



# Ministero della Salute

## DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE, DELLA RICERCA E DELLE EMERGENZE SANITARIE

### Ex DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE SANITARIA

Ufficio 3 - Coordinamento tecnico degli Uffici di sanità marittima, aerea e di frontiera e dei Servizi territoriali di assistenza sanitaria al personale navigante USMAF- SASN

Ufficio 5 - Prevenzione delle malattie trasmissibili e profilassi internazionale

#### A

Ufficio di Gabinetto  
Sede

Ufficio 11 - Gestione sanitaria delle emergenze ex  
DGPRES  
Sede

Ufficio 12 - Attività tecnico-logistiche ex DGPRES  
Sede

Ufficio 13 - Ufficio giuridico amministrativo-  
contabile ex DGPRES  
Sede

U.S.M.A.F. – S.A.S.N. Uffici di Sanità Marittima,  
Aerea e di Frontiera  
LORO SEDI

Assessorati alla Sanità Regioni Statuto Ordinario e  
Speciale  
LORO SEDI

Assessorati alla Sanità Province Autonome Trento  
e Bolzano  
LORO SEDI

Regione Veneto – Assessorato alla sanità  
Direzione Regionale Prevenzione  
Coordinamento Interregionale della Prevenzione  
[francesca.russo@regione.veneto.it](mailto:francesca.russo@regione.veneto.it)  
[coordinamentointerregionaleprevenzione@regione.veneto.it](mailto:coordinamentointerregionaleprevenzione@regione.veneto.it)

Protezione Civile

[Coordinamento.emergenza@protezionecivile.it](mailto:Coordinamento.emergenza@protezionecivile.it)  
[protezionecivile@pec.governo.it](mailto:protezionecivile@pec.governo.it)

Ministero Economia e Finanze  
[mef@pec.mef.gov.it](mailto:mef@pec.mef.gov.it)

Ministero delle Imprese e del Made in Italy  
[gabinetto@pec.mise.gov.it](mailto:gabinetto@pec.mise.gov.it)

Ministero Infrastrutture e  
Trasporti  
[ufficio.gabinetto@pec.mit.gov.it](mailto:ufficio.gabinetto@pec.mit.gov.it)

Ministero Del Lavoro e Politiche Sociali  
[segreteriaministro@pec.lavoro.gov.it](mailto:segreteriaministro@pec.lavoro.gov.it)

Ministero della Cultura  
[mbac-udcm@mailcert.beniculturali.it](mailto:mbac-udcm@mailcert.beniculturali.it)

Ministero del Turismo  
[ufficiodigabinetto.turismo@pec.it](mailto:ufficiodigabinetto.turismo@pec.it)

Ministero degli Affari Esteri e della Cooperazione  
Internazionale  
[gabinetto.ministro@cert.esteri.it](mailto:gabinetto.ministro@cert.esteri.it)

Ministero della Difesa Ispettorato Generale della  
Sanità Militare  
[stamadifesa@postacert.difesa.it](mailto:stamadifesa@postacert.difesa.it)

Ministero dell'Università e della Ricerca  
[uffgabinetto@postacert.istruzione.it](mailto:uffgabinetto@postacert.istruzione.it)

Ministero dell'Istruzione e del Merito  
[uffgabinetto@postacert.istruzione.it](mailto:uffgabinetto@postacert.istruzione.it)

Ministero dell'Interno  
[gabinetto.ministro@pec.interno.it](mailto:gabinetto.ministro@pec.interno.it)

Ministero della Giustizia  
[capo.gabinetto@giustiziacert.it](mailto:capo.gabinetto@giustiziacert.it)

Dipartimento dell'Amministrazione Penitenziaria  
Direzione Generale dei Detenuti e del Trattamento  
Ministero della Giustizia  
[prot.dgdt.dap@giustiziacert.it](mailto:prot.dgdt.dap@giustiziacert.it)  
[gabinetto.ministro@giustiziacert.it](mailto:gabinetto.ministro@giustiziacert.it)

Ministero dell'agricoltura, della sovranità  
alimentare e delle foreste  
[ministro@pec.politicheagricole.gov.it](mailto:ministro@pec.politicheagricole.gov.it)

Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza  
Energistica  
[segreteria.ministro@pec.minambiente.it](mailto:segreteria.ministro@pec.minambiente.it)

Presidenza Consiglio dei Ministri - Dipartimento  
per gli Affari Regionali e le Autonomie  
[affariregionali@pec.governo.it](mailto:affariregionali@pec.governo.it)

Associazione Nazionale Comuni Italiani (ANCI)  
[anci@pec.anci.it](mailto:anci@pec.anci.it)

Federazione Nazionale Ordine dei Medici  
Chirurghi e degli Odontoiatri  
[segreteria@pec.fnomceo.it](mailto:segreteria@pec.fnomceo.it)

FNOPI Federazione Nazionale Ordini Professioni  
Infermieristiche  
[federazione@cert.fnopi.it](mailto:federazione@cert.fnopi.it)

FNOPO Federazione Nazionale degli Ordini della  
Professione di Ostetrica  
[presidenza@pec.fnopo.it](mailto:presidenza@pec.fnopo.it)

FNOVI Federazione Nazionale Ordini Veterinari  
Italiani  
[info@fnovi.it](mailto:info@fnovi.it)

FOFI Federazione Ordini Farmacisti Italiani  
[posta@pec.fofi.it](mailto:posta@pec.fofi.it)

Federazione Nazionale Ordini dei TSRM e delle  
Professioni Sanitarie Tecniche, della Riabilitazione  
e della Prevenzione  
[federazione@pec.tsrn.org](mailto:federazione@pec.tsrn.org)

Istituti Zooprofilattici Sperimentali  
[www.izsmportici.it](http://www.izsmportici.it)

Azienda Ospedaliera - Polo Universitario Ospedale  
Luigi Sacco  
[protocollo.generale@pec.asst-fbf-sacco.it](mailto:protocollo.generale@pec.asst-fbf-sacco.it)

Comando Carabinieri Tutela della Salute – NAS  
[srm20400@pec.carabinieri.it](mailto:srm20400@pec.carabinieri.it)

Istituto Superiore di Sanità  
[protocollo.centrale@pec.iss.it](mailto:protocollo.centrale@pec.iss.it)

Centro Nazionale Trapianti (CNT)  
[cnt@iss.it](mailto:cnt@iss.it)

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive – IRCCS  
“Lazzaro Spallanzani”  
[direzionegenerale@pec.inmi.it](mailto:direzionegenerale@pec.inmi.it)

Centro Internazionale Radio Medico (CIRM)  
[fondazionecirm@pec.it](mailto:fondazionecirm@pec.it)  
Istituto Nazionale per la promozione della salute  
delle popolazioni migranti e per il contrasto delle  
malattie della povertà (INMP)  
[inmp@pec.inmp.it](mailto:inmp@pec.inmp.it)

Federazione delle Società Medico-Scientifiche  
Italiane (FISM)  
[fism.pec@legalmail.it](mailto:fism.pec@legalmail.it)

Direzione Generale Programmazione Sanitaria  
DGPROGS SEDE

Ordine Nazionale dei Biologi  
[protocollo@peconb.it](mailto:protocollo@peconb.it)

Agenzia nazionale per i servizi sanitari regionali  
AGENAS  
[agenas@pec.agenas.it](mailto:agenas@pec.agenas.it)

Federazione Nazionale degli Ordini dei CHIMICI e  
dei FISICI  
[segreteria@pec.chimici.it](mailto:segreteria@pec.chimici.it)

Dipartimento per le Politiche della Famiglia ROMA  
[segredipfamiglia@pec.governo.it](mailto:segredipfamiglia@pec.governo.it)

Dipartimento per le Politiche in favore delle  
persone con disabilità ROMA  
[ufficio.disabilita@pec.governo.it](mailto:ufficio.disabilita@pec.governo.it)

**OGGETTO: Infezione da mpox virus (MPXV): Aggiornamento delle definizioni di caso e note tecniche per la diagnosi di laboratorio**

Facendo seguito alle indicazioni contenute nella circolare del Ministero della salute n. 24775 del 19/08/2024, si aggiornano le definizioni di caso e si forniscono le 'Note tecniche per la diagnosi di laboratorio di infezione da mpox virus (MPXV)' realizzate in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), presso il quale viene individuato il Laboratorio nazionale di riferimento per mpox, d'intesa con l'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, parte del Consorzio dei Laboratori Europei di riferimento designati dalla Commissione europea.

*Aggiornamento delle definizioni di caso per la sorveglianza di mpox<sup>1</sup>*

Si riporta di seguito l'aggiornamento delle definizioni di caso di mpox. Tali definizioni hanno finalità di sorveglianza e non devono essere utilizzate per guidare la gestione clinica. Sono state sviluppate con l'obiettivo di identificare i casi e interrompere le catene di trasmissione. Quanto di seguito indicato potrebbe subire ulteriori revisioni alla luce di future evidenze.

**Caso sospetto**

Una persona che risulti essere un contatto di caso probabile o confermato nei 21 giorni precedenti l'esordio di sintomatologia e che presenti almeno uno dei seguenti sintomi o segni: insorgenza acuta di febbre (>38,5°C), mal di testa, mialgia, mal di schiena, astenia

**OPPURE**

Una persona che presenti un'eruzione cutanea acuta inspiegabile, lesioni della mucosa o linfadenopatia (ingrossamento dei linfonodi). L'eruzione cutanea può comprendere lesioni singole o multiple nella regione ano-genitale o in altre parti del corpo. Le lesioni della mucosa possono includere lesioni singole o multiple nel cavo orale, nella congiuntiva, nell'uretra, nel pene, nella vagina o nell'ano-retto. Le lesioni ano-rettali possono anche manifestarsi come infiammazione ano-rettale (proctite), dolore e/o sanguinamento

**E**

per la quale le seguenti cause comuni di eruzione cutanea acuta o lesioni non spiegano completamente il quadro clinico: varicella zoster, herpes zoster, morbillo, herpes simplex, infezioni batteriche della pelle, infezione diffusa da gonococco, sifilide primaria o secondaria, cancrena, linfogranuloma venereo, granuloma inguinale, mollusco contagioso, reazione allergica (per esempio, alle piante); e qualsiasi altra causa comune localmente rilevante di eruzione papulare o vescicolare.

*NB In presenza di un quadro clinico riconducibile a mpox non è necessario attendere i risultati di laboratorio negativi per le cause comuni sopra elencate di eruzione cutanea per classificare un caso*

<sup>1</sup> WHO: [Surveillance, case investigation and contact tracing for Monkeypox: Interim guidance \(who.int\)](https://www.who.int/publications/m/item/surveillance-case-investigation-and-contact-tracing-for-monkeypox-interim-guidance);

ECDC: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/MPX-reporting-protocol-v5-2024.pdf>

come sospetto. Inoltre, poiché sono note co-infezioni con altri patogeni, l'identificazione di un patogeno alternativo, quale causa della malattia esantematica, non deve precludere l'effettuazione di un test per la ricerca di MPXV quando sussista un elevato sospetto di infezione da mpox supportato dalle informazioni anamnestiche, dalla presentazione clinica o dalla possibile esposizione a un caso di mpox.

#### Caso probabile

Una persona che presenti un'eruzione cutanea acuta inspiegabile, lesioni della mucosa o linfadenopatia (ingrossamento dei linfonodi). L'eruzione cutanea può comprendere lesioni singole o multiple nella regione ano-genitale o in altre parti del corpo. Le lesioni della mucosa possono includere lesioni singole o multiple nel cavo orale, nella congiuntiva, nell'uretra, nel pene, nella vagina o nell'ano-retto. Le lesioni ano-rettali possono anche manifestarsi come infiammazione ano-rettale (proctite), dolore e/o sanguinamento

#### E

uno o più dei seguenti elementi:

- ha un legame epidemiologico<sup>2</sup> con un caso probabile o confermato di mpox nei 21 giorni precedenti l'insorgenza dei sintomi
- ha avuto partner sessuali multipli o anonimi nei 21 giorni precedenti la comparsa dei sintomi;
- è risultato positivo al test per l'infezione da orthopoxvirus (ad esempio, PCR specifica per OPXV senza PCR o sequenziamento specifico per MPXV)<sup>3</sup>.

#### Caso confermato

Caso confermato in laboratorio per infezione da MPXV attraverso la rilevazione di sequenze uniche di DNA virale mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)<sup>4</sup> in tempo reale e/o sequenziamento.

#### Caso scartato

Un caso sospetto o probabile per il quale i test di laboratorio mediante PCR e/o sequenziamento su campioni di liquido delle lesioni cutanee o delle croste sono risultati negativi per MPXV. Al contrario un caso probabile, rilevato retrospettivamente, per il quale non sia più possibile eseguire adeguatamente l'analisi della lesione (ad esempio, dopo la caduta delle croste) e nessun altro campione risulti positivo alla PCR, rimane classificato come caso probabile. Un caso sospetto o

<sup>2</sup> La persona è stata esposta ad un caso probabile o confermato di mpox. Consultare la Circolare n. 24775 del 19/08/2024 per la definizione di contatto stretto.

<sup>3</sup> La PCR su un campione di sangue può essere inaffidabile e non dovrebbe essere utilizzata da sola come test diagnostico di prima linea. Se la PCR su sangue è negativa ed è stato l'unico test effettuato, non è sufficiente per scartare un caso che altrimenti soddisfa la definizione di caso sospetto o probabile. Questo vale indipendentemente dal fatto che la PCR su sangue fosse specifica per OPXV o MPXV

<sup>4</sup> La conferma dell'infezione da MPXV deve tenere conto delle informazioni cliniche ed epidemiologiche. Per le specifiche indicazioni sui test diagnostici consultare le 'Note tecniche per la diagnosi di laboratorio di infezione da mpox virus (MPXV)' di seguito allegate.

probabile non deve essere scartato sulla base di un risultato negativo di un tampone orofaringeo, anale o rettale o del solo esame del sangue.

## **Reinfezione**

### **Caso di sospetta reinfezione**

Una persona che soddisfi attualmente i criteri di caso confermato di mpox

E

- presenti una storia documentata di una precedente infezione da MPXV, sospetta, probabile o confermata;
- senza evidenza di una risoluzione clinica completa dell'episodio precedente.

### **Caso di probabile reinfezione**

Una persona che soddisfi attualmente i criteri di caso confermato di mpox

E

- presenti una storia documentata di una precedente infezione da MPXV, probabile o confermata;
- con completa risoluzione clinica della precedente infezione da MPXV;
- il tempo intercorso tra la risoluzione del primo episodio e l'insorgenza dei nuovi sintomi è minore di tre mesi.

### **Caso confermato di reinfezione**

Una persona che soddisfi attualmente i criteri di caso confermato di mpox

E

- presenti una storia documentata di una precedente infezione da MPXV confermata;
- con completa risoluzione clinica della precedente infezione da MPXV;
- il tempo intercorso tra la risoluzione del primo episodio e l'insorgenza dei nuovi sintomi è maggiore o pari ai tre mesi;
- quando possibile, la differenziazione dei ceppi virali è effettuata mediante sequenziamento genetico.

### **OPPURE**

- Ha una probabile reinfezione da MPXV (come descritto sopra) con una significativa differenziazione dei ceppi tra le due infezioni da MPXV (ad esempio, lignaggio diverso e lignaggi discendenti) attraverso il sequenziamento genetico.

### *Sorveglianza*

Si ribadisce l'importanza di segnalare tempestivamente i nuovi casi di mpox tramite la piattaforma PREMAL.

Nelle more dell'aggiornamento della scheda PREMAL è necessario riportare il dato del *clade* e dell'eventuale confermata reinfezione nelle note.

Si ricorda di compilare la scheda PREMAL in tutte le parti e di trasmettere tempestivamente all'indirizzo [coordinamento.contacttracing@sanita.it](mailto:coordinamento.contacttracing@sanita.it) del Ministero della Salute eventuali informazioni necessarie ai fini di tracciamento dei contatti.

### *Note tecniche per la diagnosi di laboratorio di infezione da mpox virus (MPXV)*

#### **Punti chiave**

- Test di laboratorio per la diagnosi di infezione da mpox virus (MPXV) andrebbero eseguiti per tutti i casi sospetti.
- Il tipo di campione raccomandato per l'esecuzione dei test è il materiale prelevato dalle lesioni cutanee, inclusi i tamponi di essudato della lesione, frammenti di cute prelevati dalla superficie di più lesioni, o croste della lesione.
- La manipolazione in laboratorio di campioni provenienti da casi sospetti, probabili o confermati di mpox dovrebbe essere condotta con cautela, e comunque seguendo un approccio basato sulla valutazione del rischio.
- Per la diagnosi si utilizzano test di amplificazione dell'acido nucleico (PCR, real-time PCR), generici per orthopoxvirus (OPXV) e/o, specifici per MPXV, eseguiti su DNA estratto dai campioni biologici.
- Il sequenziamento è utile per confermare il risultato della PCR, determinare il Clade e il Sub-clade del virus e per chiarire l'epidemiologia.

#### *Indicazioni per l'esecuzione dei test*

Il test PCR per mpox deve essere offerto a tutte le persone che soddisfano la definizione di caso sospetto.

L'eruzione cutanea che si sviluppa nell'infezione da MPXV può somigliare ad altre malattie infettive o ad altre condizioni. Esempi di altre eziologie per lesioni cutanee di aspetto simile nei diversi stadi di sviluppo includono l'herpes simplex virus (tipo 1 e 2), il virus varicella zoster, il virus del mollusco contagioso, enterovirus, il virus del morbillo, l'acaro della scabbia, *Treponema pallidum* (sifilide), infezione disseminata da gonococco, infezioni batteriche della pelle, allergie ai farmaci, parapoxvirus, e ulcera molle.

### *Raccolta, spedizione e conservazione dei campioni biologici per l'esecuzione dei test diagnostici per MPXV*

#### **Procedure di sicurezza e gestione del rischio biologico.**

Per la manipolazione dei campioni biologici da casi sospetti, probabili o confermati di infezione da MPXV, si raccomanda un approccio basato sulla valutazione del rischio, che deve essere condotta localmente da ciascun laboratorio. Per l'esecuzione delle procedure diagnostiche, devono essere soddisfatti come minimo i requisiti fondamentali di livello 2 di biosicurezza, con eventuali misure di controllo rafforzate in base alla valutazione del rischio locale. Per le procedure di isolamento e propagazione del virus è invece necessario l'utilizzo di un laboratorio di livello 3 di biosicurezza (BSL-3) e che tali procedure siano eseguite preferibilmente da personale vaccinato per il vaiolo, in attesa di raccomandazioni specifiche emanate dagli enti competenti.

Si riportano di seguito in maggior dettaglio le procedure e le misure di biosicurezza raccomandate per l'esecuzione dei test diagnostici (che non prevedano l'isolamento e la propagazione del virus):

- Il personale di laboratorio deve essere adeguatamente formato sull'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale (DPI), la raccolta, la conservazione, l'imballaggio e il trasporto dei campioni.
- Tutti i campioni raccolti per le indagini di laboratorio devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati con cautela, utilizzando una cappa biologica di classe 2, almeno fino a quando il campione non sia stato inattivato.
- Il personale di laboratorio deve indossare DPI appropriati, in particolare per la manipolazione dei campioni prima dell'inattivazione.
- Quando per una procedura è richiesto l'uso di una centrifuga, è necessario utilizzare rotori sigillati.
- Evitare le procedure che potrebbero generare aerosol infetti.
- I disinfettanti efficaci includono composti di ammonio quaternario e candeggina allo 0,5% (o 200 ppm) (preparata fresca) per la disinfezione di superfici, DPI, strumenti e dispositivi e candeggina allo 0,05 per l'igiene delle mani.
- Garantire una rigorosa aderenza alle linee guida per la prevenzione e il controllo delle infezioni durante la raccolta e la manipolazione dei campioni biologici.
- Al personale di laboratorio con possibile esposizione diretta a orthopoxvirus, è offerta vaccinazione con MVA-BN, ai sensi della Circolare del Ministero della Salute 35365 del 5 agosto 2022.

#### **Campioni biologici da raccogliere**

Campione di elezione per la diagnosi di laboratorio di infezione da MPXV è il materiale prelevato dalle lesioni cutanee (vescicole, pustole): tamponi effettuati sulla superficie della lesione e/o

sull'essudato, frammenti di cute prelevati dalla parete superiore delle vescicole (denominate *roofs* nelle note tecniche internazionali), o croste, preferibilmente prelevati da almeno due lesioni in diverse aree del corpo. Possono essere utilizzati sia tamponi asciutti che tamponi inseriti in mezzi di trasporto virale (VTM). I risultati di questi campioni mostrano la migliore correlazione sia con l'infettività che con il decorso clinico dell'infezione.

*Tampone su lesione cutanea:* prelevare il liquido della lesione tramite bastoncino cotonato o altro materiale a secco, per poi inserirlo in provetta contenente VTM. Possono essere utilizzati anche tamponi secchi o asciutti.

*Raccolta della crosta:* in una provetta conica tipo Falcon sterile.

Evitare di mescolare nella stessa provetta campioni di tipo diverso (tamponi, croste e fluidi vescicolari). Se possibile raccogliere due aliquote dei campioni, così da poter ripetere i test in caso di risultati dubbi.

È possibile considerare, soprattutto nella prima fase dell'infezione (fase prodromica), il prelievo di un tampone oro-faringeo, ottenuto mediante bastoncino da immergere in VTM o a secco. Risultati negativi su questo tipo di campione dovrebbero essere valutati con cautela. Il tampone oro-faringeo può essere considerato come test nella sorveglianza dei contatti stretti di caso accertato.

La raccolta di ulteriori tipi di campioni, con il consenso informato da parte della persona interessata, è auspicabile, essendoci aspetti di questa infezione emergente, in particolare per quanto riguarda i ceppi clade I attualmente epidemici nella Repubblica Democratica del Congo (RDC) e paesi limitrofi, ancora da investigare. Questi possono includere sangue con anticoagulante (la viremia è precoce in corso d'infezione e generalmente limitata nel tempo), urina, saliva, liquido seminale, tamponi rettali e/o genitali, scelti sulla base della presentazione clinica, inclusa la localizzazione delle lesioni, anche atipiche (es. congiuntiva). Il prelievo di una biopsia della lesione durante lo stadio maculare deve essere preso in considerazione solo se clinicamente indicato, ed essere eseguito solo da personale adeguatamente formato.

I test sierologici sono utili, ma da soli non sono sufficienti per la diagnosi di infezione da MPXV; la rilevazione di IgM durante la fase precoce della malattia, o delle IgG in coppie di campioni di siero, raccolti il primo in fase acuta, e il secondo a distanza di almeno 21 giorni, possono comunque contribuire alla diagnosi in caso di risultati dubbi dei test molecolari. Una vaccinazione recente o pregressa può interferire con i test sierologici.

#### **Trasporto dei campioni clinici al laboratorio**

I campioni dovrebbero essere conservati refrigerati, o congelati entro un'ora dalla raccolta, e trasportati, con flusso dedicato, al laboratorio nel tempo più rapido possibile. Per il trasporto i campioni devono essere correttamente confezionati in un triplo involucro, etichettati, e corredati della

opportuna documentazione, in conformità con le linee guida dell'OMS per il trasporto di sostanze infettive<sup>5</sup>.

#### Conservazione dei campioni

Si raccomanda di conservare i campioni a 2°- 8°C, o di congelarli (a temperature uguali o inferiori a -20°C) entro un'ora dalla raccolta. Cicli ripetuti di congelamento-scongelo dei campioni dovrebbero essere evitati.

#### Diagnosi molecolare di Laboratorio

La conferma dell'infezione da MPXV è basata su saggi molecolari in PCR e/o real-time PCR, usati da soli o in combinazione col sequenziamento. L'estrazione del DNA virale da campioni biologici può essere effettuata usando qualsiasi protocollo standardizzato di estrazione e/o kit commerciale. In generale, lo step di lisi del campione, durante la procedura di estrazione del DNA, determina l'inattivazione del virus vivo. È perciò raccomandato che lo step di lisi venga effettuato sotto cappa a flusso laminare. Per l'estrazione della crosta dovrebbe essere utilizzato un kit di estrazione per tessuti così da assicurare l'appropriata lisi del campione. Si raccomanda in ogni caso di inserire successivamente nel test di PCR anche un controllo di estrazione, utilizzando oligonucleotidi e sonde specifiche per sequenze del DNA umano (e.g., RNaseP,  $\beta$ -actina, Gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi-GAPDH).

Diversi protocolli di PCR sono stati sviluppati e validati in vari laboratori; sono inoltre disponibili alcuni test commerciali. Alcuni protocolli prevedono due steps e sono basati su una prima reazione di PCR che rileva il genere Orthopoxvirus ma non identifica la specie, ed un successivo step, in PCR e/o sequenziamento (Sanger e/o NGS), che identifica specificatamente il MPXV. Altri protocolli sono invece basati sull'iniziale specifica ricerca di MPXV. Sono inoltre disponibili protocolli di PCR real-time che consentono di distinguere non solo il MPXV da altri Orthopoxvirus, ma anche il MPXV *clade* I dal *clade* II. A questo proposito è importante sottolineare che, per quanto riguarda l'attuale epidemia di mpox in RDC e paesi limitrofi, il nuovo sub-lineaggio del *clade* I di MPXV, denominato Ib, emerso nel 2023 e attualmente circolante, presenta una delezione genomica nel gene CL3<sup>6</sup>. Questa delezione influenza direttamente l'uso di un sistema PCR indicato dal CDC per rilevare specificamente i virus del *clade* I<sup>7</sup>, che risulta quindi inefficace per rilevare il *clade* Ib<sup>8</sup>. La delezione non pregiudica il rilevamento delle infezioni da MPXV mediante PCR MPXV generica o PCR Orthopox generiche. Ciò sottolinea l'importanza di eseguire PCR generiche e non solo PCR specifiche per *clade*.

L'isolamento in colture cellulari del MPXV non deve essere eseguito come procedura diagnostica di routine nei laboratori clinici o diagnostici. Questi metodi dovrebbero essere eseguiti in laboratori con

<sup>5</sup> <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>

<sup>6</sup> Leandre Murhula, et al. *Eurosurveillance* 29.11 (2024): 2400106.

<sup>7</sup> Yu, et al. *Journal of virological methods* 169.1 (2010): 223-227.

<sup>8</sup> Leonard, et al. *Eurosurveillance* 29.32 (2024): 2400486.

protocolli convalidati e strutture di contenimento BSL-3 (preferenzialmente da personale vaccinato contro il vaiolo).

Nei casi in cui la PCR risulti negativa a fronte di manifestazioni cliniche suggestive d'infezione da MPXV, può risultare utile un'indagine sierologica.

Si raccomanda di inviare le sequenze eventualmente ottenute all'indirizzo mail del Laboratorio Nazionale di Riferimento presso l'Istituto Superiore di Sanità: [mpox.dmi@iss.it](mailto:mpox.dmi@iss.it)

In caso di necessità è possibile inviare i campioni al Laboratorio di Riferimento Nazionale presso l'Istituto Superiore di Sanità, previa comunicazione (e-mail: [mpox.dmi@iss.it](mailto:mpox.dmi@iss.it); tel. 06 4990 2663; indirizzo: Laboratorio Nazionale di Riferimento per mpox, Dipartimento di Malattie Infettive, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma).

Altre specifiche indicazioni potranno essere richieste dai laboratori all'Istituto Superiore di Sanità, presso il quale viene individuato il Laboratorio Nazionale di Riferimento per mpox, e all'Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, parte del Consorzio dei Laboratori Europei di riferimento designati dalla Commissione europea.

#### *Metodologie diagnostiche consigliate*

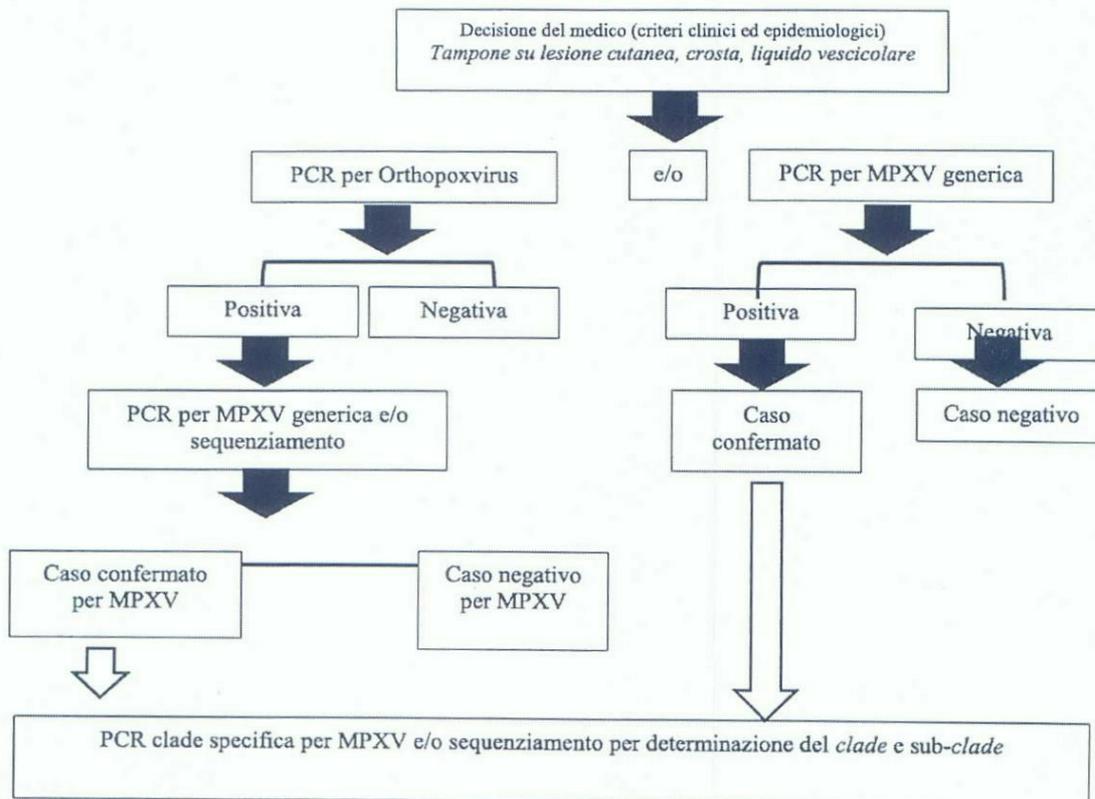
Si riportano di seguito le sequenze degli oligonucleotidi e sonde, e i relativi riferimenti bibliografici, di saggi molecolari al momento attuale consigliati. Potranno anche essere utilizzati saggi commerciali già disponibili sul mercato, o che lo saranno nel prossimo futuro.

Saggio	Nome dell'oligonucleotide	Sequenza dell'oligonucleotide 5'-3'	Riferimento bibliografico
dD14-16 (PCR specifica per MPXV Subclade Ib)	Mpox-K-F	5'-AAGACTTCCAAACTTAATCACTCCT - 3'	Schuele Leonard, Masirika Leandre Murhula, Udahemuka Jean Claude, Siangoli Freddy Belesi, Mbiribindi Justin Bengheya, Ndishimye Pacifique, Aarestrup Frank M, Koopmans Marion, Oude Munnink Bas B, Molenkamp Richard, GREATLIFE MPOX group. Real-time PCR assay to detect the novel Clade Ib monkeypox virus, September 2023 to May 2024. Euro Surveill. 2024;29(32):pii=2400486. <a href="https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.32.2400486">https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.32.2400486</a>
	Mpox-K-R	5'-CGTTTGATATAGGATGTGGACATTT- 3'	
	Mpox-K-P	5'-FAM-ATATTAGGCGCATATCCACCCACGT - BHQ-3'	
G2R_G assay (PCR generica per MPXV)	G2R_G F	5'-GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG- 3'	Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J
	G2R_G R	5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA-3'	

	G2R_G P	5'-FAM- AAGCCGTAATCATATGTTGTCATCGTGT CC BHO1-3'	Viroi Methods. 2010 Oct;169(1):223-7. doi: 10.1016/j.jvromet.2010.07.012. Epub 2010 Jul 17. PMID: 20643162.
G2 WA assay (PCR specifica per Clade II)	G2R_WA F	5'-CACAGCCGTCCTCCACAGA-3'	Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon JK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J Viroi Methods. 2010 Oct;169(1):223-7. doi: 10.1016/j.jvromet.2010.07.012. Epub 2010 Jul 17. PMID: 20643162.
	G2R_WA R	5'-GATACAGGTTAATTTCCACATCG- 3'	
C3L assay (PCR specifica per MPXV Clade Ia); N.B.: non rileva il Clade Ib)	G2R_WA probe	5'FAM- AACCCGTCGTAACAGCAATACATTT -BHO1-3'	Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon JK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J Viroi Methods. 2010 Oct;169(1):223-7. doi: 10.1016/j.jvromet.2010.07.012. Epub 2010 Jul 17. PMID: 20643162.
	C3L F	5'- TGCTACTCTGGATACAGAAAGCAA- 3'	
Real-time PCR per Pan- Orthopoxvirus	C3L R	5'- GGCATCTCCGTTTAATACATTTGAT-3'	Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. Mol Cell Probes. 2010 Apr;24(2):110-3. doi: 10.1016/j.mcp.2009.10.008. Epub 2009 Oct 29. PMID: 19879351.
	C3L probe	5'FAM- CCCATATATGCTAAATGTACCCGGTAC CGGA-BHO1-3'	
PCR per Orthopox virus e sequenziamen to Sanger	OPV F	5'-TAATACTTTCGATTCGCTCACAG-3'	Espy MJ, Cockerill III FR, Meyer RF, Bowen MD, Poland GA, Hadfield TL, Smith TF. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):1985-8. doi: 10.1128/JCM.40.6.1985- 1988.2002. Erratum in: J Clin Microbiol 2002 Nov;40(11):4405. PMID: 12037052; PMCID: PMC130682.
	OPV R	5'-ACTTCTCACAATGGATTTGAAATC- 3'	
PCR genetica per non- variole Orthopoxvirus	OPV P	5'-FAM-TCCTTTACGATGAATAATCAT- NFR-MGB-3'	Centers for Disease Control & Prevention: Non-variole Orthopoxvirus Genetic Real-Time PCR Test. Modified from Li et al. "Detection of monkeypox virus with real time PCR assays". Journal of Clinical Virology 36 (2006) 194-203.
	Forward	5'-TCA ACT GAA AAG GCC ATC TAT GA- 3'	
Reverse	Reverse	5'-GAG TAT AGA GCA CTA TTTT CTA AAT CCC A-3'	
	Probe	5'-FAM-CGA TGC AAT A (T-BHO1) A CGT ACA AGA TAG-TAG CCA AC-Phos- 3'	

PCR generica per MPXV	Forward	5'-GGA AAA TGT AAA GAC AAC GAA TAC AG-3'	Centers for Disease Control & Prevention: Monkeypox virus Generic Real-Time PCR Test. Modified from Li et al. "Detection of monkeypox virus with real time PCR assays". Journal of Clinical Virology 36 (2006) 194-203.
	Reverse	5'-GCT ATC ACA TAA TCT GGA AGC GTA-3'	
	Probe	5'-FAM- <u>AAAG CCG TAA TCT A&lt;del&gt;BHQ-1d&lt;/del&gt;-GT TGT CTA TGG TGT CC-Spacer-C6-3'</u>	
RMM PCR per la simultanea e distinta rilevazione di MPXV Clade I and II	MPXV_F3L_CLI_pr	5'-ATT0425-ATT0425-CGT CGG AAC TGT ACA CCA TAG TAC -BHQ1-3'	EVD-LabNet
	MPXV_F3L_CLI2_pr	5'-ATT0532-ATT0425-CGT TGG AGC TGT AAA CCA TAG CAC-BHQ1-3'	EVD-LabNet
	MPXV_F3L_forward	5'-CAT CTA TTA TAG CAT CAG CAT CAG A-3'	EVD-LabNet
	MPX_F3L_rev3	5'-TGC GGT TAT TAA AAA CAT TGG ACT AAG-3'	EVD-LabNet

*Algoritmo diagnostico molecolare suggerito:*



Direttore dell'Ufficio 5  
Francesco Maraglino

Referenti:  
Anna Caraglia  
Federica Ferraro

**Il Direttore Generale**  
**Francesco VAIA**

FRANCESCO  
VAIA  
17.09.2024  
10:40:38  
UTC

**Il Capo Dipartimento**  
**Maria Rosaria CAMPITIELLO**

Maria Rosaria  
Campitiello  
17.09.2024  
15:04:50  
GMT+01:00