



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

LIVELLO: Regione Lazio

Fondazione Policlinico Tor Vergata - Roma

MACROTEMA

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

Il percorso di accettazione e lavorazione dei campioni per citometria a flusso: adeguamento ed innovazione determinate dall'emergenza Covid-19

Gruppo di Lavoro: Dott.ssa Daniela Fraboni¹, Prof. Francesco Buccisano², Dott.ssa Consuelo Conti¹, Dott.ssa Maria Antonietta Irno Consalvo¹, Dott. Paolo Casalino³, Dott.ssa Carla Cianciullo⁴, Dott. Paolo Abundo⁵, Prof.ssa Maria Teresa Voso¹.

¹ UOSD Diagnostica Avanzata Oncoematologica, Fondazione Policlinico Tor Vergata - Roma

² UOSD Malattie Mieloproliferative, Fondazione Policlinico Tor Vergata – Roma

³ UOSD Direzione Tecnica

⁴ UOC Acquisizioni Beni Servizi e Lavori

⁵ UOSD Servizio Ingegneria Medica

Riferimento e-mail e telefono per contatto:

Dr.ssa Daniela Fraboni

daniela.fraboni@ptvonline.it

0039 06 2090 2148

Laboratorio Citofluorimetria

UOSD Diagnostica Avanzata Oncoematologica, Fondazione Policlinico Tor Vergata - Roma



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

1.0 Premessa

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, e 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.



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

Presso il Policlinico Tor Vergata di Roma, è presente un Servizio centralizzato di diagnostica citofluorimetrica, dotato di strumentazione di ultima generazione: un citofluorimetro a tre laser integrato con sistema chiuso standardizzato di preparazione dei campioni; due citofluorimetri singoli a tre laser.

Una simile organizzazione ha consentito di sostenere in tempo reale una improvvisa ed imprevedibile 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.

2.0 Scopo

Il presente documento descrive le soluzioni organizzative, strutturali e diagnostiche attuate a partire dal 09/03/2020 in piena emergenza COVID-19, per la lavorazione dei campioni di pazienti Covid positivi e non con tecniche di citometria a flusso, destinate alla diagnostica ematologica, immunologica ed infettivologica, al fine di ridurre il rischio di contagio da SARS-Cov-2 per gli operatori, per l'ambiente ospedaliero e per l'ambiente in genere.

3.0 Campo di applicazione

Le soluzioni proposte sono state adottate presso il Laboratorio di Citofluorimetria della Fondazione Policlinico Tor Vergata di Roma in relazione a **tutte le procedure di diagnostica citofluorimetrica**.



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

4.0 Definizioni

COVID-19	CO rona VI rus D isease causata da SARS-Cov-2
DPI	Dispositivi di protezione Individuale
DM	Dispositivi Medici
PTV	Policlinico Tor Vergata
UOC	Unità Operativa Complessa
SPP	Servizio di Protezione e Prevenzione
HEPA	High-Efficiency Particulate Air

5.0 Descrizione delle attività

5.1 Progettazione delle attività

L'Unità di diagnostica citofluorimetrica del Policlinico Tor Vergata 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.



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

5.2 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: l'**attività** sia manuale sia strumentale per la diagnostica **citofluorimetrica** comporta **sviluppo** di **aerosol** e **droplets**.

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.

5.3 Accettazione e presa in carico dei campioni

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

Una volta pervenuti in laboratorio i campioni vengono valutati 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.

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



5.4 Lavorazione in sistema chiuso CE IVD

Presso il nostro Centro è disponibile un citofluorimetro automatico chiuso e due citofluorimetri aperti non automatizzati, 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. Per tale motivo, **in caso di blocco** di uno qualsiasi dei moduli prima descritti o in caso di necessità, se il sistema deve essere aperto ci si assicura che nell'ambiente esterno al citofluorimetro tutto il personale sia adeguatamente protetto (DPI previsti da procedure aziendali e ISS – Rapp.ISS COVID-19, n.2/2020) e sia garantita **aereazione ambientale** al fine di contenere eventuale dispersione causata dalla apertura dei cassette durante la lavorazione.

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



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

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).

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) si procede a spegnere lo strumento seguendo le operazioni previste come da indicazioni della Ditta Produttrice, e a **sanificare** poi **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 MinSal 20 Feb 2020 n.5443).

5.5 Lavorazione con sistema aperto CE IVD

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**)



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

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 molta 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.



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

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).



Osservatorio Nazionale

delle Buone Pratiche sulla sicurezza nella Sanità

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