jama.2020.3786. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32159775; PubMed Central PMCID: PMC7066521.

¹⁴ Kim J.Y. et al. 2020. Viral load kinetics of SARS CoV-2 infection in first two patients in Korea. *J. Korean Med Sci*. 35(7):e86. DOI.org/10.3346/jkms.2020.35.e86.

¹⁵ <https://www.medpagetoday.com/infectiousdisease/covid19/85315>

- f. Campioni di citologia aspirativa effettuati in citoassistenza (rapid on-site evaluation).
 - g. Campioni tissutali/citologici a fresco per esame citofluorimetrico.
7. I **materiali tissutali fissati completamente in formalina o i campioni citologici fissati in alcool 95**, non sono da considerarsi a rischio microbiologico. La formalina neutra tamponata al 10% consente di inattivare la quasi totalità delle particelle virali nei tessuti dopo 1 giorno di fissazione ad una temperatura tra i 25°C e i 37°C^{16 17}. Tali considerazioni valgono a maggior ragione per campioni fissati ed inclusi in paraffina, che oltre al procedimento chimico di fissazione, subiscono ripetuti trattamenti al calore.
8. È pertanto consigliabile, se non si dispone di una adeguata organizzazione di protezione degli operatori (strutture e DPI), di:
- a. esaminare i campioni solo dopo adeguata fissazione in formalina, evitando di manipolare campioni non fissati adeguatamente.
 - b. nelle attuali condizioni di emergenza si consiglia di far prevalere il contenimento del rischio biologico su quello chimico, promuovendo l'utilizzo di formalina anche laddove si sono implementate tecnologie di conservazione sotto-vuoto/atmosfera controllata formalin-free.
9. Tutti i **materiali chirurgici e citologici a fresco e/o non adeguatamente fissati**, devono essere considerati potenzialmente infettivi e le sale settorie e i laboratori delle UO di Anatomia Patologica che li trattano devono quindi soddisfare gli adeguati requisiti di biosicurezza. È quindi necessario disporre di cappe per il contenimento del rischio biologico, con adeguati sistemi di filtraggio, e dei dispositivi di protezione individuale. Le cappe si distinguono in cappe chimiche aspiranti (che sono le cappe maggiormente disponibili nelle nostre strutture) e cappe biologiche che presentano una classificazione in base alle caratteristiche costruttive quindi di protezione. Le cappe ideali sono quelle con caratteristiche di biosicurezza di classe II B2 (che sono a pressione negativa rispetto alla stanza e tutta l'aria esausta è espulsa all'esterno tramite un dotto e un filtro HEPA); se non si dispone di cappa con tali caratteristiche, è comunque indispensabile, utilizzare o una cappa biologica di classe inferiore o una cappa chimica (questa ultima con aspirazione completa ed espulsione totale verso l'esterno previa filtrazione HEPA; non sono

¹⁶ Henwood AF Coronavirus disinfection in histopathology. J Histotechnol. 2020 Mar 1:1-3. doi: 10.1080/01478885.2020.1734718.

¹⁷ Darnell ME, Taylor DR. Evaluation of inactivation methods for severe acute respiratory syndrome coronavirus in noncellular blood products. Transfusion. 2006 Oct;46(10):1770-7. DOI:10.1111/j.1537-2995.2006.00976.x



appropriate cappe chimiche a ricircolo d'aria dopo filtrazione)¹⁸; utile la possibilità di utilizzare sterilizzazione con UVC delle cappe.

Soluzioni pragmatiche per la situazione contingente SARS-CoV-2 nella manipolazione di campioni chirurgici e citologici a fresco e/o non adeguatamente fissati

In generale il CDC statunitense indica che tutte le attività di Anatomia Patologica, incluse le attività di patologia molecolare, effettuate su campioni fissati in formalina o comunque inattivati, di pazienti positivi o sospetti per infezione da SARS-CoV-2 devono essere effettuati in laboratori con livello di sicurezza BSL2¹⁹.

I dati attualmente disponibili indicano con ragionevole certezza che la fissazione in formalina a temperatura ambiente per 1 giorno, la fissazione in etanolo 95°, e i trattamenti al calore nel range dei valori per la infiltrazione in paraffina, sono sufficienti a inattivare i virus SARS. Pertanto ci focalizziamo qui solo su alcuni aspetti pragmatici relativi alla manipolazione di campioni chirurgici e citologici a fresco e/o non adeguatamente fissati. Non si considerano qui inoltre le problematiche relative alla gestione delle autopsie e dei relativi campioni autoptici che sono state recentemente esaminate in dettaglio dal Royal College of Pathologists²⁰, dall'European Centre for Disease Prevention and Control²¹ e dalla SIAPEC²².

1. Tutti i materiali, indipendentemente dal tipo di conservazione, devono essere sempre accompagnati da relativa richiesta comprensiva di **adeguate notizie cliniche relative allo stato di possibile infezione da SARS-Cov-2**, ed in

¹⁸ <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafety-guidelines.html>

Clinical laboratories that perform routine diagnostic tests on serum, stool, blood, or urine specimens should follow standard laboratory practices, including Standard Precautions, when handling potential COVID-19 patient specimens. However, **any procedure with the potential to generate aerosols or droplets (e.g., vortexing, centrifuging, pipetting) should be performed in a certified Class II BSC. If no certified Class II BSC is available, or if instruments (e.g., centrifuges, analyzers, automated extraction equipment) cannot be used inside a BSC, extra precautions can be used to provide a barrier between the specimen and personnel.** Examples of these precautions include using additional personal protective equipment (PPE) (e.g., mask, respirator, face shield) or other physical barriers (e.g., splash shield, centrifuge safety cups, sealed centrifuge rotors) to reduce the risk of exposure to laboratory personnel.

¹⁹ <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>

²⁰ Osborn M, Lucas S, Stewart R, Swift B, Youd E, Royal College of Pathologist (2020) Briefing on COVID-19 Autopsy practice relating to possible cases of COVID-19 (2019-nCov, novel coronavirus from China 2019/2020)

<https://www.rcpath.org/uploads/assets/d5e28baf-5789-4b0f-acecfe370eee6223/fe8fa85a-f004-4a0c-81ee4b2b9cd12cbf/Briefing-on-COVID-19-autopsy-Feb-2020.pdf> accessed 12 th march 2020

²¹ <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/considerations-related-safe-handling-bodies-deceased-persons-suspected-or>

²² <https://www.siapec.it/public/uploads/archiviodocumenti/PRD%20COVID-19-9%20FV%20clean.pdf>



- particolare che tracci i pazienti: a) positivi per SARS-CoV-2, b) sospetti per SARS-CoV-2. Se i materiali biologici inviati provengono da pazienti positivi o sospetti per SARS-CoV-2, i contenitori nei quali vengono raccolti devono essere trasportati in un contenitore secondario monouso (es.: transbag). In ogni caso, data la situazione epidemiologica attuale, tutti i casi privi di entrambe le indicazioni devono essere considerati potenzialmente a rischio per SARS-CoV-2.
2. Laddove possibile è auspicabile che **le richieste dei campioni siano dematerializzate** (order entry elettronico, invio della richiesta via fax) al fine di ridurre il trasferimento di materiali cartacei. In caso di invio di richiesta cartacea di pazienti sospetti/positivi per SARS-Cov2, questa deve essere inserita nella apposita tasca del contenitore secondario monouso.
 3. Si sconsiglia l'invio di campioni mediante sistemi di posta pneumatica.
 4. Si **sconsiglia fortemente l'esecuzione di esami estemporanei in pazienti positivi per o sospetti per SARS-CoV-2**²³. Tale raccomandazione è particolarmente forte per quanto attiene i materiali provenienti dalle vie aeree (dalle vie aeree superiori ai polmoni). Se comunque fosse assolutamente indispensabile effettuare un esame al criostato di tali materiali, gli esami devono essere effettuati possibilmente in criostati che consentano il contenimento dell'aerosol, e da personale adeguatamente formato e con adeguati DPI. Ribadiamo che data la situazione epidemiologica attuale, tutti i campioni delle vie aeree, devono essere considerati potenzialmente a rischio per SARS-CoV-2, e trattati quindi con le procedure qui descritte.
 5. La **manipolazione di materiali citologici non fissati** deve essere eseguita in condizioni di massima sicurezza. Le manipolazioni con strumentazioni che generano aerosol (per es. centrifughe e vortex), di materiali e citologici a fresco e/o non adeguatamente fissati, anche se non di pazienti positivi/sospetti, devono essere eseguite in modo da impedire la contaminazione ambientale. Se vengono eseguiti tutti gli steps di allestimento dei campioni citologici a fresco sotto cappa con tutti i DPI previsti, si possono allestire i campioni con ragionevole sicurezza. Le centrifughe devono possibilmente essere dotate di doppio coperchio a tenuta; eventualmente può essere valutato il posizionamento sotto cappa delle attrezzature se di dimensioni contenute, previa valutazione delle alterazioni della dinamica della aspirazione determinata dalla presenza della strumentazione stessa. In alternativa **può essere opportuno fissare i campioni una volta giunti in**

²³ Iwen PC, Stiles KL, Pentella MA. Safety Considerations in the Laboratory Testing of Specimens Suspected or Known to Contain the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Am J Clin Pathol. 2020 Mar 19. pii: aqaa047. doi: 10.1093/ajcp/aqaa047



laboratorio. Tale procedimento può essere variabile a seconda del tipo e della quantità del campione. Si propongono di seguito alcune possibili procedure utilizzabili a tale scopo.

- i) **Espettorato.** SOTTO CAPPÀ si apre il contenitore e si aggiunge alcol al 70% in proporzione 1:1. Questo trattamento fa coagulare il muco e potrebbe essere difficile strisciare il campione; quindi si deve procedere alla post-fissazione in formalina e inclusione in paraffina. In alternativa si può fissare da subito in formalina. A tal fine si può indicare ai clinici di far espettorare il paziente in ampio contenitore standard per l'istologia che contiene un tampone e nel coperchio la formalina. Il campione viene poi utilizzato per citoincluso in paraffina.
- ii) **Lavaggio bronchiale e affini.** SOTTO CAPPÀ si aggiunge alcol a 95% nella proporzione 2:1, cioè il doppio di alcool rispetto al campione. In genere i campioni sono di circa di 40-50 ml in volume (20 ml di fisiologica + 20 o 25 ml di campione vero e proprio). Questo trattamento fa coagulare il muco (più fluido dell'espettorato) e potrebbe essere difficile strisciare il campione; quindi si deve procedere alla post-fissazione in formalina e inclusione in paraffina. In alternativa si può fissare in formalina da subito.
- iii) **Versamenti sierosi.** Dipende dalla quantità che viene inviata e dalle concentrazioni di cellule. Volumi MINIMI di 75-100 ml sono considerati in letteratura idonei per la ricerca di cellule neoplastiche; la fissazione alcolica non viene raccomandata di routine. Aliquotare una quantità di volume SOTTO CAPPÀ, centrifugare, eliminare il soprannatante SOTTO CAPPÀ e aggiungere alcol a 70% al sedimento. Questa procedura irrigidisce le cellule che poi non aderiscono bene ai vetrini rischiando di perderle durante la colorazione. Si deve quindi procedere in via preferenziale alla post-fissazione in formalina e inclusione in paraffina. Il 5% dei pazienti con polmonite COVID-19 ha versamento pleurico, anche bilaterale, che parallela il decorso clinico²⁴.
- iv) **Urine.** SOTTO CAPPÀ si aggiunge alcol a 95% nella proporzione 2:1, cioè il doppio di alcool rispetto al campione. Tuttavia occorre ricordare che le evidenze scientifiche di isolamento del virus non hanno dimostrato presenza di virus in campioni di urine di pazienti affetti da COVID-19²⁵.
- v) **Liquor.** Difficile valutare la modalità di allestimento perché la quantità di cellule è di norma molto bassa. Non è consigliato il pretrattamento in alcol.

²⁴ Shi H, Han X, Jiang N, Cao Y, Alwalid O, Gu J, Fan Y, Zheng C. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2020 Feb 24. pii: S1473-3099(20)30086-4. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30086-4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32105637.

²⁵ Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020 Mar 11. doi:10.1001/jama.2020.3786. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32159775; PubMed Central PMCID: PMC7066521.



E' necessario allestire l'imbutino e i vetrini ed inserire il liquor SOTTO CAPPAA, citocentrifugare, estrarre il complesso imbutino-vetrini e proseguire il lavoro sotto cappa.

- 6) Manipolazione di campioni di citologia in fase liquida (c.d strato sottile) per citologie extravaginali. Poiché non vi sono ancora dati sulla capacità dei liquidi di trasporto di inattivare il virus, tali campioni devono essere manipolati come se fossero potenzialmente infettivi, effettuando tutte le attività, comprese centrifugazioni e vortex sotto cappa, possibilmente biologica, utilizzando gli appropriati DPI. Eventualmente può essere utilizzato come mezzo di trasporto, in un situazione off-label, l'alcol 70°²⁶. Campioni di citologie cervicali di screening in fase liquida non dovrebbero pervenire nella fase di emergenza. Anche in questo caso non vi sono ancora dati sulla capacità dei liquidi di trasporto di inattivare il virus. La percentuale di alcol nei vials per la citologia cervicovaginale non supera, per le marche più diffuse in Italia, il 55%.
- 7) Come indicazione pragmatica, tutti i campioni chirurgici pervenuti in formalina, ma che non sono completamente fissati, sono da considerarsi a rischio, ed è opportuno farli fissare completamente; fra questi, soprattutto quelli di origine polmonare e del colon possono essere sezionati grossolanamente o infiltrati con formalina con l'uso di una siringa, mantenendoli all'interno del loro contenitore di origine al fine di facilitare la fissazione, per un successivo adeguato campionamento del pezzo operatorio una volta fissato completamente.
- 8) Il personale che manipola i materiali biologici a fresco o incompletamente fissati, deve sempre **indossare gli adeguati DPI**, come ad esempio l'allestimento dei preparati istologici per esame estemporaneo:
 - a. maschera FFP3 (se non disponibile tale maschera, si usi una maschera FFP2),
 - b. adeguata protezione da schizzi di fluidi del viso, occhi e bocca (protezione in plastica o una maschera/occhiali di protezione – non da vista!),
 - c. doppi guanti e camice impermeabile;
 - d. al termine di ogni processo lavorativo ciascun operatore deve rimuovere correttamente i DPI e lavarsi le mani prima di uscire dal laboratorio ed entrare in aree pulite.

Esiste una problematica di consumo di DPI per la effettuazione degli esami estemporanei, non essendo tale attività continuativa. Laddove il flusso e l'organizzazione del lavoro lo renda possibile, si suggerisce di accorpate la

²⁶ Esther Diana Rossi, Guido Fadda, Antonino Mule', Gian Franco Zannoni, Guido Rindi: Histology and cytology samples from patients infected by the novel coronavirus covid-19 - An Italian institutional experience for biosafety procedures Cancer Cytopathology (submitted)



attività di campionamento macroscopico con quella della manipolazione dei campioni per estemporanea, in modo da utilizzare lo stesso personale.

9. Il virus **SARS-Cov19 può persistere e sopravvivere a lungo nell'ambiente**: dati sperimentali dimostrano che il virus sopravvive, oltre le 72 ore su superfici di acciaio e plastica, e, seppur in modo minore, anche su carta²⁷. Pertanto tutte le superfici e gli strumenti possibilmente contaminati con SARS-CoV-2 (es.: centrifughe, vortex, cappe, piani di taglio, criostati) devono essere adeguatamente decontaminate, impiegando prodotti contenenti agenti antimicrobici noti per essere efficaci contro i coronavirus²⁸. Può essere utile associare una appropriata sorgente di raggi ultravioletti UVC per almeno 60 minuti, anche se si fa presente che i raggi UV **non** sono efficaci nella decontaminazione di aree nelle quali siano posizionati oggetti, ad esempio contenitori, portalame, etc. posti sotto cappa, in quanto gli UV decontaminano solo le superficie. L'uso di l'ipoclorito di sodio allo 0,1% o allo 0,5%, di etanolo 70% o di perossido di idrogeno allo 0,5% sono appropriati per la decontaminazione. Per una migliore decontaminazione del vano criostato è utile l'uso di dispersori a mano (spray) contenenti etanolo 70% (attenzione: è un liquido altamente infiammabile), in modo da raggiungere gli interstizi del vano stesso.
10. Infine ribadiamo che i tessuti fissati ed inclusi in paraffina sono da considerarsi a rischio sostanzialmente assente, in quanto sia il trattamento con formalina che le temperature utilizzate per la infiltrazione in paraffina, sono misure adeguate alla inattivazione dei virus SARS-Cov.

²⁷ van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. N Engl J Med. 2020 Mar 17. doi: 10.1056/NEJMc2004973.

²⁸ <https://www.epa.gov/pesticide-registration/list-n-disinfectants-use-against-sars-cov-2>



Allegato 1

Specifiche sulle misure di contenimento e sui livelli di contenimento come stabilito dal Decreto Legislativo N° 81/08 - Allegato XLVII

	Misure di contenimento	Livelli di contenimento		
		2	3	4
1.	La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio	No	Raccomandato	Sì
2.	L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile	No	Sì sull'aria estratta	Sì sull'aria immessa e su quella estratta
3.	L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Raccomandato	Sì	Sì attraverso una camera di compensazione
4.	La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	No	Raccomandato	Sì
5.	Specifiche procedure di disinfezione	Sì	Sì	Sì
6.	La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	No	Raccomandato	Sì
7.	Controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti	Raccomandato	Sì	Sì
8.	Superfici idrorepellenti e di facile pulitura	Sì per il banco di lavoro	Sì per il banco di lavoro e il pavimento	Sì per il banco di lavoro, l'arredo, i muri, il pavimento e il soffitto
9.	Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Raccomandato	Sì	Sì
10.	Deposito sicuro per agenti biologici	Sì	Sì	Sì deposito sicuro
11.	Finestra d'ispezione o altro dispositivo che permetta di vederne gli occupanti	Raccomandato	Raccomandato	Sì
12.	I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria	No	Raccomandato	Sì
13.	I materiali infetti devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Ove opportuno	Sì quando l'infezione è veicolata dall'aria	Sì
14.	Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse di animali	Raccomandato	Sì se disponibile	Sì sul posto
15.	Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Sì	Sì	Sì con sterilizzazione
16.	Trattamento delle acque reflue	No	Facoltativo	Sì