

## 1. Scopo e campo di applicazione della prova

| Target   | Matrice + Specie   | Tecnica di prova   |
|--|--|--|
| Porzioni del segmento 4 del genoma del virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIV) del sottotipo H5, corrispondenti alla subunità HA1 e al sito di clivaggio dell'emoagglutinina di virus HPAI o LPAI   | Isolati virali, organi/tessuti, feci e tamponi da specie aviarie e di mammifero, latte di origine animale, RNA/DNA estratto dalle suddette matrici | One step reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR) |
| Scopo della prova  |  |  |
| <p>Analisi di patotipizzazione e filotipizzazione di virus H5 Euroasiatici. Applicabile a campioni aviari domestici e selvatici e a campioni da mammifero.</p> <p>La prova si compone di una reazione duplex (H5 HPAI CS assay/H5 2.3.4.4b assay) e di una reazione simplex (H5 LPAI CS assay). Le reazioni devono essere effettuate in parallelo.</p> <p>La prova è funzionale in primis all'identificazione rapida di virus del sottotipo H5 ad alta patogenicità per consentire l'immediata adozione di misure di controllo. La sua applicazione è raccomandata nei seguenti casi: a) improvvisa ed estesa circolazione di virus H5 HPAI in volatili selvatici in una determinata area; b) per la conferma di casi secondari connessi a focolai primari per i quali la presenza di virus H5 HPAI è stata confermata mediante sequenziamento; c) per confermare un sospetto clinico (es. rialzo improvviso di mortalità). L'applicazione della prova su campioni derivanti da focolai primari ('index case') richiede la successiva conferma del patotipo mediante sequenziamento.</p> <p>La prova va eseguita a seguito dell'identificazione di un virus dell'influenza aviaria del sottotipo H5. In caso di emergenze epidemiche e di sospetto focolaio di influenza aviaria ad alta patogenicità, la prova può essere eseguita come analisi di prima istanza dopo valutazione del <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> esclusivamente presso il EURL/LRN AI e ND.</p> |  |  |

## 2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:

- PDP VIR 1005 2026 Rev. 01

Bibliografia di riferimento:

- WOAH - World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (Version adopted in September 2025).

Caratteristiche del metodo:

- Fascicolo di validazione n. VIR 1005V

## 3. Attrezzature, apparecchiature e consumabili

Dotazione base di un laboratorio di biologia molecolare (**ALL PDP 279 E** - Apparecchiature, reagenti, attrezzature e materiali consumabili per biologia molecolare), con le seguenti integrazioni e/o specifiche:

- Centrifuga con rotore per provette da 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml e 0,2 ml, con velocità fino a 18000 × g
- Centrifuga con rotore per piastre da 96 pozzetti con velocità di almeno 5000 × g
- Sistema robotizzato per dispensazione di liquidi (liquid handling system) Cas 1200 (Qiagen) oppure Myra (Bio Molecular Systems) (opzionale) e relativi puntali con filtro sterili
- Piattaforma CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad) e relativi consumabili, o analogo strumento

#### 4. Reagenti, soluzioni, kit diagnostici e materiali di riferimento

Dotazione base di un laboratorio di biologia molecolare (**ALL PDP 279 E**), con le integrazioni e/o specifiche riportate nella tabella sottostante:

| Prodotto  | Fornitore/Specifiche   | Conservazione  |
|---|--|--|
| Materiale di riferimento:<br>Antigene di H5-HPAI clade 2.3.4.4b<br>(se il metodo è usato come analisi di prima istanza) | Prodotto e certificato da EURL/LRN AI e ND/ <b>DSBIO IOP 038</b> - Gestione dei materiali di riferimento e ceppi virali/ Controllo positivo di processo (PPC) per i target H5 HPAI CS/clade 2.3.4.4b                       | ≤ -70°C  |
| Materiale di riferimento:<br>Antigene di H5-LPAI<br>(se il metodo è usato come analisi di prima istanza)                | Prodotto e certificato da EURL/LRN AI e ND/ <b>DSBIO IOP 038/</b> Controllo positivo di processo (PPC) per il target H5 LPAI CS  |  |
| AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents  | Applied Biosystems/rRT-PCR   | ≤ -18°C  |
| Primer senso H5HP_22_F3   | Commerciale/H5 HPAI CS assay/<br>5'-CCTTGCGACTGGGCTYAG-3'  | Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso.<br><br>Conservare le sonde al buio |
| Primer antisenso H5HP_R2  | Commerciale/H5 HPAI CS assay/<br>5'-ATCAACCATTCCCTGCCA-3'  |  |
| Sonda H5HP_25_probe   | Commerciale/H5 HPAI CS assay/<br>5'-FAM-<br>AGRAGAAAAAGRGGCCTGTTTGGGGC-<br>BHQ1-3'   |  |
| Primer senso H5-2.3.4.4b_22_F   | Commerciale/H5 2.3.4.4b assay/<br>5'-ACCAGGGAGCRCCYTCCT-3'   |  |
| Primer antisenso H5-2.3.4.4b_22_R   | Commerciale/H5 2.3.4.4b assay/<br>5'-GTATTATTGTAGCTTATCTTTATTG-3'  |  |
| Sonda H5-2.3.4.4b_22_probe  | Commerciale/H5 2.3.4.4b assay/<br>5'-Cy5-<br>TTGGGTATGCATCGTTCTTTTGATAAGCCA-<br>BHQ2-3'  |  |
| Primer senso H5LP_22_F  | Commerciale/H5 LPAI CS assay/<br>5'-CCCAAATAYGTGAAATCAGAT-3'   |  |
| Primer antisenso H5LP_22_R  | Commerciale/H5 LPAI CS assay/<br>5'-GCCAYCCTCCTTCTATAAAG-3'  |  |
| Sonda H5LP_22_probe   | Commerciale/H5 LPAI CS assay/<br>5'-FAM-CCAAAYAGYCCTCTYGTCTTCT-MGB-<br>3'  |  |
| Materiale di riferimento:<br>RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H5-HPAI, clade 2.3.4.4b             | Prodotto e certificato da EURL/LRN AI e ND, e opportunamente diluito secondo i criteri di accettabilità stabiliti al par. 8.1/ Controllo positivo di PCR (PTC) per i target H5-HPAI CS/clade 2.3.4.4b estratto da antigene | ≤ -70°C  |
| Materiale di riferimento:<br>RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H5-LPAI                             | Prodotto e certificato da EURL/LRN AI e ND, e opportunamente diluito secondo i criteri di accettabilità stabiliti al par. 8.1/ Controllo positivo di PCR (PTC) per il target H5-LPAI estratto da antigene                  |  |

I prodotti commerciali specificati sono quelli in uso presso IZSVe. Si precisa che questi prodotti sono riportati nel documento al solo scopo di facilitare i laboratori diagnostici nell'implementazione del protocollo, e non implicano alcuna promozione degli stessi. In nessun caso è precluso l'uso di reagenti o strumenti alternativi che si dimostrino idonei allo scopo.

#### 4.1 Preparazione delle soluzioni

| Prodotto                          | Modalità preparazione  | Conservazione                            |
|-----------------------------------|--|--|
| Oligonucleotidi (primers e sonde) | Risospendere secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice per ottenere una soluzione 100 µM  | ≤ -18°C<br>Conservare le sonde al buio   |
| H5 HPAI CS assay pre-mix          | Unire i seguenti reagenti nei volumi indicati per ottenere 200 µl di pre-mix: <ul style="list-style-type: none"> <li>TE pH 8 o acqua per biologia molecolare nuclease-free: 165 µl</li> <li>Primer senso H5HP_22_F3 (100 µM): 15 µl</li> <li>Primer antisenso H5HP_R2 (100 µM): 15 µl</li> <li>Sonda H5HP_25_probe (100 µM): 5 µl</li> </ul>             | ≤ -18°C<br>Conservare le pre-mix al buio |
| H5 2.3.4.4b assay pre-mix         | Unire i seguenti reagenti nei volumi indicati per ottenere 200 µl di pre-mix: <ul style="list-style-type: none"> <li>Acqua per biologia molecolare nuclease-free: 165 µl</li> <li>Primer senso H5-2.3.4.4b_22_F (100 µM): 15 µl</li> <li>Primer antisenso H5-2.3.4.4b_22_R (100 µM): 15 µl</li> <li>Sonda H5-2.3.4.4b_22_probe (100 µM): 5 µl</li> </ul> |  |
| H5 LPAI CS assay pre-mix          | Unire i seguenti reagenti nei volumi indicati per ottenere 200 µl di pre-mix: <ul style="list-style-type: none"> <li>TE pH 8 o acqua per biologia molecolare nuclease-free: 165 µl</li> <li>Primer senso H5LP_22_F (100 µM): 15 µl</li> <li>Primer antisenso H5LP_22_R (100 µM): 15 µl</li> <li>Sonda H5LP_22_probe (100 µM): 5 µl</li> </ul>            |  |

#### 5. Verifiche preliminari

##### Condizioni ambientali

- Non sono richieste condizioni ambientali specifiche affinché la prova venga eseguita correttamente.

##### Condizioni strumentali

- Verificare che gli strumenti necessari per la prova siano correttamente funzionanti, che le attività di manutenzione siano state eseguite e che gli strumenti di misurazione siano in corretto stato di conferma metrologica.

##### Periodo di stabilizzazione richiesto per il campione

- Scongellare completamente il campione prima di iniziare la prova, se conservato a ≤ -70°C
- Non sono richiesti periodi di stabilizzazioni o caratteristiche particolari per il campione affinché la prova venga eseguita correttamente.

#### 6. Modalità di conservazione del campione durante l'analisi

Conservare il campione secondo:

- "**IZS IDD 069** - Criteri di idoneità e modalità specifiche per l'accettazione e conservazione di campioni conferiti per ricerca influenza aviaria e malattia di Newcastle".

Nel dettaglio:

- Isolati e campioni clinici vengono conservati in frigorifero tra + 2°C e + 8°C fino alla fine delle analisi relative e conseguente emissione di esito. I campioni di latte devono essere conservati a temperatura

refrigerata tra + 2°C e + 8°C se analizzati entro le 48 ore, contrariamente devono essere conservati a temperatura ≤ -70°C

- Successivamente all'emissione dell'esito, i campioni positivi e/o di interesse biologico possono essere archiviati in congelatore a ≤ -70°C
- Gli acidi nucleici estratti vengono conservati a ≤ -70°C fino all'utilizzo (oppure a temperatura + 2°C e + 8°C nel caso di utilizzo immediato).

## 7. Norme di sicurezza

| Accesso ai laboratori e norme di comportamento   |   |
|--|---|
| E' obbligatorio indossare durante tutte le fasi dell'attività: abbigliamento e calzature da laboratorio. |   |
| Fasi di processo   | Misure di prevenzione da applicare  |
| Prelievo del materiale conservato in congelatore ≤ -70°C   | Maneggiare i campioni congelati con guanti antifreddo                               |
| Preparazione master mix, aggiunta acidi nucleici   | Utilizzare guanti monouso   |
| Utilizzo dell'apparecchiatura robotizzata per dispensazione master mix e acidi nucleici                  | Abbassare lo schermo di protezione. Non introdurre le mani durante il funzionamento |
| Posizionamento campioni nella piattaforma per real-time PCR e avvio dello strumento                      | Utilizzare guanti monouso   |
| Per tutte le fasi di processo  | Frequente lavaggio delle mani con detergente disinfettante                          |

## 8. Modalità operative

Vedere “**ALL PDP 009** - Istruzione per l'esecuzione di un test diagnostico mediante PCR: Buone pratiche di laboratorio”, e “**ALL PDP 011** - Principi generali per l'esecuzione delle tecniche di prova di biologia molecolare basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR)”.

### PREPARAZIONE CAMPIONE

Tracciabilità seduta analitica: “**IZS MOD 291 A** – Schema di disposizione dei campioni da sottoporre a estrazione o a reazione di amplificazione”, “**IZS MOD 291 E** - Elenco dei campioni amplificati o pretrattati”.

Seguire le indicazioni riportate in “**ALL PDP 1000** - Preparazione del campione ed estrazione degli acidi nucleici per la rilevazione con metodi molecolari del virus dell'Influenza Aviaria (AIV) e del paramyxovirus aviario di tipo 1 (APMV-1)”.

### ESTRAZIONE ACIDO NUCLEICO

Tracciabilità seduta analitica: **IZS MOD 291 A**, “**IZS MOD 291 B** - Estrazione acidi nucleici”.

Seguire le indicazioni riportate in **ALL PDP 1000**, prevedendo l'utilizzo del controllo negativo e positivo di processo (NPC e PPC) se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza, dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato.

## CONTROLLI

Tracciabilità seduta analitica: **IZS MOD 291 A, IZS MOD 291 B, "IZS MOD 291 C - Amplificazione acidi nucleici - Reazione di PCR Real Time", IZS MOD 291 E.**

- **NPC** (controllo negativo di processo; se previsto quando la procedura è eseguita come analisi di prima istanza): campione negativo per H5 (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free o PBS antibiotato) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione secondo **ALL PDP 1000**. Nota: se la conformità di NPC è già stata verificata mediante PDP VIR 018 applicata a monte della presente prova, non è necessario includerlo tra i controlli della seduta di rRT-PCR
- **PPC** (controllo positivo di processo; se previsto quando la procedura è eseguita come analisi di prima istanza): campioni costituiti da antigeni di influenza aviaria sottotipo H5-HPAI clade 2.3.4.4b e sottotipo H5-LPAI, processati unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione secondo **ALL PDP 1000**
- **NTC** (controllo negativo di amplificazione): campione privo di RNA target (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free) processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
- **PTC** (controllo positivo di amplificazione): campione costituito da RNA estratto da antigeni di influenza aviaria del sottotipo H5-HPAI clade 2.3.4.4b e del sottotipo H5-LPAI secondo **ALL PDP 1000** e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione

## ANALISI

Tracciabilità seduta analitica "**ALL PDP 328** - Composizione delle pre-mix e delle mix, definizione dei profili termico e di restrizione e indicazione dei target oggetto di PCR multiplex – agg. 0", **IZS MOD 291 A, IZS MOD 291 C, IZS MOD 291 E.**

### 1) Preparazione Mastermix

Reazione duplex 'H5 HPAI CS/2.3.4.4b'

| Reagente                  | Concentrazione iniziale  | Concentrazione finale           | µl × 1 reazione |
|---------------------------|--|---------------------------------|-----------------|
| Nuclease free water       | -  | -                               | 2,5             |
| 2X RT-PCR Buffer          | 2X   | 1X                              | 12,5            |
| H5 HPAI CS assay pre-mix  | Primers 7,5 µM;<br>sonda 2,5 µM  | Primers 600 nM;<br>sonda 200 nM | 2               |
| H5 2.3.4.4b assay pre-mix | Primers 7,5 µM;<br>sonda 2,5 µM  | Primers 600 nM;<br>sonda 200 nM | 2               |
| 25X RT-PCR Enzyme Mix     | 25X  | 1X                              | 1               |
| Volume totale mix         | Miscelare la mix per pochi secondi, centrifugare brevemente e distribuirla in volumi di 20 µl per ciascun campione |                                 | 20              |
| Templato                  | Aggiungere il templato nelle rispettive provette   |                                 | 5               |
| Volume finale             |  |                                 | 25              |

### Reazione simplex 'H5 LPAI CS'

| Reagente                 | Concentrazione iniziale  | Concentrazione finale           | µl × 1 reazione |
|--------------------------|--|---------------------------------|-----------------|
| Nuclease free water      | -  | -                               | 4,5             |
| 2X RT-PCR Buffer         | 2X   | 1X                              | 12,5            |
| H5 LPAI CS assay pre-mix | Primers 7,5 µM;<br>sonda 2,5 µM  | Primers 600 nM;<br>sonda 200 nM | 2               |
| 25X RT-PCR Enzyme Mix    | 25X  | 1X                              | 1               |
| Volume totale mix        | Miscelare la mix per pochi secondi, centrifugare brevemente e distribuirli in volumi di 20 µl per ciascun campione |                                 | 20              |
| Templato                 | Aggiungere il templato nelle rispettive provette   |                                 | 5               |
| Volume finale            |  |                                 | 25              |

Le reazioni duplex e simplex avvengono in pozzetti distinti. È possibile distribuire la master mix e il templato manualmente oppure mediante campionatore robotizzato per la dispensazione di liquidi (Cas 1200, Qiagen oppure Myra, Bio Molecular Systems), seguendo le indicazioni riportate nell'istruzione di dettaglio "IZS IDD 285 - Utilizzazione del dispensatore automatico CAS-1200" o "IZS IDD 293 - Utilizzo di MYRA TM (Bio Molecular Systems)".

## 2) Amplificazione

| Profilo di amplificazione standard   |                     |          |
|--------------------------------------|---------------------|----------|
| FASE                                 | TEMPERATURA / TEMPO | n° CICLI |
| Reverse transcription                | 45°C/10 min         | 1        |
| RT inactivation/initial denaturation | 95°C/10 min         | 1        |
| Denaturation                         | 95°C/30 sec         | 40       |
| Annealing (*)                        | 58°C/15 sec         |          |
| Extension                            | 72°C/15 sec         |          |

(\*) acquisizione della fluorescenza per i canali:

- FAM 515-530λ – target H5 HPAI CS e H5 LPAI CS
- Cy5 675-690λ – target H5-2.3.4.4b

## 3) Rilevazione del prodotto

Al termine della reazione di amplificazione i dati vengono elaborati dal software CFX manager software Bio-Rad o dal Bio-Rad CFX maestro. Per tutti i target, la *threshold* può essere impostata in modo automatico o manualmente posizionandola sopra al rumore di fondo, all'inizio della fase esponenziale delle curve di amplificazione (circa 100 RFU; i valori possono variare in funzione del rumore di fondo tipico di ogni seduta/lotto di sonda).

Leggere i risultati secondo quanto riportato nei paragrafi 8.1 e 8.2.

### ATTIVITÀ POST PROCEDURA

**Invio del campione al centro di riferimento:** I campioni analizzati presso i laboratori dell'IZSVe abilitati all'esecuzione della prova per i quali sono stati rilevati i target ricercati (vedi p. 8.2) vengono inviati al EURL/LRN AI e ND per la conferma del risultato.

**Isolamento e caratterizzazione genetica:** I campioni per i quali sono stati rilevati i target ricercati (vedi p. 8.2), dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato possono essere sottoposti a isolamento virale (es. **PDP VIR 005**) o ad ulteriore caratterizzazione genetica (es. **PDP VIR 125**) presso EURL/LRN AI e ND.



## 8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

| Parametro         | Risultati attesi  | Azione in caso di non conformità   |
|-------------------|---|--|
| NPC (se previsto) | Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) ed assenza di curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche)<br><br>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)        | Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi |
| PPC (se previsto) | Incremento regolare di fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) caratterizzato da curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche)<br><br>Incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) caratterizzato da curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)                          | Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di ripetere la prova solo per i campioni negativi  |
| NTC               | Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) ed assenza di curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche)<br><br>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)        | Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la rRT-PCR. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi                    |
| PTC               | Incremento regolare di fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) caratterizzato da curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche) con $Ct = 27 \pm 3$<br><br>Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con $Ct = 27 \pm 3$ | Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC. Il <u>Responsabile di Laboratorio o un suo delegato</u> può decidere di ripetere la prova solo per i campioni negativi                             |

## 8.2 Espressione dei risultati

I risultati vengono espressi e riportati nei rapporti di prova con le seguenti modalità:

| CONDIZIONE DI LETTURA DEL CAMPIONE  | RISULTATO DELLA PROVA SUL FOGLIO DI LAVORO   | RISULTATO ESPRESSO SUL RDP  |
|---|--|---|
| Incremento regolare della fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) caratterizzato da curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche) con Ct ≤ 36<br><br>e<br><br>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)   | <b>Positivo H5 HPAI</b><br><b>Positivo H5 clade 2.3.4.4b</b><br><b>Negativo H5 LPAI</b>    | <b>Rilevato H5 HPAI</b><br><br><b>Rilevato H5 clade 2.3.4.4b</b><br><br><b>Non rilevato H5 LPAI</b>     |
| Incremento regolare della fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) caratterizzato da curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche) con Ct > 36<br><br>e<br><br>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)   | <b>Dubbio H5 HPAI</b><br><b>Dubbio H5 clade 2.3.4.4b e</b><br><b>Negativo H5 LPAI</b>      | <b>Dubbio H5 HPAI</b><br><br><b>Dubbio H5 clade 2.3.4.4b</b><br><br><b>Non rilevato H5 LPAI</b>         |
| Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 HPAI CS (reazione duplex) caratterizzato da curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 36, assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 2.3.4.4b (reazione duplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)<br><br>e<br><br>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica) | <b>Positivo H5 HPAI,</b><br><b>Negativo H5 clade 2.3.4.4b e</b><br><b>Negativo H5 LPAI</b> | <b>Rilevato H5 HPAI</b><br><br><b>Non rilevato H5 clade 2.3.4.4b</b><br><br><b>Non rilevato H5 LPAI</b> |
| Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 HPAI CS (reazione duplex) caratterizzato da curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica) con Ct > 36, assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 2.3.4.4b (reazione duplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)<br><br>e<br><br>Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica) | <b>Dubbio H5 HPAI,</b><br><b>Negativo H5 clade 2.3.4.4b e</b><br><b>Negativo H5 LPAI</b>   | <b>Dubbio H5 HPAI</b><br><br><b>Non rilevato H5 clade 2.3.4.4b</b><br><br><b>Non rilevato H5 LPAI</b>   |
| Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex)  | <b>Positivo H5 LPAI,</b><br><b>Negativo H5 HPAI e</b>                                      | <b>Rilevato H5 LPAI</b>   |



|   |   |  |
|---|---|--|
| <p>caratterizzato da curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica) con Ct ≤ 36</p> <p>e</p> <p>Assenza dell'incremento regolare della fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) ed assenza di curve di amplificazione sigmoideali (o logaritmiche)</p>  | <p><b>Negativo H5 clade 2.3.4.4b</b></p>                                    | <p><b>Non rilevato H5 HPAI</b></p> <p><b>Non rilevato H5 clade 2.3.4.4b</b></p>                              |
| <p>Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 LPAI CS (reazione simplex) caratterizzato da curva di amplificazione sigmoideale (o logaritmica) con Ct &gt; 36</p> <p>e</p> <p>Assenza dell'incremento regolare della fluorescenza relativa alle sonde per H5 HPAI CS e H5 2.3.4.4b (reazione duplex) ed assenza di curve di amplificazione sigmoideali (o logaritmiche)</p>  | <p><b>Dubbio H5 LPAI, Negativo H5 HPAI e Negativo H5 clade 2.3.4.4b</b></p> | <p><b>Dubbio H5 LPAI</b></p> <p><b>Non rilevato H5 HPAI</b></p> <p><b>Non rilevato H5 clade 2.3.4.4b</b></p> |
| <p>Tutti gli altri casi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Negativo H5 HPAI CS, Positivo/Dubbio clade 2.3.4.4b, Negativo H5-LPAI CS</li> <li>- Negativo H5 HPAI CS, Negativo clade 2.3.4.4b, Negativo H5-LPAI CS</li> <li>- Positivo H5 HPAI CS, Positivo clade 2.3.4.4b, Positivo H5-LPAI CS</li> <li>- Positivo H5 HPAI CS, Negativo clade 2.3.4.4b, Positivo H5-LPAI CS</li> <li>- Negativo H5 HPAI CS, Positivo clade 2.3.4.4b, Positivo H5-LPAI CS</li> </ul> | <p><b>Effettuato</b></p>  | <p><b>Non tipizzabile</b></p>  |

Il bordo della tabella evidenziato in rosso indica le colonne il cui contenuto è riportato nel rapporto di prova.

Nel caso di risultato dubbio o non tipizzabile, il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato può decidere di:

- ripetere l'analisi a partire dall'amplificazione o dall'estrazione
- eseguire un test alternativo per la patotipizzazione di virus dell'influenza aviaria del sottotipo H5 (vedi paragrafo 8, Attività post procedura)

## 9. Sanificazione degli ambienti/attrezzature di lavoro e gestione dei rifiuti prodotti dalla procedura

Sanificare gli ambienti di lavoro secondo l'istruzione **"IZS IDD 222 - Sanificazione di attrezzature e superfici nei laboratori e sale necroscopiche"** e le attrezzature utilizzate secondo le specifiche del costruttore o documenti inerenti, presenti in WebQuality.

Per l'evidenziazione delle tipologie dei rifiuti derivati dall'esecuzione della procedura, fare riferimento **"PR 09 - Gestione dei rifiuti"**, fare riferimento alle seguenti istruzioni di dettaglio:

- **"IZS IDD 274 - Elenco dei rifiuti, specifico di laboratorio"**
- **"IZS IDD 305 - Istruzioni specifiche per la gestione di determinate tipologie di rifiuti"**

## 10. Matrice delle revisioni

| Rev. | Data     | Descrizione   | Redatto da                               | Verificato da                             | Approvato da                             |
|------|----------|---|--|---|--|
| 00   | 16.05.23 | Prima emissione   | Dr.ssa V. Panzarin<br>Dr.ssa S. Marciano | Dr.ssa L. Ceglie<br>Dr.ssa P. Carnieletto | Direttore Sanitario<br>Dr.ssa G. Capelli |
| 01   | 08.01.26 | Revisione layout, estensione campo di applicazione, aggiornamento del riferimento a capitolo WOA, inserimento strumentazione robotizzata, criteri di accettabilità dei controlli, espressione dei risultati e revisioni formali | Dr.ssa V. Panzarin<br>Dr.ssa S. Marciano | Dr.ssa P. Carnieletto<br>Dr.ssa L. Ceglie | Direttore Sanitario<br>Dr. G. Cattoli    |