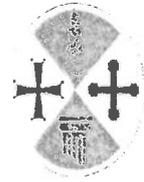




SERVIZIO
SANITARIO
REGIONALE



GRANDE OSPEDALE METROPOLITANO
"Bianchi Melacrino Morelli"
Reggio Calabria



REGIONE CALABRIA

Dipartimento Tutela della Salute
e Politiche Sanitarie

Procedura Operativa Diagnostica Microbiologica COVID-19

Ed. 01 Rev.	00	
Data	15-04-2020	
Redazione	Direttore U.O.C. Conte Marco	<i>M. Conte</i>
	Gruppo di Lavoro Dir. Biologi: Cuzzola Maria, d'Aleo Francesco, Meliadò Antonietta, Oliva Angela TLSB: Bosurgi Francesco, Lo Giudice Angela, Papola Carmelo	
	Infermieri: Morabito Francesca, Zumbo Maria	
Verifica	Responsabile U.O.S.D. Governo Clinico e Risk Management	<i>[Signature]</i>
	Direttore Medico di Presidio	<i>[Signature]</i>
Approvazione	Direttore Sanitario Aziendale	<i>[Signature]</i>



<p style="text-align: center;">Indice:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Premessa 2. Diagnosi di laboratorio 3. Scopo e Campo di Applicazione 4. Criticità della diagnostica di laboratorio Responsabilità 5. Tipologia di campione 6. Tipologia di campione e conservazione 7. Strumenti 8. Modalità esecuzione tampone 9. Kit in uso CE/IVD 10. Materiale accessorio 11. Strumentazione elenco 12. Registrazioni, moduli, documenti 13. Accettazione 14. Modalità esecutive 15. Riferimenti bibliografici 	<p style="text-align: center;">Distribuita a :</p> <p>Direzione Sanitaria di Presidio GOM</p> <p>Nucleo Raccolta Dati Prefettura Reggio Calabria</p>
	<p style="text-align: center;">Descrizione motivo della revisione:</p>

Data		Area COVID	Direttore U.O.C. Conte M.
02.04. 2020	<p style="text-align: center;">REDATTO:</p> <p>M. Cuzzola, F.D'Aleo, A.Meliadò, A.Oliva C. Papola, A. Lo Giudice, F. Bosurgi, M. Zumbo, F. Morabito</p>	<p style="text-align: center;">VERIFICATO</p> <p style="text-align: center;">M.Cuzzola</p>	<p style="text-align: center;">APPROVATO</p> <p style="text-align: center;">M.Conte</p>

1. PREMESSA

Il presente documento è stato redatto dal TEAM COVID-19 della *UOC MICROBIOLOGIA & VIROLOGIA (M & V)* considerando circolari e documentazione scientifica diffusa dal Ministero della Salute e da altri Enti o Istituzioni scientifiche nazionali ed internazionali, note alla data odierna;

- con le flow chart allegata, identifica e definisce percorsi idonei a gestire correttamente il processo diagnostico laboratoristico all'interno della macro-area COVID individuata presso il Grande Ospedale Metropolitano di Reggio Calabria,
- potrà essere aggiornato in relazione all'evoluzione epidemiologica del COVID-19 e delle ulteriori conoscenze scientifiche che si renderanno disponibili;
- per ogni ulteriore informazione o integrazione si raccomanda di utilizzare informazioni disponibili presso i siti WHO (www.who.int), ECDC (www.ecdc.eu), Ministero della Salute (www.salute.gov.it) ed Istituto Superiore di Sanità (www.epicentro.iss.it)

2. DIAGNOSI DI LABORATORIO

Il test diagnostico per SARS-CoV-2 è effettuato, secondo protocolli di diagnosi molecolare PCR Real Time per SARSCoV-2 (*processo CE/IVD-ONE STEP di estrazione e amplificazione genica di sequenze target specifiche Coronavirus WHAN*) presso il laboratorio di Microbiologia & Virologia del GOM, Reggio Calabria, su campioni biologici:

- prelevati dalle alte vie respiratorie mediante tampone nasale e/o orofaringeo, espettorato;
- prelevati dalle basse vie respiratorie aspirato endotracheale o lavaggio bronco-alveolare.

Se i pazienti non presentano segni di malattia delle basse vie respiratorie, o se la raccolta dei materiali dal tratto respiratorio inferiore non è possibile, seppur clinicamente indicata, i campioni sono prelevati dalle alte vie respiratorie. In caso di risultato negativo di un test condotto su un campione biologico da paziente fortemente sospettato di infezione da 2019-nCoV, è necessario ripetere il prelievo di campioni biologici in tempi successivi e da diversi siti del tratto respiratorio.

La raccolta dei campioni deve avvenire adottando precauzioni e dispositivi di protezione individuale utili a minimizzare sia la possibilità di contagio degli operatori sia la contaminazione ambientale. Essi sono trasportati rapidamente presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia e impiegati nella diagnosi molecolare.

In caso di positività, l'esito viene trasmesso al richiedente, alla Direzione Sanitaria Aziendale, al Comando Provinciale Carabinieri, al Nucleo Raccolta Dati della Prefettura. Infine, il campione, positivo viene inviato al Laboratorio Nazionale di riferimento (Istituto Superiore di Sanità) per la conferma del caso, secondo quanto previsto dalla circolare ministeriale del 19/03/2020

Si ritiene opportuno sottolineare che le indicazioni emanate dal Ministero della Salute e ribadite nelle circolari del Ministero della Salute prot. n. 0005443-22/02/2020-DGPRE/DGPRE-P e prot. 0006337-27/02/2020-DGPRE-DGPRE, raccomandano che l'esecuzione dei tamponi rino-faringei sia riservata ai soli casi sintomatici di I.L.I. (Influenza-Like Illness, Sindrome Simil-Influenzale) e S.A.R.I. (Severe Acute Respiratory Infections, Infezione Respiratoria Acuta Grave), oltre che ai casi sospetti di COVID-19 secondo la definizione di caso.

Tuttavia la ricerca dei soggetti positivi asintomatici è ritenuta fondamentale al fine di interrompere la catena del contagio.

In osservanza alla ordinanza del Presidente della Regione Calabria n.19 del 27 marzo 2020 si prevede che siano sottoposti a tampone per la ricerca di Covid-19/SARS-Cov-2 tutti gli operatori sanitari, delle strutture pubbliche e delle strutture residenziali come ad esempio le RSA, le RSM, le Case protette e le Case di riposo, private e private/accreditate, soggetti ad esposizione.

3. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Accertamento dei casi sospetti e/o probabili di infezione da COVID-19 al fine di garantire una riduzione della diffusione del contagio, ma anche avviare i pazienti infettati sintomatici alla rapida ospedalizzazione.

I test molecolari utilizzati c/o codesto laboratorio si basano sulla tecnologia Real-Time PCR, ONE STEP, sviluppato per il rilevamento specifico di SARS-CoV-2 RNA-Coronavirus (COVID-19): Vengono utilizzati "unicamente" KIT commerciali con requisiti di qualità e validazione (Marcatura CE Dispositivi Medici Diagnostici In Vitro IVD 98/79/CE)

Tutti i saggi includono un controllo interno per identificare possibili inibizione della PCR, per misurare l'estrazione, la purezza di RNA campione e confermare l'integrità del ciclo di PCR.

La tecnologia Real-Time PCR utilizza reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di specifiche sequenze target, obiettivo specifico per il rilevamento di RNA amplificato.

Tutti i test disponibili presso la UOC M. & V., trovano utilità nella diagnosi di infezione COVID 19, ad integrazione dei dati clinici ed esami strumentali e/o ad immagini.

4. CRITICITA' DELLA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

- ✓ *Necessità, specie in assenza di un sospetto clinico ben indirizzato, di una diagnosi differenziale ad ampio spettro.*
- ✓ *Necessità di partecipare ai network internazionali per poter accedere a: metodi, materiali/agenti, EQA, assistenza/conferme dei risultati.*
- ✓ *Necessità di sviluppare piattaforme diagnostiche alternative per i test in urgenza.*
- ✓ *Necessità elevato biocontenimento.*

5. RESPONSABILITA':

Dirigenti Biologi:

- Eseguono test di biologia molecolare (PCR-RT)
- Validano i risultati finali
- Inseriscono i risultati sul LIS per l'archiviazione e la refertazione
- Firmano i referti

TSLB (Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, personale sanitario con incarichi):

- Accettano i campioni
- Valutano l'idoneità del campione in relazione agli esami da eseguire
- Eseguono test di biologia molecolare (PCR-RT)

Infermieri Professionali

- Valutano idoneità dei campioni e l'anagrafica del paziente
- Provvedono alla registrazione del campione nel sistema LIS
- Stampano referti

6. TIPOLOGIA CAMPIONE idoneo per test molecolare : come indicato*

Fase della malattia	Tipologia di campioni
<i>I) Inizio sintomatologia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prelievo del tratto respiratorio inferiore o superiore (Bal, espettorato, tampone faringeo o naso-faringeo o altro**) - Sangue senza anticoagulanti per sierologia (1 provetta) - Urine - Feci (se con sintomatologia diarroica)
<i>II) Fasi avanzate della malattia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Prelievo del tratto respiratorio inferiore o superiore (Bal, espettorato, tampone faringeo o naso-faringeo o altro**) - Sangue senza anticoagulanti per sierologia (1 provetta) - Urine - Feci (se con sintomatologia diarroica)
<i>III) > 14 giorni dall'esordio (siero convalescente)*</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sangue senza anticoagulanti per sierologia (1 provetta) - Urine

*Istituto Nazionale per le malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

7. TIPOLOGIA CAMPIONE E CONSERVAZIONE *

Tipologia di campione	Trasporto in laboratorio	Conservazione	Commento
Tampone nasofaringeo o faringeo	4°C	≤5gg: 4°C >5gg:-70°C	I tamponi Naso- e Oro-faringeo dovrebbero essere raccolti in un'unica provetta per aumentare la carica virale
Broncolavaggio, aspirato tracheale nasale o nasofaringeo	4°C	≤48h: 4°C >48h:-70°C	
Espettorato	4°C	≤48h: 4°C >48h:-70°C	Assicurarsi che il materiale provenga dalle basse vie respiratorie
Tessuto proveniente da biopsie incluso polmone	4°C	≤5gg: 4°C >5gg:-70°C	Per biologia molecolare su virus ad RNA inviare campioni freschi o, nel caso di indagine retrospettiva, congelati. I campioni in paraffina non sono idonei
Siero	T.A.	≤5gg: 4°C >5gg:-70°C	Inviare due campioni distanziati, per valutare il movimento anticorpale: -Fase acuta entro la prima settimana dall'inizio sintomi -Fase convalescente- 18-25 gg dopo inizio sintomi
Sangue intero	T.A.	≤5gg: 4°C >5gg:-70°C	Nella prima settimana dall'inizio sintomi
Feci	4°C	≤48h: 4°C >48h:-70°C	In caso di sintomatologia diarroica
Urine	4°C	≤5gg: 4°C >5gg:-70°C	

*Istituto Nazionale per le malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

8. STRUMENTI dedicati ad analisi molecolari:

Strumenti utilizzati per estrazione, set-up e analisi PCR RNA COVID-19, in dotazione laboratorio Microbiologia & Virologia del GOM

- ✓ Estrattore robotizzato completo di piattaforma set-up PCR, marca NIMBUS-SEEGENE, completo di amplificatore CFX96-BIORAD, figura 1



Fig.1. Sistema estrazione e analisi automatizzato, capacità di processazione 40 test /seduta.
turnaround-time analisi COVID 19 3h +45 minuti

- ✓ Estrattore robotizzato completo di piattaforma set-up PCR, Ingenius (Elitech Group), figura 2

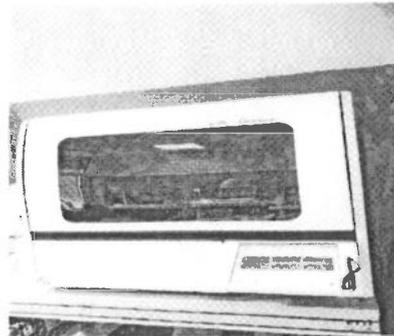


Fig.2 . Sistema estrazione e analisi automatizzato, capacità di processazione 12 test /seduta.
turnround-time analisi COVID 19 **120 minuti**

- ✓ QiaSymphony(Qiagen) estrattore automatico acidi nucleici matrici liquide/cellulari + stazione di analisi PCR-Real Time applicata a diagnostica virologica e altro. Figura 3

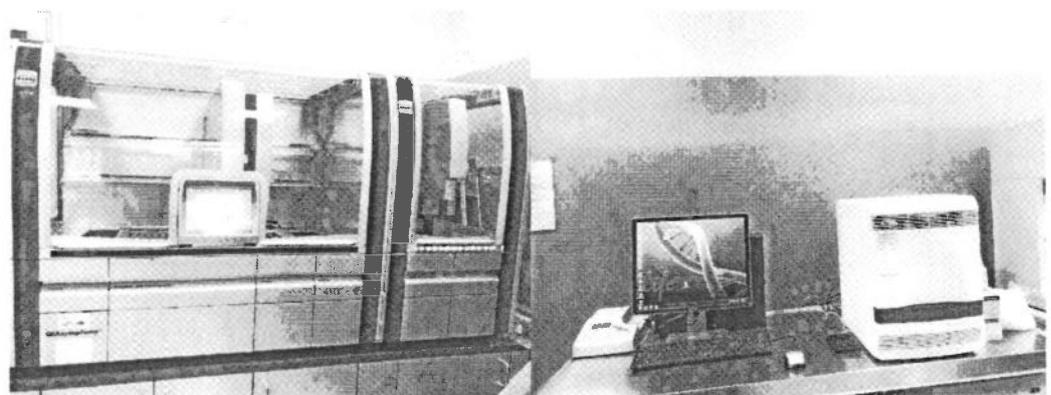


Fig 3. Estrattore automatico abbinato ad amplificatore di sequenze geniche virali, piattaforma di analisi custom on-demand applicabile a differenti kit diagnostici COVID 19

- ✓ GeneXpert System-Cepheid, disponibilità di 8 moduli, figura 4

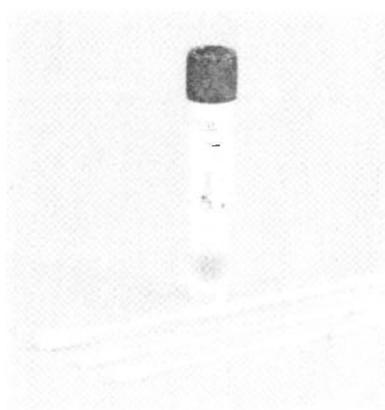


Fig. 4 Sistema modulare per diagnostica rapida in urgenza destinata a problem solving ginecologia, interventi chirurgici non programmati. turnaround-time analisi COVID 19 - 45 minuti

9. Materiale richiesto per esecuzione tampone, come richiesto da Ordinanza Ministeriale:

Descrizione

UTM™, Universal Transport Medium, è un mezzo di trasporto virale stabile a temperatura ambiente per la raccolta, il trasporto, la manutenzione e la conservazione a lungo termine dei virus, come COVID 19, per i dosaggi a base molecolare. Esecuzione del tampone come indicato da istruzioni allegate alla confezione.



I campioni diagnostici devono essere accompagnati dalla scheda dati, riportata in calce alle istruzioni, compilata in tutte le sue parti

Su ogni singolo campione deve essere apposta un'etichetta riportante a chiare lettere il nome del paziente, la tipologia del campione (Tampone faringeo, BAL, siero, altro) e la data di prelievo.

Le informazioni riportate sulle provette **devono essere coerenti** con quelle riportate nella scheda dati.

10. KIT certificati CE/IVD diagnostica molecolare COVID 19 in uso c/o laboratorio Microbiologia & Virologia -GOM



11. Materiale accessorio:

- ✓ Guanti monouso
- ✓ Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L,)
- ✓ Acqua bidistillata sterile
- ✓ Dispositivi di protezione individuale, forniti al personale COVID (Farmacia Aziendale)



12. Strumentazione, elenco:

- ✓ Cappa a flusso laminare, ULTRASAFE FAST
- ✓ Apparecchiatura per estrazione automatica e set up PCR (Ingenius)
- ✓ Apparecchiatura per estrazione automatica e set up PCR (NIMBUS)
- ✓ Apparecchiatura per estrazione automatica (Qiasimphony)
- ✓ Amplificatore (Abi Prism 7500 Applied BioSystem)
- ✓ GeneXpert System-Cepheid
- ✓ Microcentrifuga da banco
- ✓ Frigorifero 4°C, Congelatore -80°C

13. REGISTRAZIONI, MODULI, DOCUMENTI:

- ✓ Etichette ID campione (gestionale aziendale Open-Lys), vedi tabella

Codice openlys, lab	Codice order entry	Descrizione prestazione
800A	RCC19	SARS-COV-19 tampone nasale
800B	RCC19b	SARS-COV-19 tampone faringeo
800C	RCC19C	SARS-COV-19 tampone tracheale
800D	RCC19D	SARS-COV-19 espettorato
800E	RCC19E	SARS-COV-19 broncoaspirato
800F	RCC19F	SARS-COV-19 broncoalveolare
800 G	RCC19G	SARS-COV-19 tampone rettale
800 H	RCC19H	SARS-COV-19 feci

- ✓ Registri lavoro COVID 19

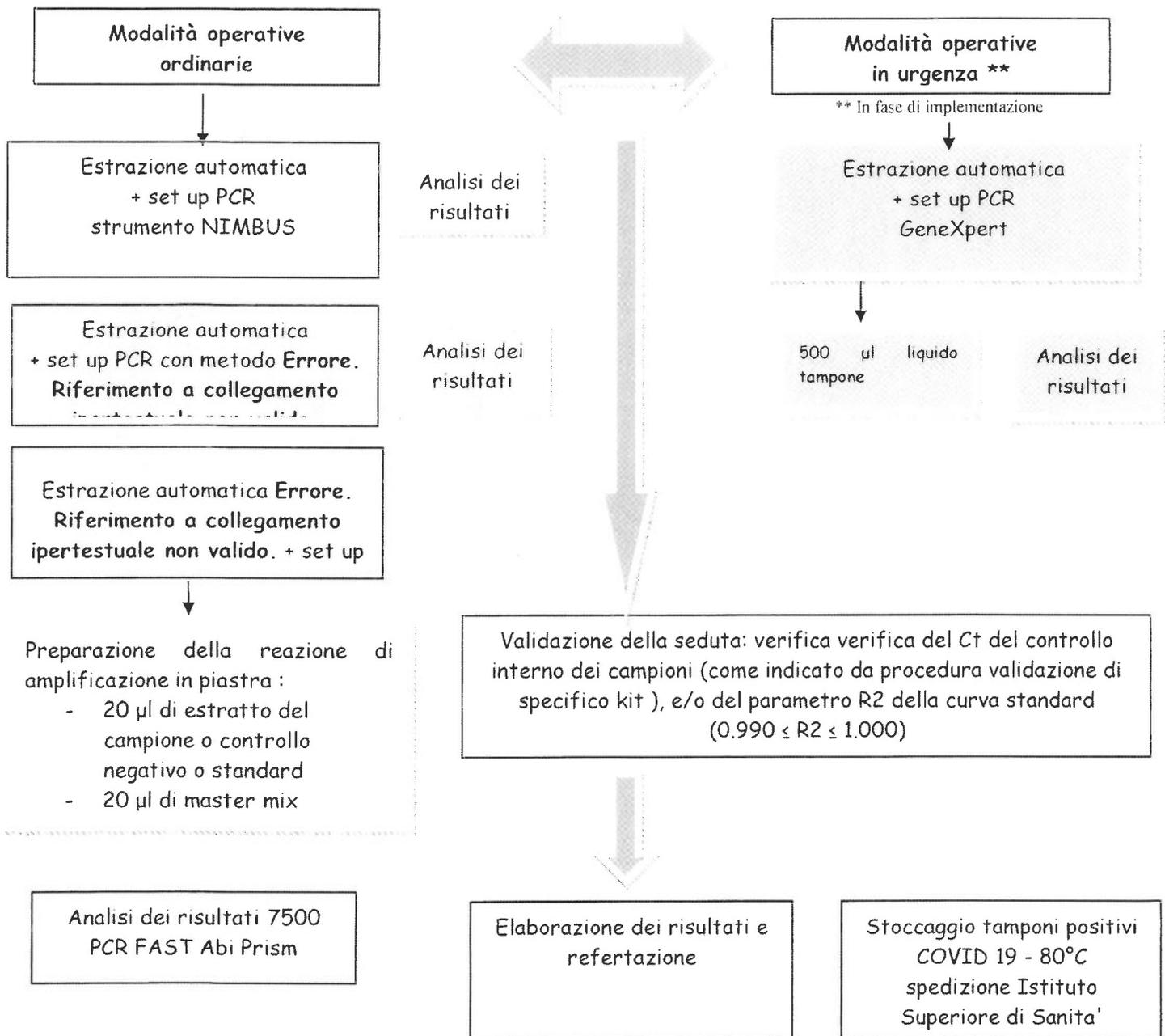
14. ACCETTAZIONE

- Il trasporto dei campioni al laboratorio va eseguito secondo le raccomandazioni per i campioni a rischio biologico (*Circolare Ministeriale n°3/2003 "Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici"*)

CRITICITA'eliminazione tampone

- Il campione è fuoriuscito dalla provetta primaria
 - ✓ Necessità di bonificare la superficie esterna
 - ✓ Difficoltà a recuperare il campione residuo disponibile
- Le informazioni sull'etichetta sono incongruenti con quelle della scheda
 - ✓ Necessità di contattare chi ha inviato il campione per escludere scambi di provette

15. MODALITA' ESECUTIVE:



16. In caso di accertata positività COIVD 19, il tampone viene inviato all'Istituto Superiore di Sanità

Raccomandazioni (rif.: dr.ssa C. Castilletti *"Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani" Roma 24 gennaio 2020*)

A

- I campioni vanno mantenuti a +4° C prima dell'invio
- Il trasporto al Laboratorio deve essere effettuato entro il più breve tempo possibile, preferibilmente entro le 24 ore e a temperatura refrigerata
- Per tempi di consegna più prolungati, concordare con il Laboratorio le modalità di preparazione e conservazione

B

- I campioni diagnostici devono essere accompagnati dalla scheda dati, riportata in calce alle istruzioni, compilata in tutte le sue parti
- Su ogni singolo campione deve essere apposta un'etichetta riportante a chiare lettere il nome del paziente, la tipologia del campione (Tampone faringeo, BAL, siero, altro) e la data di prelievo.
- Le informazioni riportate sulle provette **devono essere coerenti** con quelle riportate nella scheda dati.

- Il campione va confezionato seguendo il principio del **triplo involucro**
- Il trasporto dei campioni al laboratorio va eseguito secondo le raccomandazioni per i campioni a rischio biologico
 (Circolare Ministeriale n° 3/2003
 "Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici")

L'invio va concordato con il Laboratorio



Leak-Proof
Primary*

Leak-proof
Secondary*

Outer with
Compliant
Markings

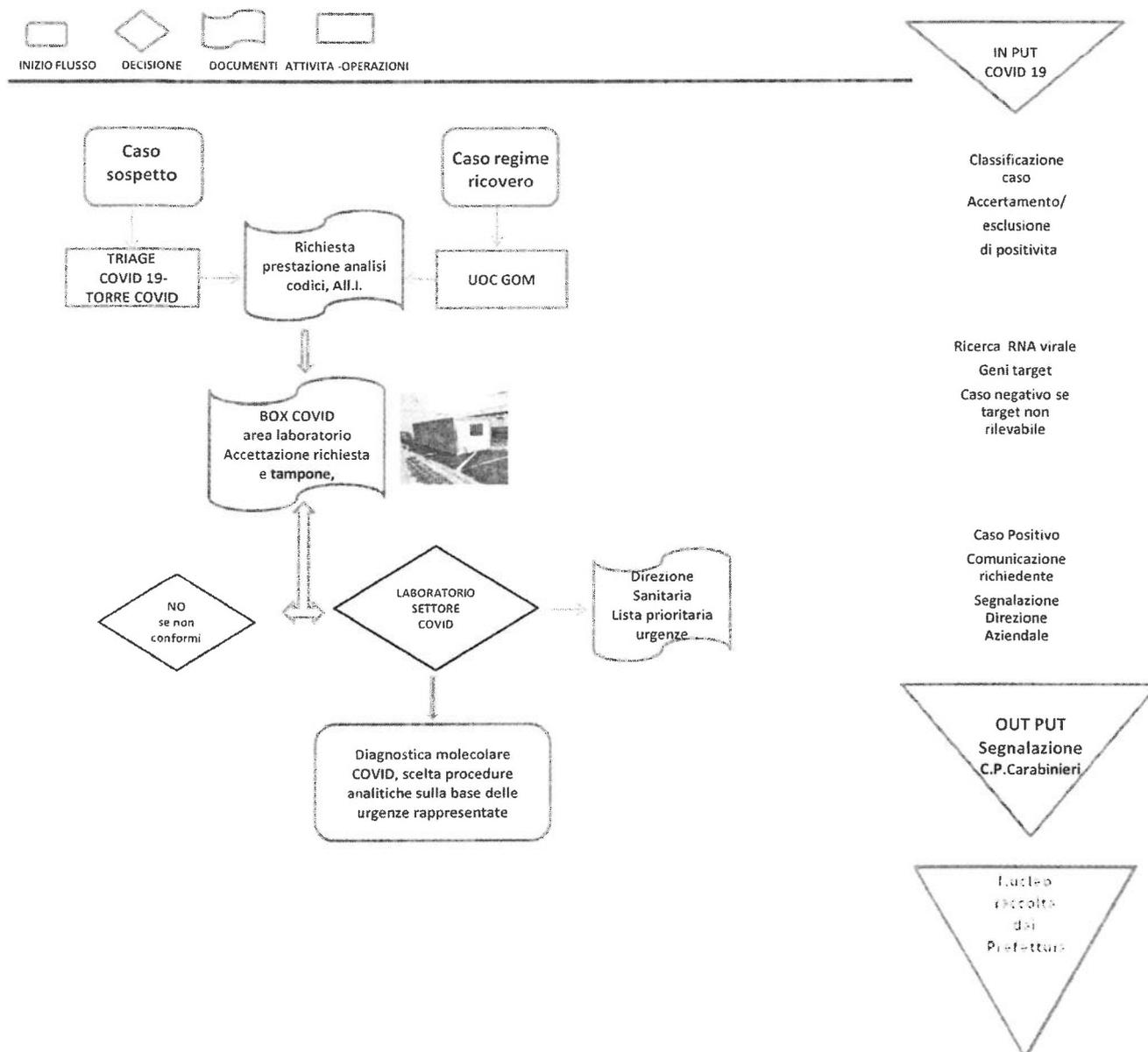


17. . Riferimenti bibliografici

- ✓ Epicentro. Focolaio di infezione da un nuovo coronavirus (2019-nCoV). <https://www.epicentro.iss.it/coronavirus/2019-nCoV>
- ✓ European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Novel coronavirus in China. <https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus-china>
- ✓ European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Risk assessment: outbreak of acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus, China; First cases imported in the EU/EEA; second update(26/01/2020) <https://www.ecdc.europa.eu4>.
- ✓ World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation. REPORT-23. 12 FEBRUARY 2020. <https://www.who.int6>.
- ✓ European Centre for Disease Prevention and Control. COVID-19. <https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus-china>
- ✓ Ministero della Salute. COVID-19. Nuove indicazioni e chiarimenti. 0005443-22/02/2020-DGPRES-DGPRES;
- ✓ Ministero della Salute. COVID-19. Circolare del Ministero della salute. Aggiornamento della definizione di caso. 0006360-27/02/2020-DGPRES-DGPRES-P.
- ✓ Ministero della Salute. COVID-19. Circolare del Ministero della salute. Documento relativo ai criteri per sottoporre soggetti clinicamente asintomatici alla ricerca d'infezione da SARS-CoV-2 attraverso tampone rino-faringeo e test diagnostico 0006337-27/02/2020-DGPRES-DGPRES-P.
- ✓ Ministero della Salute. COVID-19. Circolare del Ministero della salute 9 marzo 2020. COVID-19. Aggiornamento delladefinizione di caso. 0007922-09/03/2020-DGPRES.14. G.U. anno 161 - numero 44 del 22/02/2020.
- ✓ Ordinanza del Ministero della Salute del 21/02/2020. Ulteriori misure profilattiche contro la diffusione della malattia COVID-19.15. G.U. anno 161 - numero 45 del 23/02/2020. Decreto Legge 23 febbraio 2020,

- ✓ ' Misure urgenti in materia di contenimento e gestione dell'emergenza epidemiologica da COVID-19.16. G.U. Serie Generale, n. 59 del 08 marzo 2020. Decreto del presidente del consiglio dei ministri 08 marzo 2020
Ulteriori disposizioni attuative del decreto-legge 23 febbraio 2020, n. 6, recante misure urgenti in materia di contenimento e gestione dell'emergenza epidemiologica da COVID-19
- ✓ G.U. Serie Generale, n. 62 del 09 marzo 2020. Decreto del presidente del consiglio dei ministri 09 marzo 2020.
- ✓ Ulteriori disposizioni attuative del decreto-legge 23 febbraio 2020, n. 6, recante misure urgenti in materia di contenimento e gestione dell'emergenza epidemiologica da COVID-19, applicabili sull'intero territorio nazionale. G.U. Serie Generale, n. 64 del 11 marzo 2020. Decreto del presidente del consiglio dei ministri 11 marzo 2020
- ✓ "Indicazioni ad interim per l'effettuazione dell'isolamento e dell'assistenza sanitaria domiciliare nell'attuale contesto COVID-19". Gruppo di lavoro ISS
- ✓ Prevenzione e controllo delle Infezioni. Versione del 7 marzo 2020. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporto ISS COVID-19, n.1/ 2020) AMCLI
- ✓ Expert update on the SARS-CoV2 coronavirus causing the COVID-19 outbreak, AMCLI

LAYOUT ACCERTAMENTO DIAGNOSTICO CASI SOSPETTI COVID 19



APPENDICE

– INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

In riferimento ai dati di letteratura attualmente disponibili¹ si precisa che:

i campioni (*tampone rinofaringeo, tampone faringeo, BAL, broncoaspirato*) sono testati con metodiche di biologia molecolare certificate CE-IVD che permettono la rilevazione di tre geni target di SARS-CoV-2.

Il campione è refertato come

POSITIVO : rivelazione contemporanea dei tre geni target E, N, RdRp

POSITIVO. Rilevata la presenza di gene E e/o N (quando vi è la rivelazione 1 o 2 geni target).

NEGATIVO quando non vi è la rivelazione di alcun gene target.

RdRP	E	N	Result
+		+	SARS-CoV-2 positive
+	+		
+	+	+	
+			Repeat to confirm Positive
	+	+	
		+	

Qualora vi sia l'amplificazione di un solo gene target il campione sarà testato con sistema alternativo di biologia molecolare per confermare l'eventuale presenza di RNA virale a bassa carica.

¹ <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/covid-19-guidance-discharge-and-ending-isolation-first%20update.pdf>

GUIDA AL PRELIEVO POST-MORTEM E ALLA CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE COVID-19 (DA SARS-COV-2)

a cura di

GLAMIFO – Gruppo per lo Studio della Microbiologia Forense AMCLI

Il seguente documento si basa sulle attuali conoscenze su SARS-CoV-2 e sulla malattia ad esso legata (COVID-19). L'ISS sta monitorando la diffusione del virus sull'intero territorio nazionale attraverso report giornalieri inviati dalle singole regioni ed elaborati dai laboratori di riferimento regionale. La diagnosi d'infezione si basa sull'uso di sistemi molecolari standardizzati e validati per la ricerca dell'RNA virale in diversi set di campioni biologici, provenienti da pazienti sospetti d'aver contratto l'infezione. Questo documento fornisce una guida specifica per la raccolta e conservazione dei campioni biologici provenienti da cadavere e fornisce inoltre raccomandazioni sulle pratiche di sicurezza da adottare durante la raccolta e manipolazione dei campioni nonché durante le procedure autoptiche. In merito all'esecuzione dell'attività autoptica si raccomanda di seguire le procedure per l'esecuzione di riscontri diagnostici in pazienti deceduti con infezione da SARS-CoV-2 pubblicato dal Gruppo di Lavoro per ISS Cause di Morte COVID-19 pubblicato il 27 marzo 2020.

RACCOLTA TAMPONI

Poiché la raccolta di materiale delle alte vie respiratorie eseguito su cadavere non genera aerosol è necessario seguire le precauzioni standard. È necessario indossare almeno i seguenti DPI: tre paia di guanti di cui l'esterno e l'interno in lattice e il mediano in nitrile non sterili e resistente ai tagli, tuta a maniche lunghe impermeabile e resistente ai liquidi; grembiule impermeabile; protezione per viso in plastica e occhiali; mascherina; stivali o copriscarpe e copricapo. Seguire le procedure di vestizione e svestizione come indicato dai protocolli aziendali e nazionali. In caso di esecuzione dell'autopsia è necessario evitare assolutamente l'utilizzo della sega oscillante e optare per l'utilizzo delle cesoie manuali. Se l'utilizzo della sega oscillante si rende non differibile è necessario dotarsi di un sistema a vuoto per contenere l'aerosol. Solo una persona può effettuare il taglio, anche se manuale, ed è perentorio ridurre al minimo il personale necessario per lo svolgimento della pratica settoria.

Si raccomanda di testare i campioni biologici provenienti dalle alte vie respiratorie e se viene eseguito l'esame autoptico di testare anche i tamponi provenienti dalle basse vie respiratorie. Si raccomanda

l'utilizzo dei soli tamponi floccati preferibilmente UTM (Universal Transport Medium for Viruses, Chlamydia, Mycoplasma and Ureaplasma) con terreno di trasporto per patogeni virali. Non utilizzare tamponi di alginato di calcio o con asta in legno poiché potrebbero contenere sostanze che inibiscono la reazione a catena della polimerasi (PCR). I campioni raccolti devono essere singolarmente distinti e conservati, in ottemperanza al mantenimento della catena del freddo, in frigo alla temperatura di 2-8°.

- **Se non viene eseguita l'autopsia** si raccomanda di prelevare i seguenti campioni biologici:

tampone nasofaringeo; tampone orofaringeo entro due ore dal decesso. Si consiglia di non unire i prelievi in quanto potrebbe essere necessario utilizzarli per la ricerca di altri patogeni respiratori.

Per l'esecuzione del tampone nasale procedere nel seguente modo: inserire l'asta del tampone all'interno della narice destra parallelamente al palato sino a giungere nella zona retrostante della rinofaringe. Ruotare il tampone e lasciarlo in sede per 15 secondi affinché possa assorbire eventuali secrezioni presenti. Con lo stesso tampone ripetere la procedura rispetto alla narice di sinistra. Estrarre il tampone, spezzare l'ansa all'interno del tubo contenente il terreno di trasporto, tapparlo ed etichettarlo.

Per l'esecuzione del tampone orofaringeo, dopo aver divaricato le fauci, inserire il tampone dietro i pilastri tonsillari e dietro l'ugola avendo cura di evitare contatti con la lingua. Ruotare bene il tampone e procedere alla chiusura come sopra riportato.

- **Se viene eseguita l'autopsia** si raccomanda di prelevare i seguenti campioni biologici:

tampone nasofaringeo; tampone orofaringeo entro due ore dal decesso; tampone bronchiale/polmonare (da eseguire per ciascun polmone); materiale fecale. Ai fini scientifici è opportuno prelevare aspirati di liquido intra-oculare e di midollo osseo al fine di ricercare l'RNA di SARS-Cov-2.

Procedere al prelievo del tampone nasofaringeo e orofaringeo come sopra riportato.

Per l'esecuzione del tampone bronchiale: dopo aver rimosso il piastrone sternale e esposto il polmone di destra, procedere all'incisione e all'apertura dei relativi bronchi. Poiché le particelle virali hanno una distribuzione focale in pazienti con infezione respiratoria è necessario tamponare i bronchi principali e segmentari per quanto possibile. Inserire il tampone a contatto con la superficie interna di ciascun bronco, ruotare e successivamente inserirlo, rompendo l'ansa, nell'apposito flacone contenente il terreno di trasporto. Ripetere l'operazione in riferimento al polmone di sinistra.

I campioni raccolti devono essere etichettati separatamente. Si consiglia la ricerca di altri patogeni virali tramite metodiche di biologia molecolare.

Si consiglia qualora sia possibile la raccolta di tessuti. In caso di esame autoptico si consiglia il prelievo di frammenti tissutali di parenchima polmonare destro e sinistro; il polmonare con frammenti di bronchi segmentali e bronchi primari; frammenti di trachea. I tessuti così raccolti devono essere conservati in formalina tamponata al 10% e devono avere uno spessore massimo di 4-5 mm al fine di favorire la fissazione ottimale.

SICUREZZA DEI CAMPIONI

I campioni raccolti adeguatamente ed etichettati devono essere posti all'interno di un contenitore primario con supporto (porta-provette) il quale va chiuso all'interno di un contenitore secondario all'interno del quale è inserita una quantità adeguata di carta assorbente e se possibile quest'ultimo va collocato all'interno di un sacchetto di plastica sigillabile per il trasporto. È necessario ricordare che il personale incaricato al trasporto del materiale biologico dalla sala settoria sino al laboratorio deve necessariamente indossare guanti monouso. I campioni biologici devono pervenire accompagnati da richiesta specifica presso:

UOC di Microbiologia e Virologia

direttore dr. Marco Conte

GOM Grande Ospedale Metropolitano Reggio Calabria

referente per la microbiologia Post-mortem:

dr. Francesco d'Aleo

Segretario gruppo **GLAMIFO – Gruppo per lo studio della Microbiologia Forense AMCLI**

UOC di Microbiologia e Virologia

GOM Grande Ospedale Metropolitano

RIFERIMENTI

Collection and Submission of Postmortem Specimens from Deceased Persons with Known or Suspected COVID-19, March 2020 (Interim Guidance) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-postmortem-specimens.html>

Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings. Fernández-Rodríguez A, Burton JL, Andreoletti L, et al. Clin Microbiol Infect 2019;25:570-579. doi: 10.1016/j.cmi.2018.08.009.