1. Scopo e campo di applicazione della prova

Target	Matrice + Specie	Tecnica di prova
Segmento 4 del genoma del virus dell'influenza aviaria di tipo A (AIV) codificante per la subunità HA2 dell'emoagglutinina del sottotipo H5	Isolati virali, organi/tessuti, feci e tamponi da specie aviarie e di mammifero, latte di specie animale, tamponi nasali/faringei umani, RNA/DNA estratto dalle suddette matrici	One step reverse transcriptase Real Time PCR qualitativa (rRT-PCR)
Scopo della prova		
Analisi di sub-tipizzazione di virus H5 Euroasiatici. Applicabile a campioni aviari domestici e selvatici e a campioni da mammifero, ivi compresi soggetti umani esposti ai suddetti virus. In caso di comprovata circolazione di virus H5 in una popolazione di animali domestici o selvatici, la prova può essere eseguita come analisi di prima istanza, dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato. In queste circostanze, la metodica prevede l'uso del controllo interno esogeno.		

2. Metodo e riferimenti al fascicolo validazione

Metodo:
- PDP VIR 143 2024 Rev. 4

Bibliografia di riferimento:
- M.J. Slomka, T. Pavlidis, J. Banks, W. Shell, A. McNally, S. Essen, I.H. Brown. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. Avian Dis 51(1 Suppl):373-7, 2007. doi: 10.1637/7664-060906R1.1
- B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeier, M. Beer. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J Virol Methods 136(1-2):200-9, 2006. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020
- WOAH - World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023, Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (Version adopted in May 2021)

Caratteristiche del metodo:
- Fascicolo di validazione n. VIR143V

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*
- Piattaforma CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad) e relativi consumabili, o analogo strumento
- Piattaforma Rotor Gene Q (Qiagen), Rotor Gene 6000 (Corbett) e relativi consumabili, o analogo strumento
- Piattaforma Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems) e relativi consumabili, o analogo strumento
- Sistema robotizzato per dispensazione di liquidi (liquid handling system) Cas 1200 (Qiagen) oppure Myra (Bio Molecular Systems) (opzionale) e relativi puntali con filtro sterili

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

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

Prodotto	Fornitore/Specifiche	Conservazione
QIAGEN OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen / rRT-PCR	≤ -18°C
Primer senso H5LH1	Commerciale 5'-ACATATGACTACCCACARTATTCAG-3'	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso
Primer antisenso H5RH1	Commerciale 5'-AGACCAGCTAYCATGATTGC-3'	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso
Sonda H5PRO	Commerciale FAM-5'-TCWACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA-3'-TAMRA/BHQ/BBQ1	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzata, ≤ -18°C se risospesa Conservare al buio
Primer senso IC-11F (se previsto controllo interno)	Commerciale 5'-CAGCCACAACGTCTATATCATG-3'	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso
Primer antisenso IC-2R (se previsto controllo interno)	Commerciale 5'-GAACTCCAGCAGGACCATG-3'	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzato, ≤ -18°C se risospeso
Sonda IC (se previsto controllo interno)	Commerciale CY5-5'-AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-3'-BHQ2	Temperatura ambiente o ≤ -18°C se liofilizzata, ≤ -18°C se risospesa Conservare al buio
$MgCl_2$ 25 mM	Commerciale / rRT-PCR	≤ -18°C
RNase Inhibitor 40U/µl	Commerciale / rRT-PCR	≤ -18°C
Materiali di riferimento: RNA estratto da antigene di influenza aviare sottotipo H5	Controllo positivo di PCR (PTC) per il target H5 estratto da antigene prodotto e certificato dalla SCS6 - U.O. Colture cellulari, reagenti e produzione e opportunamente diluito secondo i criteri di accettabilità stabiliti al par. 8.1	≤ -70°C
intype IC-RNA (se previsto controllo interno)	Indical Bioscience / Controllo positivo di PCR (PTC) per il controllo interno/ "**ALL PDP 281** - Handbook intype IC-RNA"	≤ -18°C

4.1 Preparazione delle soluzioni

Prodotto	Modalità preparazione	Conservazione
Oligonucleotidi (primers e sonde)	Risospendere secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice con TE pH 8 o acqua per biologia molecolare nuclease-free per ottenere una soluzione 100 µM. Successivamente portare alle concentrazione d'uso	≤ -18°C Conservare le sonde al buio
Internal control assay pre-mix (se previsto controllo interno)	Unire i seguenti reagenti nei volumi indicati per ottenere 200 µl di pre-mix: • TE pH 8.0: 186,25 µl • Primer IC-11F (100 µM): 5 µl • Primer IC-2R (100 µM): 5 µl • Sonda IC (100 µM): 3,75 µl	≤ -18°C, al buio

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

- Scongelare 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 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 mastermix 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** - 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 nell'allegato **ALL PDP 1000**. Se la procedura è eseguita come analisi di prima istanza, dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato è possibile prevedere durante la seduta di estrazione l'utilizzo del controllo interno intype IC-RNA (Indical Bioscience).

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**.

- **PTC per H5** (controllo positivo di amplificazione per H5): campione costituito da RNA estratto da antigene di influenza aviaria del sottotipo H5 in assenza di IC-RNA secondo allegato **ALL PDP 1000** e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di amplificazione
- **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
- **IC** (controllo interno esogeno, se previsto): intype IC-RNA (Indical Bioscience) aggiunto durante la fase di estrazione al campione lisato secondo allegato **ALL PDP 1000**, e co-amplificato con il target virale in modalità duplex
- **NPC** (controllo negativo di processo): campione negativo per H5 (tipicamente, acqua per biologia molecolare nuclease-free o PBS antibiotato) contenente intype IC-RNA (Indical Bioscience) (se previsto) e processato unitamente ai campioni in esame a partire dalla fase di estrazione secondo allegato **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
- **PTC per IC-RNA** (controllo positivo di amplificazione per IC-RNA, se previsto): campione costituito da intype IC-RNA (Indical Bioscence) diluito 1:100 in acqua per biologia molecolare nuclease-free 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

Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	µl × 1 reazione
RNase-free water	-	-	11
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5
dNTP Mix	10 mM	0,4 mM	1
$MgCl_2$	25 mM	1,25 mM	1,25
H5LH1	50 µM	0,4 µM	0,2
H5RH1	50 µM	0,4 µM	0,2
H5PRO	6 µM	0,3 µM	1,25
Internal control assay pre-mix (*)	-	-	2
RNase Inhibitor	40 U/µl	4 U	0,1
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	-	-	1
Volume totale mix	Miscelare la mix per pochi secondi, centrifugare brevemente e distribuirla in volumi di 23 µl per ciascun campione		23
Templato	Aggiungere il templato nelle rispettive provette		2
Volume finale			25

(*) aggiungere solo se previsto l'uso del controllo interno. Contrariamente, sostituire con un egual volume di acqua per biologia molecolare nuclease-free

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 istruzioni riportate nell'istruzione operativa "**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	50°C/30 min	1
RT inactivation/initial denaturation	95°C/15 min	1
Denaturation	95°C/10 sec	40
Annealing (*)	54°C/30 sec	
Extension	72°C/10 sec	

(*) acquisizione della fluorescenza per i canali:

CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad)

- FAM 495-525λ,– target H5
- Cy5 675-690λ – controllo interno esogeno (se previsto)

Rotor Gene Q (Qiagen), Rotor Gene 6000 (Corbett)
- FAM 460-515λ,– Target H5
- Cy5 620-670λ – controllo interno esogeno (se previsto)

Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems)
- FAM 515λ,– Target H5
- Cy5 674λ – controllo interno esogeno (se previsto)

3) Rilevazione del prodotto

- CFX 96 Deep well Real-Time PCR Systems C1000 Touch (Biorad-Rad): i dati vengono elaborati dal CFX manager software Bio-Rad o dal Bio-Rad CFX maestro. Per i diversi 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 (< 50 RFU circa; il valore della threshold può variare in funzione del rumore di fondo tipico di ogni seduta/lotto di sonda)
- Rotor Gene Q (Qiagen), Rotor Gene 6000 (Corbett): i dati vengono elaborati dal Rotor Gene 6000/RotorGene Q series software (Corbett/Qiagen). Nella finestra di analisi Quantitation, selezionare le opzioni Dynamic tube e Slope Correct. Per tutti i target, eliminare eventuali segnali aspecifici di fluorescenza mediante l'opzione outlier removal (valore pari a 5-10%) ed impostare la threshold ad un valore di 0,01
- Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems): i dati vengono elaborati dal BMS Workbench software (Bio Molecular Systems). Nella finestra di Cycling del menu Analysis, selezionare ogni singolo fluoroforo che sarà analizzato separatamente. Per tutti i target, eliminare eventuali segnali aspecifici di fluorescenza mediante l'opzione "Fluorescence cutoff level" (valore pari a 5-10%) ed effettuare la lettura con threshold automatica (voce "Auto Set Threshold")

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

ATTIVITÀ POST PROCEDURA

Invio del campione al centro di referenza: I campioni analizzati presso i laboratori dell'IZSVe abilitati per i quali è stato rilevato il target H5 (vedi p. 8.2), vengono inviati ai laboratori del Dipartimento di Scienze Biomediche comparate (DSBIO) per la conferma diagnostica e successiva determinazione del patotipo.

Determinazione del patotipo: I campioni per i quali è stato rilevato il target H5 (vedi p. 8.2) vengono sottoposti ad ulteriori approfondimenti diagnostici per l'identificazione del patotipo (es. **PDP VIR 125, PDP VIR 1005**) presso i laboratori del DSBIO.

Isolamento e caratterizzazione genetica: I campioni per i quali è stato rilevato il target H5 (vedi p. 8.2), dopo valutazione del Responsabile di Laboratorio o un suo delegato possono essere sottoposti a isolamento virale o ad ulteriore caratterizzazione genetica (es. **PDP VIR 005**) presso i laboratori del DSBIO.

8.1 Verifiche delle condizioni di accettabilità

Parametro	Risultati attesi	Azione in caso di non conformità
PTC per H5	Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct = 27 ± 3	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dello stock di PTC. Il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato può decidere di ripetere la prova solo per i campioni negativi
NTC	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alle sonde H5 e IC (se previsto) ed assenza di curve di amplificazione sigmoidali (o logaritmiche)	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione, previo controllo dei reagenti per la rRT-PCR. Il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato può decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi
IC (se previsto)	• Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC, caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 30, associato a un qualsiasi risultato per H5 • Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per IC ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), associato a rilevazione di H5	In caso di mancata amplificazione o di Ct > 30 per IC associato a dubbia o mancata rilevazione di H5, il campione viene considerato **Inadatto** (vedi paragrafo 8.2.2). Tuttavia, è possibile ripetere l'analisi a partire dalla fase di amplificazione, diluendo gli acidi nucleici estratti 1:10 con acqua per biologia molecolare nuclease-free. In alternativa, è possibile ripetere l'analisi a partire dalla fase di estrazione diluendo maggiormente il campione biologico secondo le indicazioni riportate nell'allegato **ALL PDP 1000**
NPC	Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), associata a incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC (se previsto controllo interno) caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 30	Ripetere la prova partendo dalla fase di estrazione, previo controllo dei reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici. Il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato può decidere di ripetere la prova solo per i campioni positivi
PTC per IC (se previsto)	Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per IC caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 30	Ripetere la prova partendo dalla fase di amplificazione solo nel caso in cui nell'intera seduta il controllo interno dei campioni sia non conforme, previo controllo dei reagenti per l'amplificazione di IC e lo stock di IC-RNA utilizzato nella seduta

8.2 Espressione dei risultati

8.2.1 Espressione standard 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 alla sonda per H5 caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con un valore di Ct ≤ 35	**Positivo**	**Rilevato**
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5, ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica)	**Negativo**	**Non rilevato**
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con un valore di Ct > 35	**Dubbio**	**Dubbio** Il Responsabile di Laboratorio può aggiungere nel campo "valore" e "note esterne" di Izilab eventuali commenti o raccomandazioni

8.2.2 Espressione dei risultati nel caso di prova eseguita come analisi di prima istanza in presenza di IC

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
• Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 ed assenza di curva di amplificazione sigmoidale (o logaritmica), in presenza di IC non conforme • Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct > 35, in presenza di IC non conforme	**Inadatto**	**Inadatto** Il Responsabile di Laboratorio può aggiungere nel campo "valore" di Izilab la motivazione della non idoneità del campione ed eventualmente suggerire un ricampionamento nel campo "note esterne"
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct ≤ 35, indipendentemente dalla conformità di IC	**Positivo**	**Rilevato**
Assenza dell'incremento regolare di fluorescenza relativa alla sonda per H5 ed assenza di curva di amplificazione sigmoidali (o logaritmica), in presenza di IC conforme	**Negativo**	**Non rilevato**
Incremento regolare della fluorescenza relativa alla sonda per H5 caratterizzato da curva sigmoidale (o logaritmica) con Ct > 35, in presenza di IC conforme	**Dubbio**	**Dubbio** Il Responsabile di Laboratorio può aggiungere nel campo

		"valore" e "note esterne" di Izilab eventuali commenti o raccomandazioni

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

Nel caso di dubbi interpretativi o risultati non conclusivi, il Responsabile di Laboratorio o un suo delegato può decidere di ripetere l'analisi a partire dall'estrazione e/o eseguire un test alternativo per la rilevazione del sottotipo H5.

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 degli ambienti di lavoro dei laboratori non BSL3" 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, secondo il processo "**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
02	28.02.19	Revisione per inserimento metodo di estrazione automatizzato	Dr.ssa I. Monne Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa Carnieletto Dr. Terregino	Direttore Sanitario Dr.ssa A. Ricci
03	20.07.22	Revisione layout, scorporazione della fase di preparazione del campione e di estrazione nell'ALL PDP 1000, inserimento del controllo interno e piattaforma per real time PCR CFX 96	Dr.ssa V. Panzarin Dr.ssa S. Marciano	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa E. Stefani	Direttore Sanitario Dr.ssa G. Capelli
04	11.07.24	Revisione layout, estensione campo di applicazione, inserimento nuova piattaforma real time PCR e strumentazione robotizzata, espressione dei risultati, criteri di accettabilità dei controlli e revisioni formali	Dr.ssa V. Panzarin Dr. A. Fortin	Dr.ssa P. Carnieletto Dr.ssa A. Drago	Direttore Sanitario Dr. G. Cattoli